

**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 FILOGENÉTICO DE AISLADOS  
MEXICANOS DE *BABESIA BOVIS* MEDIANTE LA  
FAMILIA DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE DEL  
MEROZOITO Y SUBUNIDAD PEQUEÑA DEL GEN  
RIBOSOMAL”**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS  
P R E S E N T A  
BIOL. ALMA DELIA GENIS MENDOZA**

**DIRIGIDA POR  
DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO  
DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ**

México D.F. Diciembre 2006

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS ©

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

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

## **TUTORES**

Dra. Minerva Camacho Nuez

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)

## **ASESORES**

Dr. Julio Vicente Figueroa Millán

Investigador del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología  
Veterinaria (INIFAP)

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

Profesor-Investigador Titular del Departamento de Patología Experimental  
CINVESTAV-IPN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP en Jiutepec Morelos, con el apoyo económico del Proyecto 139 fondo sectorial SAGARPA-CONACYT 2003.

La presente investigación fue posible, gracias al apoyo de la Universidad Autónoma de la Ciudad de Mexico UACM, por todo el apoyo académico y económico recibido, por todo ello, nuevamente..... gracias.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a la Dra. Esther Orozco, y a todos mis profesores de la maestría, por haberme dado la oportunidad de ser parte de este posgrado.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica y compartirme sus enseñanzas. No fue fácil pero al final al parecer hubo avances.

Al Dr. Juan Mosqueda por la confianza que depositó en mí, tanto en el proceso y realización del proyecto, como en las revisiones y exposiciones del mismo. Esas discusiones finalmente sirvieron de algo.

Al Dr. Julio Figueroa, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo y por su apoyo, sin duda fue un factor indispensable para que lo culminara.

A la Dra. María. de Lourdes Muñoz, por creer en mi, y en mi proyecto. Gracias por las asesorías filogenéticas, me fueron de mucha ayuda.

Al M. en C. Gerardo Rodríguez Muñoz, por su apoyo y tolerancia. Al compartirme sus conocimientos para la construcción de los árboles filogenéticos. Sin esto no lo hubiese logrado.

A Carmen, Paty y Angélica, por el apoyo moral y técnico, en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de hemoparásitos, por hacer de la estancia más agradable.

A Caty y Lulú, gracias por estar siempre dispuestas a ayudarme y a resolver problemas.

A mis amigos de la maestría, por compartir frustraciones y éxitos, en especial a Nonita, por la confianza y los ratos interminables; Vis, por el optimismo y las ganas de creer en que se podría lograr; Patiti, por esas tardes de estudio compartidas, Alberto (Elvis) por la confianza, Verito por las asesorías, apoyo y confianza, tienes madera.

A los amigos que aunque físicamente no estaban aquí, siempre creyeron que podría lograrlo.

A mi familia por creer en mí.... siempre.

A mis padres y hermano, por estar ahí, aceptando y participando en mis proyectos.

A mi esposo Alfonso, por impulsarme, por creer en mí, por amarme, sin ti no lo hubiese finalizado. ¡Juntos lo logramos!

INDICE GENERAL	Página
<b>I Resumen</b>	1
<b>II Introducción</b>	2
II.1 Características genómicas de <i>Babesia bovis</i>	6
II.2 Factores que influyen la variación genética	10
II.3 Filogenia molecular en Piroplasmas	12
<b>III Justificación</b>	16
<b>IV Hipótesis</b>	17
<b>V Objetivos</b>	17
<b>VI Material y equipo</b>	18
VI.1 Equipo	18
VI.2 Material	19
VI.3 Reactivos	20
VI.4 Soluciones	21
<b>VII Estrategia Experimental</b>	22
<b>VIII Métodos</b>	23
VIII.1 Área de estudio	23
VIII.2 Colecta de sangre infectada	24
VIII.3 Procesamiento de sangre infectada	24
VIII.4 Extracción de DNA de <i>Babesia bovis</i>	24
VIII.5 Cuantificación de DNA	25
VIII.6 Amplificación de los genes	25
VIII.7 Clonación de los genes	26
VIII.8 Transformación	27
VIII.9 Cultivo de bacterias transformadas	27
VIII.10 Purificación de DNA clonado	27
VIII.11 Cuantificación de DNA plasmídico	27
VIII.12 Digestión enzimática de DNA	27
VIII.13 Secuenciación	28
VIII.14 Edición de secuencias	28
VIII.15 Alineamiento múltiple de secuencias	28
VIII.16 Análisis y búsqueda de genotipos	29
VIII.17 Análisis filogenético	29
VIII.18 Definición del grupo externo para el filograma	30
VIII.19 Análisis <i>in silico</i> de proteínas	30
<b>IX Resultados</b>	31
IX.1 Obtención de DNA de <i>Babesia bovis</i> de 13 aislados mexicanos	31
IX.2 Amplificación de la región variable del gen <i>msa-2b</i> de <i>Babesia bovis</i> en 13 aislados Mexicanos	32
IX.3 Amplificación de la región hipervariable del gen ribosomal de <i>Babesia bovis</i> en 13 aislados Mexicanos	32
IX.4 Amplificación del gen <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> en 13 aislados Mexicanos	32
IX.5 Clonación de los genes <i>msa-2b</i> , <i>msa-2c</i> y ribosomal de 13 aislados de <i>Babesia bovis</i>	32
IX.6 Alineamiento de nucleótidos	36
IX.7 Alineamiento de aminoácidos	38
IX.8 Análisis filogenético	51
IX.9 Genotipos	61

---

<b>X Resultados adicionales</b>	65
Análisis proteico	65
X.1 Análisis de variabilidad e hidrofobicidad de la proteína	65
<b>XI Discusión de resultados</b>	70
XI.1 Diseño de oligonucleótidos	70
XI.2 Amplificación de genes	71
XI.3 Clonación	72
XI.4 Alineamientos múltiples	72
XI.5 Filogramas	76
XI.6 Genotipificación	79
XI.7 Análisis proteico	80
<b>XII Conclusiones</b>	82
<b>XIII Perspectivas</b>	83
<b>IVX. Referencias Bibliográficas</b>	84

---

Figura 1. Mapa de distribución de garrapatas <i>B. microplus</i>	3
Figura 2. Esquema metodológico	22
Figura 3. Protocolo de ciclado para los genes <i>msa-2b</i> y el gen <i>ssrRNA</i>	26
Figura 4. Protocolo de ciclado para el gen <i>msa-2c</i>	26
Figura 5. DNA de <i>B. bovis</i> de varios aislados mexicanos	33
Figura 6. Amplificación de la región variable del gen <i>msa-2b</i>	33
Figura 7. Amplificación de la región hipervariable del gen ribosomal	34
Figura 8. Amplificación del gen <i>msa-2c</i>	34
Figura 9. Digestión enzimática del gen <i>msa-2c</i>	35
Figura 10. Digestión enzimática del gen <i>msa-2b</i>	35
Figura 11. Digestión enzimática del gen <i>ssrRNA</i>	36
Figura 12. Alineamiento múltiple de la región variable del gen <i>msa-2b</i> .	43
Figura 13. Alineamiento múltiple del gen <i>msa-2c</i>	46
Figura 14. Alineamiento múltiple de la región hipervariable del gen ribosomal	48
Figura 15. Alineamiento múltiple de aminoácidos para la proteína MSA-2C	49
Figura 16. Alineamiento múltiple de aminoácidos para la proteína MSA-2B	50
Figura 17. Relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando la región variable del gen <i>msa-2b</i>	52
Figura 18. Relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando el gen <i>msa-2c</i> .	53
Figura 19. Relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando el gen <i>msa-1</i> .	55
Figura 20. Relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando la región hipervariable de la subunidad 18s del gen ribosomal	56
Figura 21. Filogenia del gen <i>msa-1</i> construido solo con los aislados mexicanos, filogenia del gen <i>msa-1</i>	57
Figura 22. Filogenia del gen <i>msa-2b</i> , con solo con los aislados mexicanos.	58
Figura 23. Filogenia del gen <i>msa-2c</i> realizado solo con los aislados mexicanos	59
Figura 24. Filogenia del gen <i>ssrRNA</i> , fue construido a partir de los 13 aislados mexicanos	60
Figura 25. Perfil de hidrofobicidad de la proteína MSA-2b	67
Figura 26. Perfil de hidrofobicidad para la proteína MSA-2c.	69

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Muestras procesadas en el trabajo	23
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes	25
Tabla 3. Concentración del DNA de los 13 aislados mexicanos	31
Tabla 4. Identidad de nucleótidos y aminoácidos para el gen <i>msa-2b</i>	39
Tabla 5. Identidad de nucleótidos y aminoácidos, para el gen <i>msa-2c</i>	40
Tabla 6. Genotipos generados con el alineamiento de la proteína MSA-2c	62
Tabla 7. Genotipos obtenidos a partir de la proteína MSA-2B	63
Tabla 8. Subgenotipos Americanos, obtenidos a partir de la proteína MSA-2B	64
Tabla 9. Posiciones hipervariables de la proteína MSA-2b	66
Tabla 10. Posiciones hipervariables de la proteína MSA-2c	68

## RESUMEN:

Los antígenos variables de superficie del merozoito de *Babesia bovis*, son glicoproteínas de membrana a las que se les confiere un papel en la invasión de los eritrocitos. Los miembros de esta familia de genes incluyen a *msa-1* y *msa-2* (*msa-2c*, *msa-2a1*, *msa-2a2* y *msa-2b*), cada uno de los genes está sujeto a distinta presión génica evolutiva, lo que les confiere una variabilidad diferente. El gen ribosomal está expuesto a presión evolutiva, por lo que se ha utilizado en distintos estudios filogenéticos. El objetivo de este trabajo fue determinar las relaciones filogenéticas de distintos aislados de *Babesia bovis* de la república mexicana utilizando las secuencias de los genes arriba mencionados.

Los amplicones correspondientes a cada uno de los genes fueron clonados y secuenciados. El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas y las deducidas de aminoácidos se realizaron mediante el programa Vector NTI Advance <sup>TM</sup> 10 (Invitrogen), el cual reveló distintos grados de variabilidad e identidad entre las distintas secuencias de los genes analizados de 13 aislados diferentes de la república mexicana.

La variación de las secuencias puede ser el resultado de la presión evolutiva diferencial entre los genes de superficie (*msa-1*, *msa-2b* y *msa-2c*), o resultado del movimiento, debido al comercio del ganado bovino.

El análisis filogenético se realizó con el programa Phylip 3.6, el cual sugiere que los aislados forman grupos que se separan de acuerdo a su origen: Australiano y Americano.

## INTRODUCCIÓN:

La Babesiosis bovina es una enfermedad común en el ganado vacuno y en animales silvestres. Es de amplia distribución a nivel mundial (Homer *et al.*, 2000; Lew *et al.*, 2005), fue descrita en el año 1888 por Victor Babes en Rumania, y llamada en un inicio como aguas rojas (Uilenberg, 2006).

Esta enfermedad es causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* y es transmitida por varias especies de garrapatas incluyendo el género *Boophilus*. Los signos clínicos más comúnmente observados en bovinos afectados por Babesiosis son: fiebre, anorexia, esplenomegalia y anemia (Martínez *et al.*, 1999). En ocasiones se observa también hemoglobinuria, signos nerviosos, postración y muerte (Mosqueda *et al.*, 2004; Homer *et al.*, 2000), aunque también la enfermedad es tipificada por complicaciones cerebrales caracterizadas por trombosis o parálisis, provocando coma, trombosis pulmonar y la muerte del animal enfermo (Bork *et al.*, 2004).

Aunque la enfermedad es más frecuente en animales, también se presenta en humanos; no obstante, es considerada rara y el primer caso de Babesiosis humana fue detectado en la antigua Yugoslavia en 1957. La mayoría de los casos que se diagnosticaron fueron en personas inmunodeprimidas, o con esplenectomía (Martínez *et al.*, 1999).

En humanos, la Babesiosis es causada por varias especies de *Babesia*, predominantemente por *Babesia Microti* y ocasionalmente *B. divergens* (Gaffar *et al.*, 2003; Homer *et al.*, 2000).

La Babesiosis es una enfermedad que tiene repercusiones económicas importantes a nivel mundial. Se han reportado pérdidas económicas en África de 15.9 millones de dólares (mdd), en Asia de 6.9 mmd, en Australia de 6.2 mmd, y en América de 24.8 mdd (Lew *et al.*, 2005). México es uno de los países más afectados ya que la enfermedad limita la producción ganadera en las regiones tropicales y subtropicales del país, especialmente en áreas en las que se introduce ganado de razas especializadas o genéticamente mejorado (Mosqueda *et al.*, 2004).

La Babesiosis se encuentra mundialmente distribuida en aquellos países localizados entre los paralelos 40° N y 32° S del Ecuador, donde existen áreas de clima tropical y subtropical ideales para el desarrollo de la garrapata vector de las especies *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus* (Mosqueda *et al.*, 2004).

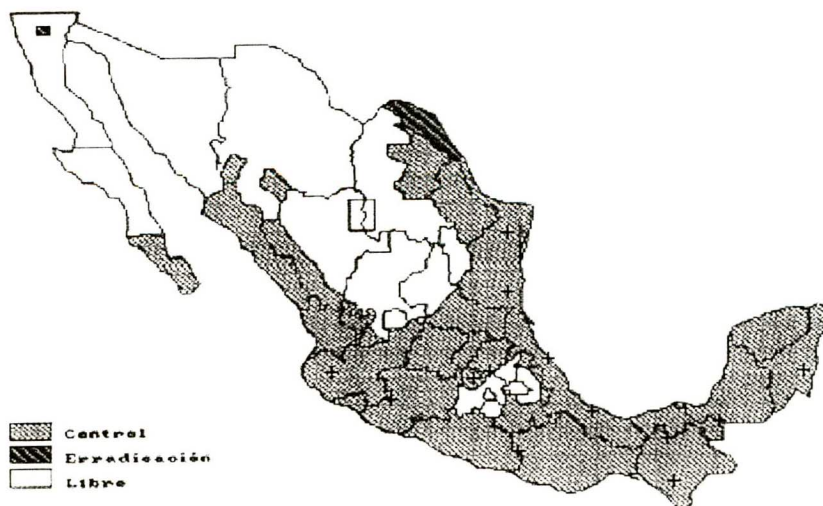
En México, el 70% del total de cabezas de bovinos se encuentran en zonas endémicas para el vector, y por lo tanto para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. En estudios epidemiológicos realizados en diferentes regiones del país, se han mencionado tasas de prevalencia que varían entre 4 - 96% (Mosqueda *et al.*, 2004). Las tasas más altas de transmisión duran de 6 a 9 meses, generalmente de primavera a otoño disminuyendo su incidencia en los meses de invierno (Bock *et al.*, 2004).

La Babesiosis bovina es transmitida por garrapatas vector de las especies *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus* las que están distribuidas en gran parte de la república mexicana.

En la actualidad los estados de la república mexicana que se mantienen libres de garrapatas son: Sonora, Aguascalientes, Tlaxcala, Distrito Federal; y en vías de erradicación, Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, y Puebla (NOM-019-ZOO-2002). Sin embargo, se mantienen con una alta incidencia de garrapatas los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Guerrero, Nayarit, Veracruz, Jalisco, Tamaulipas, y Morelos entre otros.

**Figura 1**

**Mapa de distribución de garrapatas *B. microplus***



## Clasificación y ciclos de transmisión:

*Babesia bovis* es un parásito intraeritrocytario, perteneciente al:

Reino:	<i>Protista</i>
Phylum:	<i>Apicomplexa</i>
Clase:	<i>Sporozoa</i>
Orden:	<i>Eucoccidiorida</i>
Suborden:	<i>Piroplasmorina</i>
Familia:	<i>Babesiidae</i>
Género:	<i>Babesia</i>
Especie:	<i>bovis</i>

(Bock *et al.*, 2004)

El ciclo de vida de *Babesia bovis* es indirecto, y se divide en dos:

### 1.- Eventos en el vertebrado (huésped intermediario):

En la sangre de bovinos infectados, los merozoitos de *Babesia* spp., invaden a los eritrocitos. Dentro del eritrocito, el merozoito se transforma en trofozoito, el trofozoito origina por fisión binaria a dos nuevos merozoitos inmaduros los cuales se separan y escapan de la célula hospedera invadiendo a nuevos eritrocitos. Esta invasión eritrocítica continúa hasta que la sangre es ingerida por otras garrapatas hembras (Riek, 1966; Mehlhorn *et al.*, 1984; Mosqueda *et al.*, 2004).

### 2.- Eventos en la garrapata vector (huésped definitivo):

La garrapata hembra adulta, adquiere la infección al alimentarse de sangre infectada en donde los parásitos ingeridos salen de los eritrocitos e infectan a las células epiteliales del intestino dando origen a varios quinetos. Estos quinetos salen de las células intestinales y migran hacia el ovario de la garrapata infectando a los huevos antes de que sean recubiertos por quitina. Los quinetos invaden las células del intestino del embrión y permanecen en estado latente hasta que la larva eclosiona e infesta a un nuevo bovino (Uilenberg, 2006).

Cuando la larva ha invadido a otro bovino, la temperatura de éste induce la multiplicación de quinetos, los cuales salen de las células intestinales de la larva o ninfa migrando hasta las glándulas salivales, en donde los quinetos se transforman en esporozoitos. Los esporozoitos son liberados con saliva a la sangre cuando la larva de la garrapata (en el caso de *B. bovis*) o la ninfa y adultos (para *B. bigemina*) de la garrapata se alimentan en el hospedero bovino (Mosqueda *et al.*, 2002).

La invasión es uno de los pasos críticos del ciclo de vida de *Babesia*. El merozoito, estadio invasivo, resulta de especial interés pues al invadir al eritrocito involucra una serie de receptores y puntos en su superficie para infectar al parásito (Figuroa *et al.*, 1998).

El merozoito presenta una estructura apical característica de los *Apicomplexa* que expresa proteínas y estructuras que intervienen en la invasión del eritrocito como roptrías, micronemas, cuerpos esféricos y anillos polares (Lew *et al.*, 2002).

El proceso de invasión del merozoito se realiza en varias fases:

El merozoito se adhiere a la cubierta de superficie del eritrocito seguido de una orientación de la parte apical del merozoito con respecto a la célula blanco. El complejo apical debe estar en contacto con la membrana del eritrocito para que se realice una unión de membranas en donde, se liberarán productos de las roptrías (proteínas RAP, lípidos y algunas enzimas) y de los micronemas, ayudando a la unión y penetración del parásito por medio de fagocitosis dependiente de miosinas (Lew *et al.*, 2002) de la misma manera que *Plasmodium* y *Anaplasma*.

Este mecanismo tiene gran relevancia, ya que se puede bloquear la adhesión inicial del merozoito y evitar la infección bloqueando los productos de las roptrías y de la superficie del merozoito (Ristic *et al.*, 1981).

### **Características genómicas de *Babesia bovis*:**

El tamaño estimado del genoma de *B. bovis* es de 9.4 millones de pares de bases. Por medio de electroforesis de campos pulsados se determinó que *B. bovis* cuenta con 4 cromosomas en el genoma haploide. El tamaño de los cromosomas oscila entre 1.4, 2.0, 2.8 y 3.2 millones de pares de bases para los cromosomas 1, 2, 3 y 4, respectivamente (Jones *et al.*, 1997).

Actualmente la secuenciación del genoma se encuentra en proceso. Se construyó una biblioteca BAC (cromosomas artificiales de bacterias) la cual contiene 9216 clonas de 110 Kb, pero hasta hoy solo se han ordenado aproximadamente 12565 contigs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; [http://www.vetmed.wsu.edu/research\\_vmp/babesia-bovis/](http://www.vetmed.wsu.edu/research_vmp/babesia-bovis/) octubre 2006).

Dentro de las proteínas que se han caracterizado de *Babesia bovis* se encuentran las que se expresan en la superficie del merozoito durante la invasión a la célula blanco: la familia de antígenos de superficie del merozoito (VMSA) (Hines *et al.*, 1992). Son glicoproteínas de superficie ancladas en la membrana celular por glicosil-fosfatidinositol (GPI) en el merozoito y esporozoito. Esta familia esta integrada por proteínas que comparten una señal amino terminal hidrofóbica, una región central hidrofílica y una región carboxilo terminal muy conservada.

Los genes de la familia VMSA se encuentran distribuidos en dos loci, con regiones altamente conservadas, existe una región de 54 pb altamente conservada en el extremo 5', la cual se ha sugerido como región reguladora (Mosqueda *et al.*, 2002b, Florin-Christensen *et al.*, 2002).

La familia de Antígenos de la Superficie de Merozoito (VMSA), está integrada por los siguientes genes:

***msa-1***: Es un gen de 901 pb sin intrones, la caracterización del gen fue realizada por Suarez *et al.*, en el 2000, en una clona biológica de *B. bovis* de origen mexicano (Mo7). El gen *msa-1* codifica para una glicoproteína de membrana, inmunodominante, de 42 kDa (LeRoith *et al.*, 2005). Esta se encuentra cubriendo uniformemente la superficie de todo el merozoito y del esporozoito (Mosqueda *et al.*, 2002).

MSA-1 es una proteína que interviene en la adhesión al eritrocito durante el proceso de invasión de *Babesia bovis* (Franssen *et al.*, 2003). Se considera el antígeno con mayor variabilidad de la familia VMSA; esta variación se observó en distintas cepas australianas de diferentes áreas geográficas (Suarez *et al.*, 2000; LeRoith *et al.*, 2005).

Esta proteína estructural es crítica para los procesos de adhesión e invasión al eritrocito, los anticuerpos monoclonales generados contra esta proteína presentaron muy poca reactividad inmunológica cruzada entre cepas australianas de la misma región y entre cepas americanas, por lo que se sugiere desempeña un papel importante en la selección de los parásitos al expresar variantes alélicas (LeRoith *et al.*, 2005). En 1992 Hines y colaboradores produjeron anticuerpos contra MSA-1, en donde observaron que éstos inhibían la unión del merozoito a los eritrocitos en experimentos *in vitro*, determinando con esto, su importancia en el proceso de invasión.

También se comparó el dominio extracelular del gen *msa-1*, con diferentes aislados provenientes de México, Australia y Argentina. Los análisis filogenéticos indican que existe una estrecha relación entre los aislados mexicanos y australianos en comparación con los argentinos. En general son muy parecidos, por lo que se ha sugerido que el producto del gen podría ser un candidato para la elaboración de vacunas recombinantes (LeRoith *et al.*, 2005).

Recientemente, se observó que anticuerpos monoclonales específicos contra péptidos obtenidos de manera recombinante, para el extremo amino y carboxilo terminal, son capaces de inhibir la infección del merozoito al eritrocito *in vivo* (LeRoith *et al.*, 2006).

***msa-2***: Es un conjunto de 4 genes distribuidos en un locus arreglado en tándem de aproximadamente 6392pb, caracterizado por Florin-Christensen en el 2002 en la clona mexicana Mo7. El locus posee cuatro genes: *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, *msa-2b*, *msa-2c* con espacios intergénicos del mismo tamaño (700pb). Los genes están agrupados, aparentemente por duplicación genética dada en algún momento de su evolución. Estos genes codifican para varias proteínas que se expresan durante la invasión en la superficie del parásito, todas participan en el

proceso de invasión, por lo que es necesario su estudio (Franssen *et al.*, 2003).

Recientemente se ha publicado el arreglo del locus para cepas australianas, con un producto menor de aproximadamente 3109 pb, en donde aparentemente hay una región faltante, ésta puede ser la región que codifica para los genes *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, y/o *msa-2b*. Se encontró que las cepas australianas solo presentan regiones codificantes para los genes *msa-2c* y *msa-2a/b*, con una región hipervariable, que les confiere variabilidad a éstas cepas (Berens *et al.*, 2005).

***msa-2c***: Es un gen de aproximadamente 797 pb sin intrones y codifica para la proteína MSA-2c de 30 kDa que se expresa en la superficie del merozoito. *Msa-2c* es un gen que se encuentra altamente conservado con hasta un 88.7% de identidad nucleotídica en cepas geográficamente distintas (Wilkosky *et al.*, 2003), por lo que se le ha propuesto como proteína candidata para el diagnóstico y con potencial vacunal para el control de la Babesiosis (Domínguez *et al.*, 2004).

***msa-2a<sub>1</sub>***: Es un gen de aproximadamente 955 pb. Codifica para la proteína MSA-2a<sub>1</sub> de aproximadamente 46 kDa, esta se expresa en la superficie del merozoito y del esporozoito de *Babesia bovis*, participando en la invasión del merozoito a la célula blanco (Mosqueda *et al.*, 2002b).

***msa-2a<sub>2</sub>***: Es un gen de 848 pb. Codifica para la proteína MSA-2a<sub>2</sub> de aproximadamente 40 kDa, que se expresa en la superficie del merozoito y del esporozoito de *Babesia bovis*, y participa en la invasión del eritrocito (Mosqueda *et al.*, 2002b).

***msa-2b***: Es un gen con 905 pb, que codifica para la proteína MSA-2b de aproximadamente 38 kDa, se expresa en la superficie del merozoito y del esporozoito de *Babesia bovis* (Mosqueda *et al.*, 2002b). El papel de la proteína MSA-2b es participar en la invasión de *Babesia bovis* al eritrocito, co-expresándose con las proteínas MSA-2c y/o MSA-2a<sub>1</sub>, MSA-2a<sub>2</sub> (Berens *et al.*, 2005).

Las proteínas de la superficie del merozoito han sido estudiadas por la participación en la invasión a la célula blanco, al igual que proteínas asociadas a

las roptrias RAP-1, por lo que se han propuesto como blancos vacunales para el control de la Babesiosis (Mosqueda *et al.*, 2002a, Mosqueda *et al.*, 2002b).

Los genes de la familia variable del merozoito de *Babesia bovis*, se han propuesto como candidatos vacunales; en particular, se ha propuesto al gen *msa-2c*, este es el más conservado de la familia, además de ser altamente inmunodominante (Domínguez *et al.*, 2004).

El gen *msa-1*, a pesar de ser sumamente variable entre aislados de varias regiones endémicas de Australia. Se ha propuesto como candidato vacunal porque se encontraron varios epítopes conservados altamente inmunogénicos dentro de la molécula. (LeRoith *et al.*, 2005).

El gen *msa-2b* se ha propuesto también como candidato vacunal, pues es importante en la invasión a la célula blanco, aunque se ha observado que está menos conservado en comparación con el gen *msa-2c*, en realidad no se tiene registro de su comportamiento y polimorfismo (Berens *et al* 2005).

**Gen ribosomal:** Existen tres distintas moléculas de ADN ribosomal caracterizadas en el genoma de *B. bovis*, (*ssrRNA* de 1.7 KB; 5.8 *SrRNA* y *LsrRNA* de 3.1 KB) (Darlymple *et al.*, 1990). La secuencia completa de la subunidad pequeña 18s del gen ribosomal *rRNA* tiene aproximadamente 1693 pb (Reddy *et al.*, 1991).

En el año 1993 se aisló un fragmento de forma circular de 552 pb, de *Babesia bovis*, la cual se encuentra extracromosomalmente (Gozar *et al.*, 1993; Gozar *et al.*, 1995). Posiblemente esta secuencia corresponde a un “organelo” celular de origen mitocondrial. En los análisis filogenéticos se encontró que la secuencia del organelo tiene una identidad del 71% con la mitocondria de *Plasmodium falciparun*, y el 83% de identidad con otras especies de *Plasmodium*, además de una identidad del 65% con otros organismos (Gozar *et al.*, 1995).

La secuencia del gen que codifica para la subunidad pequeña ribosomal se encuentra altamente conservada entre varias especies de *Babesia*, por lo que se ha utilizado como marcador genético, y como alternativa para diagnosticar la enfermedad en bovinos (Reddy *et al.*, 1992).

En varias especies del género apicomplexa, se ha amplificado la región hipervariable (V4) del gen *ssrRNA* (Gubbels *et al.*, 1999), esta región consta de aproximadamente 100 pb con pequeñas variaciones entre cepas, por lo que puede ser utilizada para el diagnóstico de la enfermedad por PCR (Calder *et al.*, 1996). Además esta región presenta la ventaja de estar abundantemente representada en el genoma del parásito, lo que facilita la detección de éstos empleando menor cantidad de muestra (Reddy *et al.*, 1992).

### **Factores que influyen en la variación genética:**

La filogenia es el estudio de la evolución y desarrollo de las especies, las filogenias son una herramienta básica en estudios ecológicos y evolutivos. Sirve como puente de unión entre la micro- y la macroevolución. En sentido amplio, se entiende por evolución a los cambios que se dan en las características de los organismos en periodos largos de tiempo. Este cambio afecta a la información genética, por ser la que se transmite de generación en generación (Futuyma, 1997).

El análisis de la evolución de las moléculas se realiza comparando la secuencia de aminoácidos de determinada proteína o nucleótidos de genes en especies diferentes o en individuos de una misma especie. La constatación del nivel en el cual hay diferencias interespecíficas (divergencia) o intraespecíficas (polimorfismo) hace que nos preguntemos por el motivo de los cambios observados y que intentemos descubrir que factores evolutivos son responsables. Entre estos factores se encuentra la selección natural, que da lugar a la adaptación, y a la deriva génica que provoca cambios aleatorios no adaptativos (Nei & Kumar, 2000).

Las diferencias que se detecten al comparar la secuencia de un gen entre dos o más individuos o bien, entre individuos de una misma especie constituyen una fracción muy pequeña de todos los cambios (mutaciones) que se han producido en la historia de este gen. Una nueva variable sugerida por mutación se encuentra inicialmente en un único individuo de la especie y con el transcurso del tiempo esta variante puede pasar a tener pérdida o fijación dentro de la

población o en algunos casos con una frecuencia intermedia (polimorfismo). Estas son las mutaciones que permanecen en la población, y las que provocan las diferencias detectadas (Nei & Kumar, 2000).

Una variante surgida por mutación puede afectar la capacidad relativa de supervivencia y reproducción del individuo que la presenta (eficacia biológica). El efecto de este cambio depende del ambiente en que se encuentra la mutación. Una mutación se considera selectivamente ventajosa si incrementa la eficacia del individuo portador y selectivamente deletérea si la disminuye (Futuyma, 1997).

En caso de no afectar, la mutación es selectivamente neutra, su destino no estará regido por la selección natural. El destino de las mutaciones ventajosas y de las deletéreas depende fundamentalmente de la selección natural mientras que el de las mutaciones neutras esta regido únicamente por el azar (Graur & Li, 1999).

Kimura en 1980 propuso que la mayoría de los cambios observados en las secuencias de aminoácidos en las proteínas, corresponden a mutaciones neutras. Una proporción insignificante de los cambios a nivel molecular corresponden a mutaciones ventajosas. Las proteínas con mayor limitación funcional tienen una menor tasa de mutación neutra y por lo tanto una menor tasa de sustitución.

La biología evolutiva y la genética de poblaciones, buscan el origen y el significado de los polimorfismos bioquímicos. Con frecuencia el llamado debate seleccionista-neutralista se ha centrado en que la mayoría de las mutaciones tienen mayor probabilidad de ser deletéreas y ser eliminadas rápidamente. Pero mientras que la teoría neutralista considera el azar, la teoría seleccionista considera la necesidad. Esta controversia afecta por supuesto a los parásitos, de hecho son buenos modelos para responder este tipo de preguntas. Sin embargo, no resulta fácil determinar cual de las teorías da la mejor respuesta al proceso de diversificación genética. Debemos considerar si la evolución esta gobernada principalmente por fuerzas selectivas, por factores al azar o incluso que ambos procesos actúen conjuntamente, o que estén implicados otros factores evolutivos (Graur & Li, 1999).

Las moléculas se han utilizado para reconstruir la historia evolutiva de los organismos (filogenias moleculares), si una determinada molécula, proteica o de ADN presenta una tasa constante de evolución, ésta puede ser utilizada como reloj molecular que permite estimar el tiempo de divergencia entre especies. Pero las moléculas no siempre evolucionan con una tasa constante, lo que puede afectar a la reconstrucción filogenética (Futuyma, 1997).

La tasa de sustitución de una proteína puede haberse aclarado en un linaje determinado por la fijación de mutaciones selectivamente ventajosas, es decir por selección positiva. Esta proteína no es un buen reloj molecular y no resultaría conveniente para la reconstrucción filogenética, pero es la única fuerza evolutiva a nivel molecular que puede explicar las nuevas adaptaciones (Nei & Kumar, 2000).

Por otra parte, las duplicaciones de partes del genoma se encuentran en la base de estos cambios, al igual que la recombinación, pueden jugar un papel fundamental en la evolución, ya que permiten la generación de variación genética, la reducción de carga mutacional y la producción de nuevos organismos (Graur & Li, 1999).

### **Filogenia molecular en Piroplasmas:**

Dada la importancia de la variación genética en las poblaciones en parásitos, es crucial que esta diversidad sea estudiada y comprendida a fondo.

Las reconstrucciones filogenéticas se han convertido en una herramienta muy importante en el estudio de esta variación ya que tienen la ventaja, sobre otros métodos, toma en cuenta la información evolutiva contenida en las secuencias. Esto no quiere decir que otros métodos no pueden ser considerados, sino que la filogenia molecular ayuda a comprender la variación actual teniendo en cuenta la generación y evolución de la misma.

La filogenias no solo ofrecen un esquema visual de clasificación, sino que existen factores tales como la selección natural, la deriva génica y la historia demográfica de las poblaciones, que dejan diferentes huellas en las relaciones evolutivas entre las secuencias representadas en una filogenia. Por ello, un

análisis exhaustivo de un árbol filogenético puede descifrar cuales de los procesos anteriores han actuado.

El estudio filogenético entonces, puede servir para el control y erradicación de las enfermedades parasitarias, nos puede ayudar a contestar interrogantes como el origen de las enfermedades parasitarias, o para averiguar los factores que facilitan la propagación de la infección (Lew *et al.*, 2005). También, para determinar las fuerzas evolutivas presentes en las poblaciones parasitarias, o determinar la existencia de diferentes genotipos y subtipos de parásitos, o para relacionarlos con diferentes patrones de distribución geográfica.

También es primordial la información que puede obtenerse de la dinámica poblacional de los parásitos a partir de la estructura de las ramas de la filogenia o para revelar qué mutación esta asociada a varios subtipos de parásitos que se encuentren particularmente en un lugar, y así determinar la heterogeneidad u homogeneidad genética de los parásitos. En la actualidad, el interés en la filogenia se debe al desarrollo de los métodos moleculares que permiten trabajar directamente con las secuencias de los genes (Eguiarte *et al.*, 1997).

Los primeros análisis filogenéticos en *Babesia bovis* se realizaron en 1992 y 1993 para determinar las relaciones de parentesco de *B. bovis* y *B. bigemina* en relación con otros organismos apicomplexa utilizando el gen 16 *srDNA*, confirmando la hermandad de estas dos especies. En el año 2000, también se realizaron análisis filogenéticos utilizaron las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90, hallando resultados parecidos (Lew *et al.*, 2005).

En 1994 Allsopp y colaboradores, realizaron la filogenia de piroplasmas en donde utilizaron la subunidad pequeña del gen ribosomal de varias especies de *Theileria*, *Cytauxzoon* y *Babesia*, encontraron modificaciones con respecto a distancias evolutivas, además de distinguir a *Theileria* y a *Babesia* como grupos monofiléticos separados provenientes de un grupo hermano polifilético, clasificación que hoy está en constante cambio gracias a estudios con variedad de proteínas como el ejemplo anterior.

*Babesia bovis* al ser un parásito *apicomplexa* guarda estrecha relación con organismos parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, y varias especies de *Theileria*. Recientemente se observó reactividad cruzada entre proteínas secretadas en la superficie del merozoito por micronemas (AMA-1 y BbAMA-1) de *Plasmodium falciparum* y *Babesia*, demostrando la gran similitud entre estos géneros (Gaffar *et al.*, 2003).

El gen ribosomal se ha utilizado ampliamente como marcador molecular por tener una tasa de cambio constante y por estar sumamente conservado. Se han realizado algunos estudios con el gen ribosomal para el Phylum *Apicomplexa* para detectar nuevas especies, reagrupar especies o diferenciar subespecies (Carret *et al.*, 1998; Chae *et al.*, 1988; Reichard *et al.*, 1999; Rougemont *et al.*, 2004).

Con respecto a estudios realizados con especies de *Babesia*, se publicaron recientemente tres artículos en donde utilizaron la subunidad pequeña del gen ribosomal para comparar algunas especies de China (Luo *et al.*, 2005a) para diferenciar tres subespecies de babesias que infectan a perros (Carret *et al.*, 1999) y otro en donde hacen una reclasificación de poblaciones o subpoblaciones de *B. bovis* (Luo *et al.*, 2002b), demostrando con ésto el desconocimiento filogenético y taxonómico que existe en esta especie.

Se escogió como parámetro la amplificación del gen ribosomal (*ssrRNA*) porque es un gen sumamente conservado, útil para determinar relaciones filogenéticas (Egea *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1992; Gozar *et al.*, 1995; Gozar *et al.*, 1993; Dalrymple *et al.*, 1992; Shin-Hyeong *et al.*, 2002), además de servir también la región hipervariable (V4), para el diagnóstico de la enfermedad (Gubbels *et al.*, 1999; Georges *et al.*, 2001; Oura *et al.*, 2003).

A partir de esta región hipervariable, se estudiaron distintas áreas geográficas de aislados en las especies de *Theileria* que infectaban a bovinos. La región hipervariable de la subunidad pequeña del gen ribosomal sirvió para detectar diferencias significativas en la secuencia nucleotídica y para sugerir una reclasificación de las especies participantes (Chae *et al.*, 1998).

Con respecto a estudios filogenéticos de *Babesia bovis* utilizando los genes de superficie del merozoito solo existe un reporte en el 2002 de Florin-Christensen y colaboradores, en el cual se realizó un análisis filogenético de los genes arreglados en tándem de la superficie del merozoito. Este arreglo se considera común dentro de los protozoarios y en organismos como *Babesia* y *Plasmodium*, sin embargo todavía no se encuentra una ventaja clara que le pueda conferir este arreglo a *Babesia bovis*. Se propone que puede ser un avance evolutivo selectivo y funcional relacionado con la invasión al merozoito.

El arreglo en tándem del locus *msa-2* (*msa-2c*, *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>* y *msa-2b*), se cree que se originó por duplicaciones. El gen que se encuentra más conservado es el gen *msa-2c*; entre *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>* existe una identidad del 54% y del 64%, respectivamente con respecto al gen *msa-2b*, por lo que sugieren que probablemente existieron duplicaciones o rearrreglos (inserciones, deleciones o recombinación), en una región "hot spot" o región recombinante, durante la etapa asexual (merozoito) debido a que esta región está expuesta en la superficie de los esporozoitos, misma que presenta también una alta antigenicidad (Mosqueda *et al.*, 2002b; Florin-Christensen *et al.*, 2002).

Florin-Christensen y colaboradores (2002) también sugieren que el gen *msa-1* es el gen ancestral que dio origen a los demás miembros arreglados en tándem, pues se encontró que este gen es el más divergente con respecto a los miembros de la familia.

El propósito de este trabajo consistió en realizar un análisis filogenético de los genes *msa-2b*, *msa-2c*, *msa-1* y el gen ribosomal de aislados mexicanos de *B. bovis*. El empleo de las secuencias podría indicar la variabilidad de los genes de la familia de antígenos de superficie.

El gen ribosomal fungió como marcador evolutivo, los genes de la familia *vmsa* pueden ser indicativos de mutaciones recientes por la variabilidad antigénica, en contraste con el gen ribosomal, que es muy antiguo y conservado.

### **Justificación:**

La Babesiosis bovina es una enfermedad con distribución mundial, en África, Asia, Australia, Centro América y América del Sur. Causa cuantiosas pérdidas económicas y se estima que el impacto económico de enfermedades como Babesiosis y Anaplasmosis ascienden entre 15.9; 6.9; 6.2; 2.8; y 22 millones de dólares al año, respectivamente en estas regiones (Lew *et al.*, 2005).

Las medidas de control que se tienen no son suficientes, por lo que es imperante formular medidas de control para alentar el avance y mejoramiento de la ganadería, tanto a nivel nacional, como mundial.

En nuestro país se esta trabajando en la búsqueda de medidas de control de la Babesiosis bovina, ya que esta enfermedad es la principal causa de muerte de bovinos a nivel mundial, y dada la constante recombinación de las proteínas de la superficie del merozoito, se ha dificultado la producción de vacunas para el control de ésta. Por lo tanto, es fundamental hacer investigaciones enfocadas a reconocer la variabilidad de estas proteínas a nivel regional, para acceder a vacunas protectoras para erradicar a la Babesiosis.

En la actualidad poco se sabe de la evolución de *Babesia* y de su relación filogenética en aislados de México, por lo que este trabajo estuvo enfocado a realizar un análisis filogenético de *B. bovis* utilizando los genes *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c*, y la región hipervariable de la subunidad pequeña 18S del gen ribosomal, para determinar los cambios que se han tenido a través del tiempo y poder establecer relaciones de parentesco entre los aislados de las distintas regiones endémicas para *Babesia bovis* y proponer medidas de control específicas en México.

## HIPÓTESIS:

El análisis filogenético de los genes de la familia de antígenos de superficie del merozoito y la subunidad pequeña del gen ribosomal de varios aislados de *Babesia bovis* permitirá establecer relaciones de parentesco acordes a la geografía.

## OBJETIVOS:

Objetivo General:

Establecer relaciones de parentesco entre aislados mexicanos de *Babesia bovis* mediante análisis filogenético de la familia de antígenos de superficie del merozoito y la subunidad pequeña del gen ribosomal.

Objetivos Particulares:

- Amplificar y clonar el gen *msa-2c*, la región variable del gen *msa-2b* y la región hipervariable (V4) de la subunidad pequeña 18s del gen ribosomal de *Babesia bovis* de 13 aislados mexicanos.

- Editar y determinar el grado de conservación de las secuencias obtenidas de los amplicones de los genes *msa-2c*, *msa-2b* y *ssrRNA*, de *Babesia bovis* de 13 aislados mexicanos.

- Analizar filogenéticamente los aislados mexicanos de *B. bovis* utilizando los genes *msa-2b*, *msa-2c*, *msa-1*, *ssrRNA* y otras secuencias antes reportadas.

## MATERIAL Y EQUIPO:

### Equipo:

Agitador de matraces Marca Lab Line, Modelo 258  
Balanza Marca OHAUS Analytical Standard, Modelo AS200  
Baño María Marca Boekel, Modelo 148005  
Cámara de Electroforesis Marca Bio Rad, Modelo Mini Sub<sup>R</sup> Cell GT  
Campana de extracción de acero inoxidable Marca Sola SB.  
Campana de flujo laminar Marca MCA VECO  
Centrífuga de Microhematocrito Marca Solbat, Modelo M-600.  
Centrífuga Marca International Equipment Company, Modelo Centra MP4R.  
Congelador Vertical Marca Nieto, Modelo CVC-15.  
Espectrofotómetro Marca Bio Rad, Modelo Smart spec<sup>TM</sup> 3000.  
Fuente de poder Marca Bio Rad, Modelo Power Pac 300.  
Incubadora con CO<sub>2</sub>, Marca Lab-line.  
Microcentrífuga Marca Eppendorf, Modelo 5415 C.  
Microcentrífuga Marca Sol-Bat, Modelo M-600.  
Microcentrífuga Marca Jouan, Modelo BR4i.  
Microscopio Óptico Marca Carl Zeiss, Modelo Axiostar plus 1169-149.  
Potenciometro Marca Jenco Electronics Meter, Modelo 671p.  
Refrigerador Vertical Marca Mabe, Modelo 5G11ULM.  
Termociclador Marca Bio Rad, Modelo MyCycler<sup>TM</sup> thermal Cycler.  
Termociclador Marca Bio Rad, Modelo ICycler 96 well reaction module.  
Transiluminador UV Marca Bio Rad, Modelo 2000.

**Material:**

Asas bacteriológicas Marca Sigma Aldrich Cat. 27230JB

Cajas de Petri estériles Marca SyM Laboratorios de 100 x 15 MM

Guantes de látex. Marca: Titán. No. Cat. 1315.30

Micropipeta Marca:Termo Labsystems Modelo U06059 4500 de 0.2- 2  $\mu$ l.

Micropipeta Marca:Termo Labsystems Modelo U06059 4500 de 20-200  $\mu$ l.

Micropipeta Marca:Termo Labsystems Modelo U06059 4500 de 2-20  $\mu$ l.

Micropipeta Marca:Termo Labsystems Modelo U06059 4500 de 100-1000  $\mu$ l.

Portaobjetos. Marca: Corning No. Cat. 2947 de 25X75 mm.

Puntas estériles Marca: M $\beta$ P Molecular BioProducts Modelo: REF 2140 de 10  $\mu$ l

Puntas estériles Marca: M $\beta$ P Molecular BioProducts Modelo: REF 2140 de 20  $\mu$ l

Puntas estériles Marca: M $\beta$ P Molecular BioProducts Modelo: REF 2140 de 200  $\mu$ l

Puntas estériles Marca: M $\beta$ P Molecular BioProducts Modelo: REF 2140 de 1000 $\mu$ l

Tubos capilares heparinizados. Marca: Corning.

Tubos de centrifuga Marca: Neptune Cat. 2541 de 15 ml

Tubos de centrifuga Marca: Neptune Cat. 2541 de 50 ml

Tubos de microcentrifuga Marca: Neptune Cat. 3445 de 1 ml

Tubos de microcentrifuga Marca: Neptune Cat. 3445 de 1.5 ml

Tubos de PCR Marca: M $\beta$ P Molecular BioProducts Modelo: 3414 de 0.2 ml

Tubos de Sangrado heparinizados Marca: Franklin de 6 ml

Tubos Vacutainer, Marca: BD Vacutainer<sup>®</sup> No Cat. 2000-07

## Reactivos

Colorante Giemsa, marca Merck No. de Cat. 1.09204.1000

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, Marca Invitrogen No. de Cat. 15593-049

Metanol, Marca Productos Químicos Monterrey No de Cat. 0612

Etanol Marca: Amresco No de Cat. 64-17-5

PCR Master Mix, Marca Promega No. de Cat. M7502

Agua libre de nucleasas, Marca Promega No de Cat. P119A

Marcador de peso molecular de 1Kb, Marca Fermentas No de Cat. SM1163

Buffer de carga, Marca Fermentas. No. de Cat. R0631

Agarosa, Marca Promega, No de Cat. V3125

Bromuro de Etidio, Marca Sigma, No. de Cat. E7637-1G

Kit Wizard plus Minipreps Sistema de purificación de DNA, Marca Promega No. de Cat. A7100

X- gal, Marca USB No. de Cat. 7240-9J-6

Agar, Marca Sigma No. de Cat. 043K0052

Medio LB, Marca Sigma No. de Cat. 073K0123

Kanamicina, Marca Gibco No. de Cat. 11815-032

Trizma Base, Marca Sigma No de Cat. T6066

E.D.T.A. Sal Disodica Reasol, Sigma-Aldrich

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Sigma-Aldrich. Cat L4509-250G.

Enzima *Eco RI*, Invitrogen. Cat. No. 15202-013.

Glicerol, Sigma. Cat. G2025.

Kit de clonacion Topo TA PCR 2.1 Topo<sup>®</sup> vector, Marca Invitrogen, No de Cat. 450641.

Proteinasa K Marca: Sigma No. de Cat. P2308-5MG.

## **Soluciones:**

### **Medio LB Sólido**

MEDIO LB 20 grs / 1 litro  
50 µg / mL de kanamicina  
15 grs / litro de agar  
Ajustar un pH de 7.0 – 7.5

### **Medio SOC**

Triptona	2%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

### **Medio LB Líquido**

MEDIO LB 20 grs / 1 litro  
50 µg / mL de kanamicina  
Ajustar un pH de 7.0 – 7.5

### **Buffer de extracción**

EDTA 100 mM  
Tris 10 mM  
SDS 0.5%  
pH 8

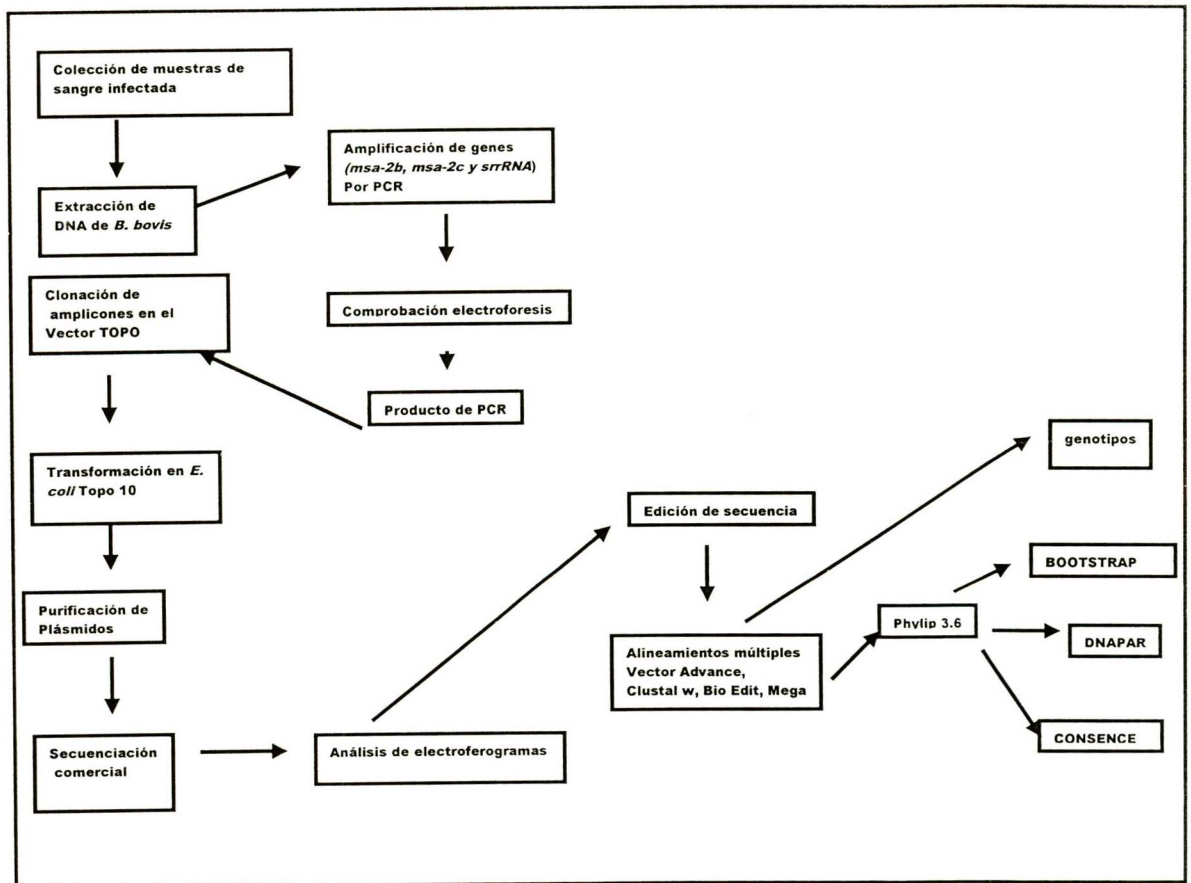
### **Buffer TAE 50X**

Tris Base 242 grs  
Acido acético glacial 57.1 mL  
EDTA 0.5 M 100ml  
pH de 8

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

La metodología se deriva de una colección de muestras de sangre infectada con el parásito, esta se clono y secuencio para dar pie al análisis filogenético *in silico*, los métodos empleados se muestran en el diagrama de la figura 2.

**Figura 2.** Esquema de los métodos empleados para la obtención y análisis de las secuencias de los genes *msa-2b*, *msa-2c* y gen *ssrRNA* de *B. bovis*.



## MÉTODOS:

### Área de estudio

Se seleccionaron regiones endémicas en donde la Babesiosis está altamente distribuida, de acuerdo con los datos de distribución del vector *B. microplus*, SENASICA del 2002 (Figura 1).

Los sitios de colecta aparecen en el mapa (Figura 2). La tabla 1 muestra todos los datos de los sitios de colecta y el número de individuos analizados. En estos sitios se obtuvo la sangre infectada de bovinos.

**Tabla 1.** Aislados procesados en este trabajo.

No.	Fecha colecta	Aislado	Ubicación y observaciones
1	1979	México	Aislado de garrapatas colectadas en rastro de la Ciudad de México. (Smith <i>et al</i> 1979)
2	1985	RAD	Clona biológica derivada de aislado México
3	1993	Quintana Roo	Chetumal, Q. Roo
4	1993	Tamaulipas 1	Soto la Marina, Tamps.
5	1996	Veracruz 1	Paso del toro, Ver.
6	1998	Tabasco	Emiliano Zapata Tab.
7	1999	Chiapas 1	Pichucalco, Chis.
8	2005	Chiapas 2	La Concordia, Chis.
9	2005	Tamaulipas 2	Aldama Tamps..
10	2005	Nayarit	Santiago Ixcuintla, Nay.
11	2005	Veracruz 2	Acayucan, Ver.
12	2006	Jalisco	Tapalpa, Jal.
13	2006	Guerrero	Cuajinicuilapan, Gro.

## **Colecta de Sangre infectada**

La obtención del material de estudio se realizó por varios métodos y en distintas temporadas

1. Se colectó sangre infectada de alguna zona endémica, la cual era analizada, y una vez positiva para *Babesia*, se congelaba en nitrógeno líquido para su posterior utilización.
2. La sangre congelada se inoculó a bovinos esplenectomizados libres de *Babesia* para la propagación y preservación del aislado.
3. Garrapatas *B. microplus* fueron colectadas en zonas endémicas, se analizaban, incubaban y se utilizaban para infestar a un bovino libre a la enfermedad para su posterior propagación

## **Procesamiento de la sangre infectada**

La sangre fresca de cada uno de los aislados fue procesada para eliminar leucocitos y dejar solo eritrocitos parasitados:

La sangre completa se centrifugó a 680xg por 10 min a 20°C. El sobrenadante se retiró, y con solución buffer amortiguadora de fosfatos (PBS) se resuspendió la pastilla de eritrocitos, estos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

## **Extracción de DNA de *Babesia bovis*:**

A los eritrocitos enriquecidos (1ml) se les adicionó 10 ml de buffer de extracción (EDTA 100mM, TRIS 10 mM SDS 0.5% a pH 8.0), se homogenizaron, y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente.

Se les agregó proteinasa K, incubándolos a 45°C por toda la noche. Posteriormente, se añadió 3 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitaron manualmente por 10 min

Se centrifugaron a 510 xg por 10 min a 15°C y se recuperó el sobrenadante. Se realizaron varios lavados, hasta que la interfase ya no contenía la capa proteica. Posteriormente, se adicionó 3 volúmenes de etanol frío al 100%, y se dejó precipitar toda la noche a -20°C.

Al día siguiente, se centrifugó a 4°C por 60 min a 680xg. El tubo se decantó y la pastilla se lavó con 500  $\mu$ l de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó a 1700xg por 10 min a 4°C.

Se decantó y dejó secar completamente, una vez seca la pastilla, se resuspendió con agua libre de DNAsas y se almacenó a -20°C (Sambrook *et al.*, 1989).

### Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA se realizó con un espectrofotómetro a 260 nm y a 280 nm para determinar la pureza en dilución de 1:100.

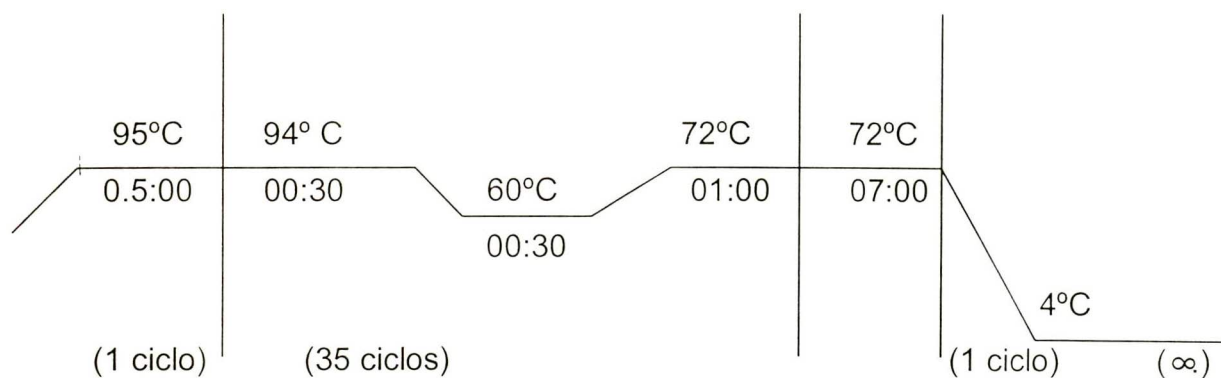
### Amplificación de los genes:

Para la amplificación de las secuencias de los genes *msa-2b*, *msa-2c* y *ssrRNA* se diseñaron oligonucleótidos o iniciadores específicos, con el programa VECTOR NTI ADVANCE™ (Invitrogen):

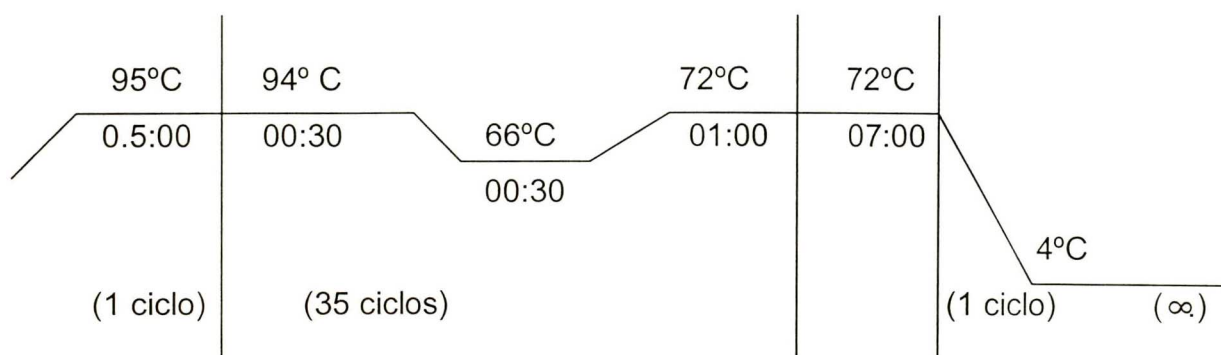
**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes.

Gen	Amplicon	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
<i>msa-2b</i>	Región variable	5'-GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTT-3'	5'-GTTATTAATAAAGCAGAGAGAACGA-3'
<i>msa-2c</i>	Gen completo	5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATA-3'	5'-AAATGCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGTG-3'
<i>ssrRNA</i>	Región hipervariable	5'-GGAGGTAGTGACAAGAAATAC-3'	5'-TTTCAGACTTGCGACCATACTCC-3'

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un programa diseñado específicamente, mostrado en las figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Protocolo de ciclado para los genes *msa-2b* y el gen *ssrRNA*.



**Figura 4.** Protocolo de ciclado para el gen *msa-2c*.

Posteriormente, el amplificado de los genes se visualizó en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, con ayuda de un transiluminador.

### Clonación de genes:

La clonación de los genes se llevó a cabo según el instructivo del kit para clonación, Topo TA Cloning (PCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>) Invitrogen. La Topoisomerasa I del vector une covalentemente los extremos T del vector con los extremos A del amplicón.

## **Transformación**

La transformación química se llevó a cabo según indicaciones en bacterias *E. coli* TOP 10 del kit One Shot® invitrogen. Se utilizaron cuatro placas con agar LB, kanamicina y X-gal por aislado, se plaquéaron con 10µl, 30µl, 50µl y 180 µl, respectivamente, de bacterias transformadas y se incubaron toda la noche a 37°C.

## **Cultivo de bacterias transformadas**

Posteriormente, se seleccionaron 8 colonias transformadas para la realización de cultivos en medio de cultivo LB líquido con kanamicina y para una resiembra de estas colonias seleccionadas. Se incubaron toda la noche a 37°C.

## **Purificación del DNA clonado:**

La purificación del DNA clonado se realizó según protocolo de lisis alcalina del Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). De las 8 colonias seleccionadas, se purificaron plásmidos de 4 clonas por cada aislado.

## **Cuantificación de DNA plasmídico**

Posteriormente se realizó una dilución 1:100 para cuantificar la concentración del DNA plasmídico en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 260 nm, en un espectrofotómetro Bio Rad, Modelo Smart spec™ 3000.

## **Digestión enzimática de DNA**

Para verificar la existencia del inserto, se realizó una digestión enzimática con la enzima *Eco* RI, por 2 - 3 horas en baño maría a 37°C.

Posteriormente en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio, se corrieron las muestras y se visualizaron con ayuda de un transiluminador (Sambrook *et al.*, 1989).

## **Secuenciación**

Se realizó la secuenciación automatizada, con los iniciadores incluidos en el kit pCR4 TOPO Invitrogen.

Para este método resultó esencial disponer de un molde (una cadena doble de DNA Plasmídico), un iniciador, dNTPs y ddNTPs, con el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. El proceso de secuenciación fue realizado de forma comercial por el IBT de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

## **Edición de secuencias:**

Se obtuvieron las secuencias de los productos génicos de los genes *msa-2b*, *msa-c* y del gen *ssrRNA*.

Una vez obtenidas las secuencias, se revisó el electroferograma con el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor.

La edición de las secuencias fue por medio del programa VECTOR NTI ADVANCE™ (Invitrogen). Se buscó obtener sólo el inserto de interés, por lo que se permitió eliminar las regiones del vector.

## **Alineamientos múltiples de secuencias:**

Una vez editadas las secuencias se realizaron los alineamientos múltiples para cada uno de los genes, utilizando los programas VECTOR NTI ADVANCE™ basado en el algoritmo Clustal W (Invitrogen); Bio Edit Sequence Alignment Editor; Mega 3.1 y Clustal W 1.7. (Thompson *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1994).

Posteriormente, se obtuvieron y adicionaron secuencias disponibles en el servidor internacional del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para llevar a cabo el alineamiento múltiple con las secuencias obtenidas en este trabajo y las ya antes reportadas, con el fin de ampliar el número de muestras para un análisis más completo.

Debido a las diferencias en longitud de las secuencias de los genes *msa-2b* y *msa-1* se realizaron correcciones manuales, por lo que se respetaron e incluyeron huecos dentro de la secuencia, verificando que el marco de lectura abierta de la proteína fuere el correcto, y no tener secuencias de paro incorrectas.

### **Análisis y búsqueda de Genotipos:**

Con el objeto de identificar elementos importantes en las secuencias (repeticiones, similitudes, etc.) que permitiesen definir grupos, se llevó a cabo el análisis de las secuencias, es decir se buscaron genotipos, pues hasta hoy en *Babesia bovis* no existen reportes para definirlos.

Para llevar a cabo el análisis de genotipos, se buscaron posiciones de aminoácidos para los genes *msa-2b*, *msa-1* y *msa-2c* y en nucleótidos para el gen ribosomal, en los cuales la ausencia o presencia o cambio de estos distingan grupos filogenéticamente relacionados (de la Fuente *et al.*, 2003).

### **Análisis Filogenético:**

#### Construcción de filogramas

La construcción y el análisis de filogramas se realizó para cada uno de los genes por separado con el propósito de establecer relaciones filogenéticas de los genes *msa-2b*, *msa-2c*, *msa-1* y del gen *ssrRNA*. Se construyeron diferentes árboles filogenéticos con cada uno de los métodos a construir por distintos métodos (Distancias, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud (Nei, 1991), con el fin de obtener el más adecuado a partir de las secuencias nucleotídicas y de secuencias de aminoácidos para cada uno de los genes.

Se produjeron conjuntos múltiples de datos, empleando el método de remuestreo (bootstrap) provisto por el programa BOOTSTRAP (Felsenstein, 1985) del paquete Phylip 3.6 (Phylogeny Inference Package) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

El análisis filogenético se realizó con los programas DNADIS, DNAPARS y DNAML, realizando un consenso de las filogenias restantes por medio del programa CONCENSE.

Finalmente, se decidió como el método más adecuado, el método de máxima parsimonia, ya que la topología de los árboles era muy similar.

Se obtuvieron filogramas para cada uno de los genes (*msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c* y *ssrRNA*) mexicanos secuenciados, y posteriormente con secuencias reportadas de otras partes del mundo obtenidas de la base de datos GenBank.

Los árboles se dibujaron mediante el programa treeview 1.5 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

### **Definición de grupo externo para el Filograma**

Por las características de los genes de superficie anclados a la membrana del parásito (*msa-1*, *msa2b* y *msa-2c*), y con el objeto de distinguir las relaciones de parentesco se buscó un grupo externo en otro gen pero del mismo parásito, que reuniera las características necesarias para poder compararlo, es decir, deben tener una grado de homología necesaria para poder alinearse.

El gen ribosomal *ssrRNA* se alineó con un gen homólogo de otra especie, dada su alta conservación y el propósito de tomarlo como marcador evolutivo.

### **Análisis *in silico* de proteínas:**

La búsqueda de dominios en los productos de los genes se realizó en la base de datos de dominios de proteínas del servidor PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>).

El perfil de hidrofobicidad se realizó mediante el programa TMPRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)).

## RESULTADOS:

### Obtención de DNA de *Babesia bovis* de 13 aislados mexicanos

Una vez realizada la extracción del ADN de *B. bovis* a partir de sangre infectada de cada uno de los 13 aislados mexicanos, éste se cuantificó en espectrofotómetro a 260nm. La concentración de ADN obtenida de cada aislado se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Concentración del DNA de los 13 aislados mexicanos.

Aislado	ng/ $\mu$ l
México	10
RAD	80
Quintana Roo	88
Tamaulipas 1	20
Veracruz 1	50
Tabasco	635
Chiapas 1	175
Chiapas 2	60
Tamaulipas 2	140
Nayarit	28
Veracruz 2	160
Jalisco	36
Guerrero	280

Una vez cuantificado el DNA, se evaluó la integridad y pureza del mismo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 4). Únicamente las muestras de DNA íntegro al análisis mediante la visualización en gel de agarosa fueron utilizadas en los experimentos posteriores.

### **Amplificación de la región variable del gen *msa-2b* de *Babesia bovis* en 13 aislados Mexicanos**

El amplicón de la región variable del gen *msa-2b* se obtuvo mediante la técnica de PCR a partir de oligonucleótidos específicos. Al visualizar el producto en geles de agarosa se observó un amplicón de 684 pb para cada uno de los 13 aislados (Figura 6). Este fragmento coincidió con el tamaño esperado utilizando estos oligonucleótidos.

### **Amplificación de la región hipervariable del gen ribosomal de *Babesia bovis* en 13 aislados Mexicanos**

La amplificación de esta región hipervariable se obtuvo mediante la técnica de PCR, con el uso de oligonucleótidos específicos (Tabla 2) con los que se obtuvo un amplicón de 604 pb, en cada uno de los 13 aislados (Figura 7). Este fragmento coincidió con el tamaño esperado utilizando estos oligonucleótidos.

### **Amplificación del gen *msa-2c* de *Babesia bovis* en 13 aislados Mexicanos**

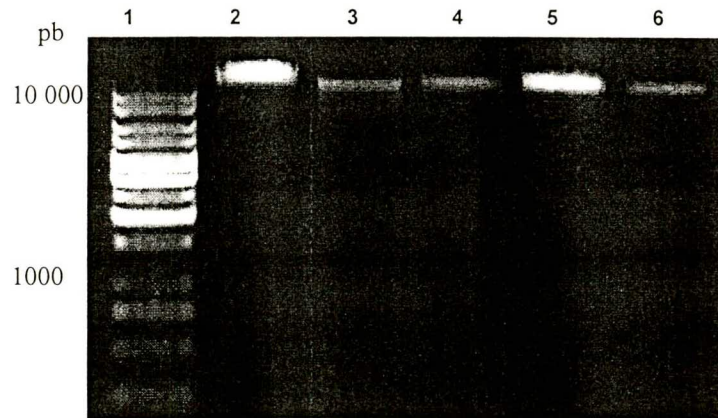
La amplificación del gen completo para *msa-2c* se realizó mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 2). Se obtuvo un amplicón de 797 pb en cada uno de los aislados (Figura 8). Este fragmento coincidió con el tamaño esperado utilizando estos oligonucleótidos.

### **Clonación de los genes *msa-2b*, *msa-2c* y ribosomal de 13 aislados de *Babesia bovis***

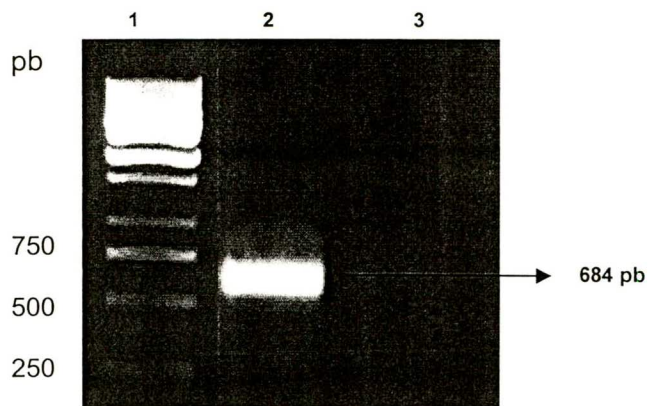
La clonación de los amplicones de los genes *msa-2b*, *msa-2c* y ribosomal se realizó mediante el protocolo descrito previamente (Metodología).

La clonación se realizó para cada uno de los trece aislados, de los cuales después de realizar un análisis de restricción enzimática con la enzima *Eco RI*, se constataba la presencia del inserto, como se muestra en las figuras 9, 10 y 11. En cada una de las figuras se muestra una banda de 3.9 kb, que corresponde al vector y otra de 797 pb que corresponde al gen, para el gen *msa2c*, 604 pb para el gen *ssrRNA* y de aproximadamente 684 pb para el gen *msa-2b*.

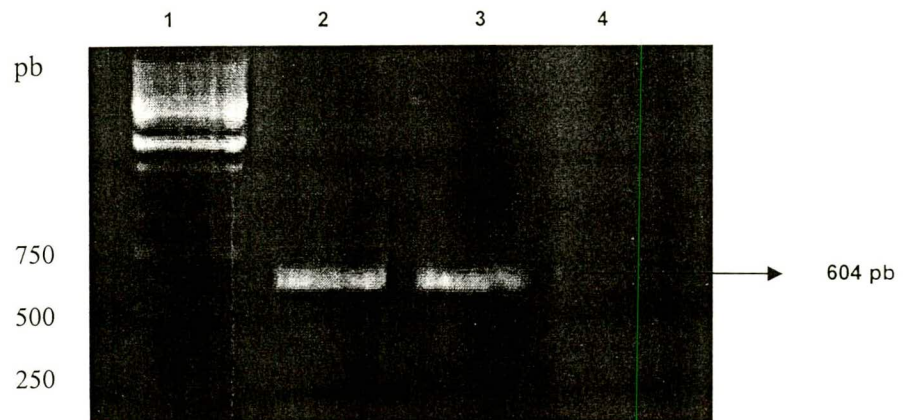
**Figuras geles:**



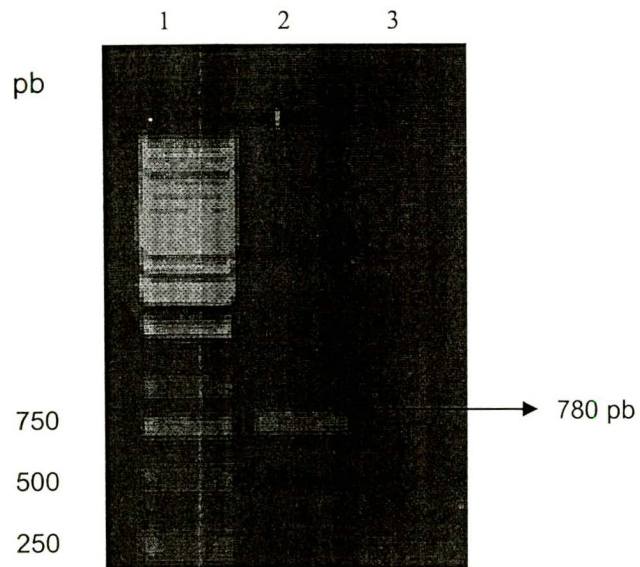
**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Se muestra el DNA total de *Babesia bovis*, para distintos aislados mexicanos. Carril 1: Marcador de 1 kb; 2: DNA del aislado Tabasco; 3: DNA del aislado Chipas; 4: DNA del aislado Guerrero; 5: DNA del aislado Chetumal.



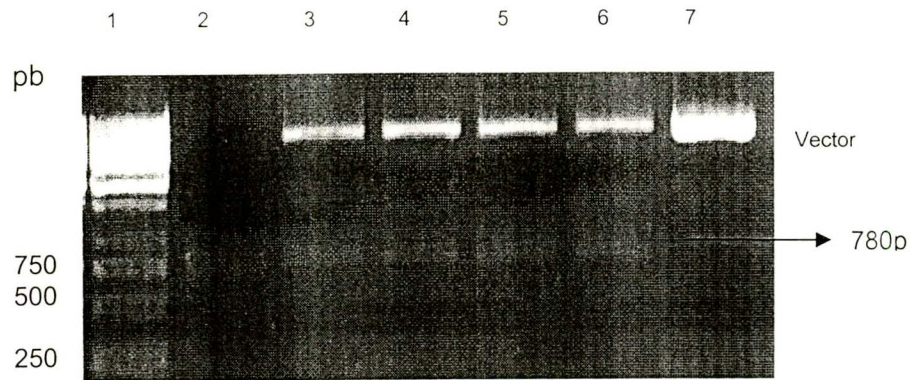
**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Producto de PCR de la región variable de gen *msa-2b* de *Babesia bovis* del aislado Veracruz 2. El amplicón esperado es de 684 pb. Carril 1: Marcador de 1 kb; 2: amplicón del aislado Veracruz; 3: control negativo.



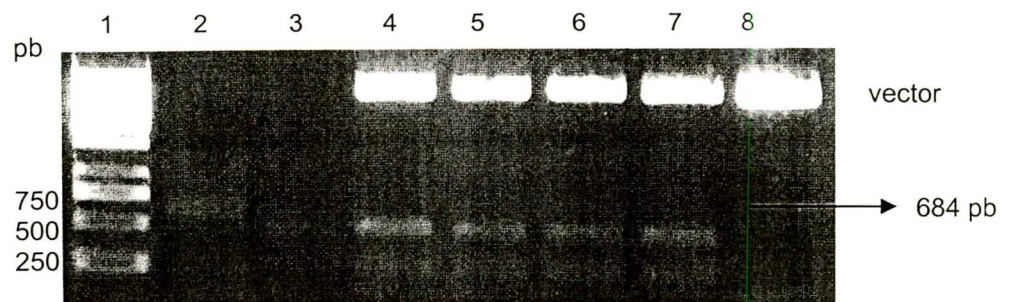
**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, amplificación de la región hipervariable del gen ribosomal de *Babesia bovis* obtenido mediante la técnica de PCR. Carril 1: Marcador de 1 kb; 2: amplicon del asilado Chiapas 1; 3: Amplicón del aislado Veracruz 1; 4: control negativo.



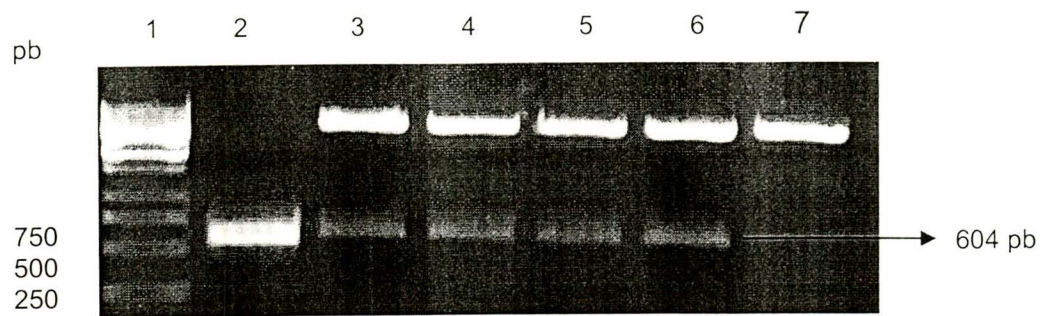
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, amplificación del gen msa-2c de *Babesia bovis*, obtenido mediante la técnica de PCR. Carril 1: Marcador de 1 kb; 2: amplicon del asilado Quintana Roo; 3: control negativo.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Digestión enzimática del gen *msa-2c*, para el aislado Tamaulipas 2. (carril 1) Marcador 1 kb; (carril 2) producto de PCR aislado Tamaulipas 2; (carril 3) DNA plasmídico clona 1; (carril 4) DNA plasmídico clona 2; (carril 5) DNA plasmídico clona 3; (carril 6) DNA plasmídico clona 4; (carril 7) control negativo vector digerido.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Digestión enzimática del gen *msa-2b* para el aislado Chetumal. (carril 1) Marcador 1 kb; (carril 2); producto de PCR del aislado Chetumal para el gen *msa-2c*; (carril 3) producto de PCR digerido; (carril 4) DNA plasmídico clona 3; (carril 5) DNA plasmídico clona 4; (carril 6) DNA plasmídico clona 6; (carril 7) DNA plasmídico clona 8; (carril 8) control negativo vector digerido



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Digestión enzimática del gen *ssrRNA* del aislado Chiapas 2 (Carril 1) Marcador 1 kb; (carril 2) producto de PCR para el aislado Chiapas 2: (carril 3) DNA plasmídico clona 1; (carril 4) DNA plasmídico clona 2; (carril 5) DNA plasmídico clona 3; (carril 6) DNA plasmídico clona 4; (carril 7) Control negativo vector digerido.

### **Alineamiento de nucleótidos:**

A partir de las secuencias obtenidas de los 13 aislados mexicanos y de las secuencias obtenidas en la base de datos GenBank, se llevaron a cabo alineamientos múltiples para cada uno de los genes (*msa-1*, *msa-2c*, *msa-2b* y *ssrRNA*) a través de programas descritos en metodología.

El alineamiento múltiple de las secuencias del gen *msa-2b* muestra una identidad consenso del 73.5%; en este alineamiento se detectaron algunos gaps o huecos, debido a que la molécula tiene diferentes longitudes.

Se detectaron tres grupos, caracterizados por la ausencia o presencia de gaps, como se observa en la figura 12, los mismos que se conservan en el árbol filogenético, como se observa más adelante.

El grupo I, formado por Tabasco, RAD, Chiapas 1 y Mo7 (aislado de referencia) no presenta deleciones.

El grupo II, formado por Jalisco, México y Veracruz 2 presenta cuatro deleciones ubicadas en las posiciones 485, 585, 602 y 617 con una longitud de 21 pb, 9pb, 3pb y 3pb respectivamente (Figura 12).

El grupo III, formado por Quintana Roo, Tamaulipas 2, Veracruz 1, Chiapas 2, Guerrero, Nayarit y Tamaulipas 1 presenta 9 deleciones en la secuencia, ubicadas en la posición 475, 484, 535, 548, 566, 582, 589, 602 y 617, con una longitud de 4 pb, 35 pb, 2 pb, 13 pb, 2 pb, 4 pb, 9 pb, 3 pb, y 3pb respectivamente.

El alineamiento múltiple de las secuencias para el gen *msa-2c* permitió determinar tres grupos y la variabilidad de sus secuencias. El grupo 1 lo integra Chiapas 1, Nayarit, Tamaulipas 2, Quintana Roo, Veracruz y Mo7 (grupo de referencia) estos aislados comparten una identidad consenso del 98% con 32 posiciones de cambio comparada con el aislado de referencia Mo7 (Figura 13).

El grupo II, formado por Guerrero, Veracruz y Jalisco comparten el 92.1% de identidad entre ellos, con 67 posiciones en donde se encuentran diferencias, comparado con el aislado Mo7 de referencia (Figura 13).

El grupo III, integrado por los aislados Chiapas 2, Tamaulipas 1, Tabasco, RAD, y México, presenta 96.4 % de identidad comparado con el aislado Mo7 con 31 posiciones variables dentro del alineamiento (Figura 13).

El alineamiento de las secuencias del gen ribosomal (*ssrRNA*) permitió determinar el grado de conservación de éste, el cual presenta una región hipervariable bien delimitada de aproximadamente 50pb (Figura 14).

La región hipervariable es idéntica entre los aislados RAD, Tamaulipas 1, Guerrero, Jalisco, con respecto al aislado de referencia BBOV2 proveniente del sur de África, Chiapas 1 y Veracruz, son idénticos entre ellos, solo difieren por 2 bases en la posición 208 y 209.

El aislado Nayarit difiere por un cambio de base en la posición 199, en cambio el aislado Chiapas 2 también difiere solo por un nucleótido en la posición 192. El aislado México tiene 15 sustituciones, al igual que el aislado Tabasco, pero difieren en algunas posiciones.

Los aislados de Quintana Roo, Tamaulipas 2 y Veracruz son los menos conservados teniendo 19, 19 y 20 sustituciones, respectivamente, comparado con la región hipervariable del aislado BBOV2 (Figura 14).

## Alineamiento de aminoácidos

El alineamiento múltiple de las proteínas predichas se realizó a partir de las secuencias del gen *msa-2c* de los distintos aislados. Este permitió identificar las sustituciones de aminoácidos en las proteínas predichas, derivados de la sustitución no sinónima de nucleótidos.

Al analizar el grado de identidad de los genes *msa-2b* y *msa-2c* se observó que cuando los alineamientos de los aislados son comparados a nivel nucleotídico, la molécula es más conservada que cuando son comparados los alineamientos de aminoácidos, debido a que la mayoría de los cambios de nucleótidos se traduce en un cambio de aminoácido (Tablas 4 y 5).

El alineamiento múltiple de la proteína predicha a partir del gen *msa-2b*, indica una serie de deleciones y regiones conservadas, identificadas con anterioridad en Australia.

El aislado RAD, presenta los mismos porcentajes de identidad en nucleótidos que en aminoácidos, al igual que el aislado Chiapas 1. El resto de los aislados presentan varias sustituciones, en promedio difieren en un 10% (Tabla 4). En total se encontraron 83 posiciones en donde existe al menos un cambio de aminoácido. En esta región, la proteína es más variable, la cual coincide con la región hidrofílica (Tabla 9 y Figura 17).

El alineamiento múltiple de la proteína predicha del gen *msa-2c* presenta el mismo porcentaje de conservación en nucleótidos y aminoácidos. Esta proteína tiene un grado de conservación más alto.

En total se observan 50 posiciones en donde por lo menos existe un cambio. Las regiones de mayor sustitución aminoacídica se exponen en la tabla 10. Estas sustituciones coinciden con la región hidrofóbica de la proteína.

**Tabla 4.** Tabla de identidad en porcentaje de nucleótidos y aminoácidos para *msa-2b* con respecto a la cepa de referencia mo7.

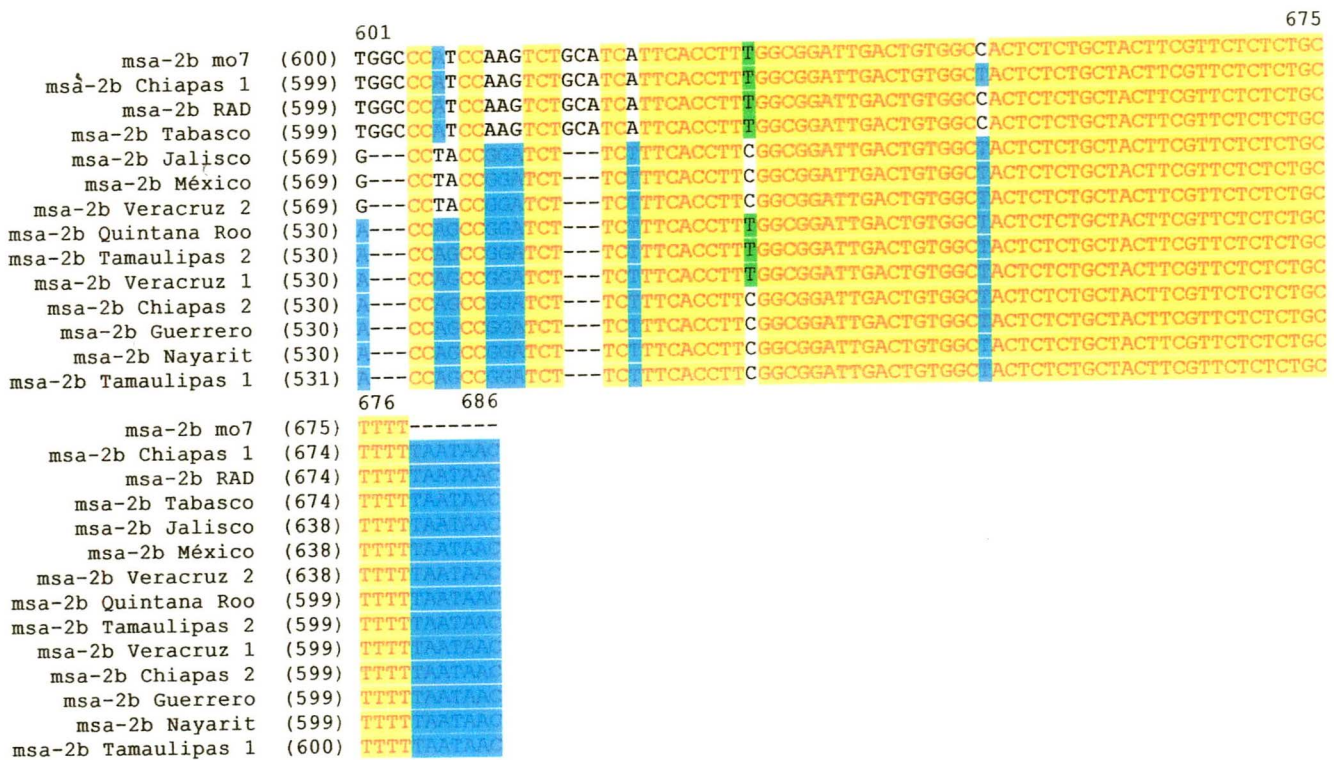
Aislado	Nucleótidos (%)	Aminoácidos (%)
México MSA-2b	80.3	70.4
RAD	98.2	98.2
Veracruz 2	80.3	70.4
Tamaulipas 2	75.8	67.1
Guerrero	75.3	66.2
Chiapas 2	75.4	62.2
Chiapas 1	98.1	98.2
Jalisco	80.4	71.3
Tabasco	98.0	97.4
Veracruz 1	75.8	67.1
Quintana Roo	75.8	61.1
Tamaulipas 1	75.1	97.4
Nayarit	75.4	66.7

**Tabla 5.** Identidad en porcentaje de nucleótidos y aminoácidos para *msa-2c*, con respecto a la cepa de referencia Mo7.

Aislado	Nucleótidos (%)	Aminoácidos (%)
México MSA-2c	97.0	94.0
RAD	97.1	94.3
Veracruz 2	96.9	94.0
Tamaulipas 2	97.5	94.7
Guerrero	93.2	92.1
Chiapas 2	97.7	95.8
Chiapas 1	100	100
Jalisco	94.0	90.9
Tabasco	97.1	94.3
Veracruz 1	94.2	91.3
Quintana Roo	97.2	95.1
Tamaulipas 1	97.0	94.3
Nayarit	97.4	94.3

		1		75
msa-2b mo7	(1)	A	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Chiapas 1	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b RAD	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Tabasco	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Jalisco	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b México	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Veracruz 2	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Quintana Roo	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Tamaulipas 2	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Veracruz 1	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Chiapas 2	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Guerrero	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Nayarit	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
msa-2b Tamaulipas 1	(1)	-	GTGTCAATATGCCTTCGGATTGTTCTCGTGATGCTCTTAAAGCTTTAAAAGACATTTTAGTTGTTCTTAAAGAA	
		76		150
msa-2b mo7	(76)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Chiapas 1	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b RAD	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Tabasco	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Jalisco	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b México	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Veracruz 2	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Quintana Roo	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Tamaulipas 2	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Veracruz 1	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Chiapas 2	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Guerrero	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Nayarit	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
msa-2b Tamaulipas 1	(75)	G	AAATCCATTGAAACATCCTTATTTGATAAGAGGTACTTAGAGAATTA	GAAATTCAGGACCAAGATCAGAT
		151		225
msa-2b mo7	(151)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Chiapas 1	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b RAD	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Tabasco	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Jalisco	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b México	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Veracruz 2	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Quintana Roo	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Tamaulipas 2	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Veracruz 1	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Chiapas 2	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Guerrero	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Nayarit	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
msa-2b Tamaulipas 1	(150)	T	TCAAATCTCTTCTTGAAAGAGTACCC	TTAATAAAAA
		226		300
msa-2b mo7	(226)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Chiapas 1	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b RAD	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Tabasco	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Jalisco	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b México	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Veracruz 2	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Quintana Roo	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Tamaulipas 2	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Veracruz 1	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Chiapas 2	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Guerrero	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Nayarit	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC
msa-2b Tamaulipas 1	(225)	C	CTCAACGTTTGTTCGGGGATAA	ACGGAGAGTGACTAAATATTACAAAAAGCATATATC





**Figura 12.** Alineamiento múltiple de la región variable del gen *msa-2b*. Se muestran las regiones de nucleótidos completamente conservadas, en letra roja y fondo amarillo; en letra azul con fondo azul turquesa, nucleótidos consenso; letras negras con fondo verde, nucleótidos conservados con una presencia mayor al 50%; letra negra sin fondo, nucleótidos que no tienen similitud; guión, hueco o gap. La identidad determinada fue de 73.5%.

msa-2c mo7 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Chiapas 1 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Nayarit (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Tamaulipas 2 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Quintana Roo (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Veracruz 2 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Chiapas 2 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Guerrero (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Jalisco (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Veracruz 1 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c México (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c RAD (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Tabasco (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG  
msa-2c Tamaulipas 1 (1) ATGGTGTCTTTTAACATAATAACCGT GCATTCTGCTCCATCCTTTTCACTTATACAT TGGCATCTCCACAAGAG

msa-2c mo7 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Chiapas 1 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Nayarit (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Tamaulipas 2 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Quintana Roo (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Veracruz 2 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Chiapas 2 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Guerrero (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Jalisco (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Veracruz 1 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c México (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c RAD (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Tabasco (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG  
msa-2c Tamaulipas 1 (76) AAGACTGTACCAACTAAACAGGTGAATGGGAGT ATTTACTGTTTGATGATATGAAATGTTTATGATGTATG

msa-2c mo7 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Chiapas 1 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Nayarit (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Tamaulipas 2 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Quintana Roo (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Veracruz 2 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Chiapas 2 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Guerrero (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Jalisco (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Veracruz 1 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c México (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c RAD (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Tabasco (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG  
msa-2c Tamaulipas 1 (151) CGCAGCATTGATGAAAGCATGTTGAAAAG ATTCTTGAGAAGAATTTGAGGCTGTTGGCATGGAAGCTACATCG

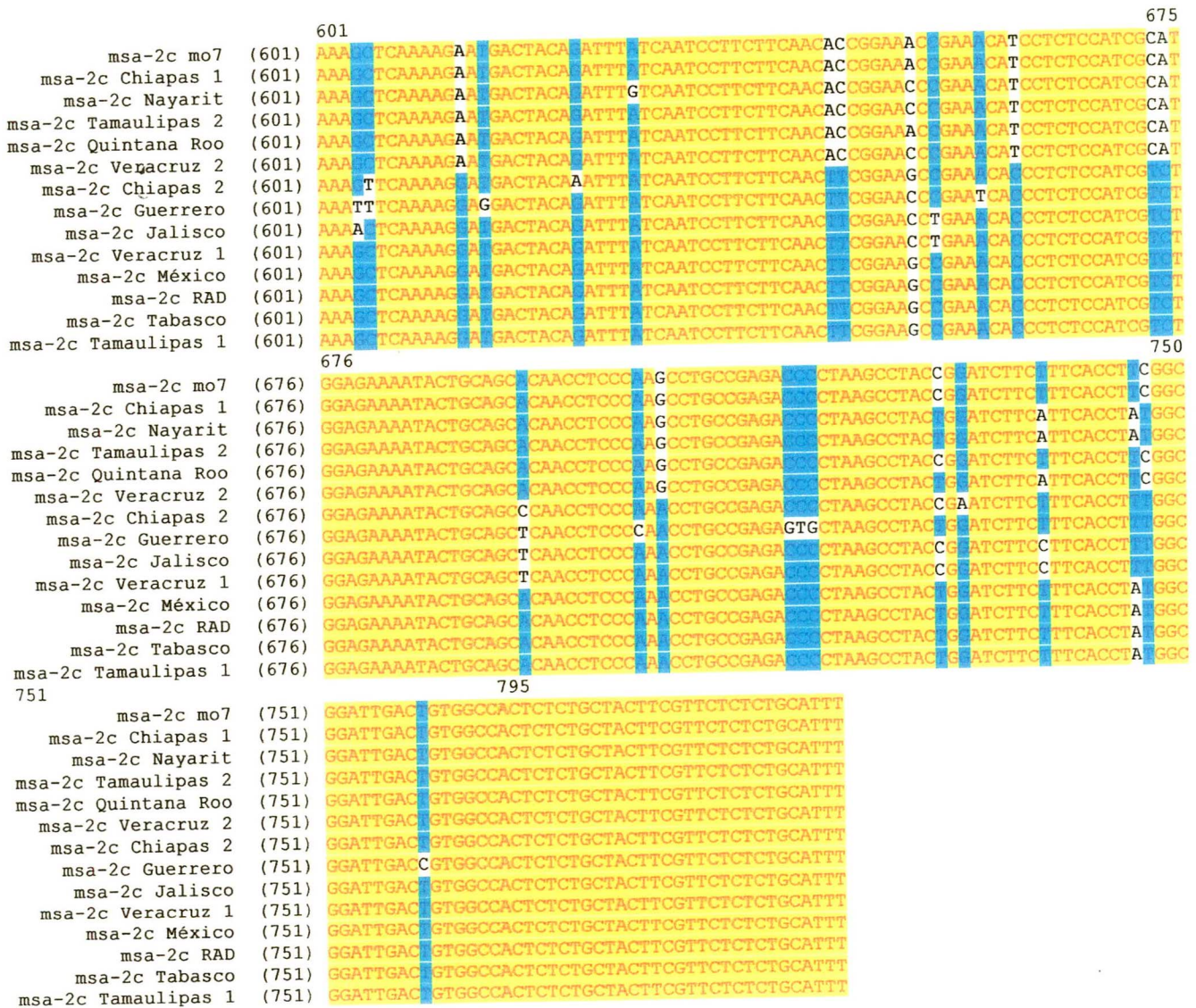
msa-2c mo7 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Chiapas 1 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Nayarit (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Tamaulipas 2 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Quintana Roo (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Veracruz 2 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Chiapas 2 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Guerrero (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Jalisco (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Veracruz 1 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c México (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c RAD (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Tabasco (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC  
msa-2c Tamaulipas 1 (226) GCTACTAAA CACATGACGCTCTG AGGCTGTAAAACAATTAATCAAACCGATGCACCTTTCAACACATCGGAC

msa-2c mo7 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Chiapas 1 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Nayarit (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Tamaulipas 2 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Quintana Roo (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Veracruz 2 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Chiapas 2 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Guerrero (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Jalisco (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Veracruz 1 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c México (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c RAD (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Tabasco (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA  
 msa-2c Tamaulipas 1 (301) TTTGACACACTCGATTGGATATCTCTCGGCAATTAATGAAGAGCTGTAACTTCTATTGAGGCAATA

msa-2c mo7 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Chiapas 1 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Nayarit (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Tamaulipas 2 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Quintana Roo (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Veracruz 2 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Chiapas 2 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Guerrero (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Jalisco (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Veracruz 1 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c México (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c RAD (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Tabasco (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC  
 msa-2c Tamaulipas 1 (376) TATGGTATGGAAATCATAATTGAAAAAACCCTCTTTGTGGGAGGTAAATTTCCATATTGGAC

msa-2c mo7 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Chiapas 1 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Nayarit (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Tamaulipas 2 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Quintana Roo (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Veracruz 2 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Chiapas 2 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Guerrero (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Jalisco (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Veracruz 1 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c México (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c RAD (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Tabasco (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC  
 msa-2c Tamaulipas 1 (451) ACCGACTTGAGACATAATACGGTAATATTTACGATGACAAAGATATAATAAGGACAAATTAGCAAC

msa-2c mo7 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Chiapas 1 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Nayarit (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Tamaulipas 2 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Quintana Roo (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Veracruz 2 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Chiapas 2 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Guerrero (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Jalisco (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Veracruz 1 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c México (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c RAD (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Tabasco (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG  
 msa-2c Tamaulipas 1 (526) CTATACAAAGATATCACTAATTCTCGTTTGTATCGCATGGAGGACTTAGAAAATTCGAAACAAGG



**Figura 13.** Alineamiento múltiple del gen *msa-2c*. Se muestran las regiones de nucleótidos completamente conservadas, en letra roja y fondo amarillo; en letra azul con fondo azul turquesa, nucleótidos consenso; letras negras con fondo verde, nucleótidos conservados con una presencia mayor al 50%; letra negra sin fondo, nucleótidos que no tienen similitud; guión, hueco o gap. La identidad determinada fue de 88.7%.

Rib BBOV2 m\* (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal RAD (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Chiapas 1 (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Veracruz (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal México (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Quintana Roo (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Tabasco (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Tamaulipas 2 (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Veracruz 2 (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Chiapas 2 (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Guerrero (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Jalisco (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Nayarit (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC  
 Ribosomal Tamaulipas 1 (1) GGAGGTAGTGACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGACCTTCAACCTCGCCC

76 150

Rib BBOV2 m\* (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal RAD (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Chiapas 1 (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Veracruz (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal México (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Quintana Roo (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Tabasco (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Tamaulipas 2 (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Veracruz 2 (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Chiapas 2 (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Guerrero (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Jalisco (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Nayarit (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT  
 Ribosomal Tamaulipas 1 (76) GAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGT

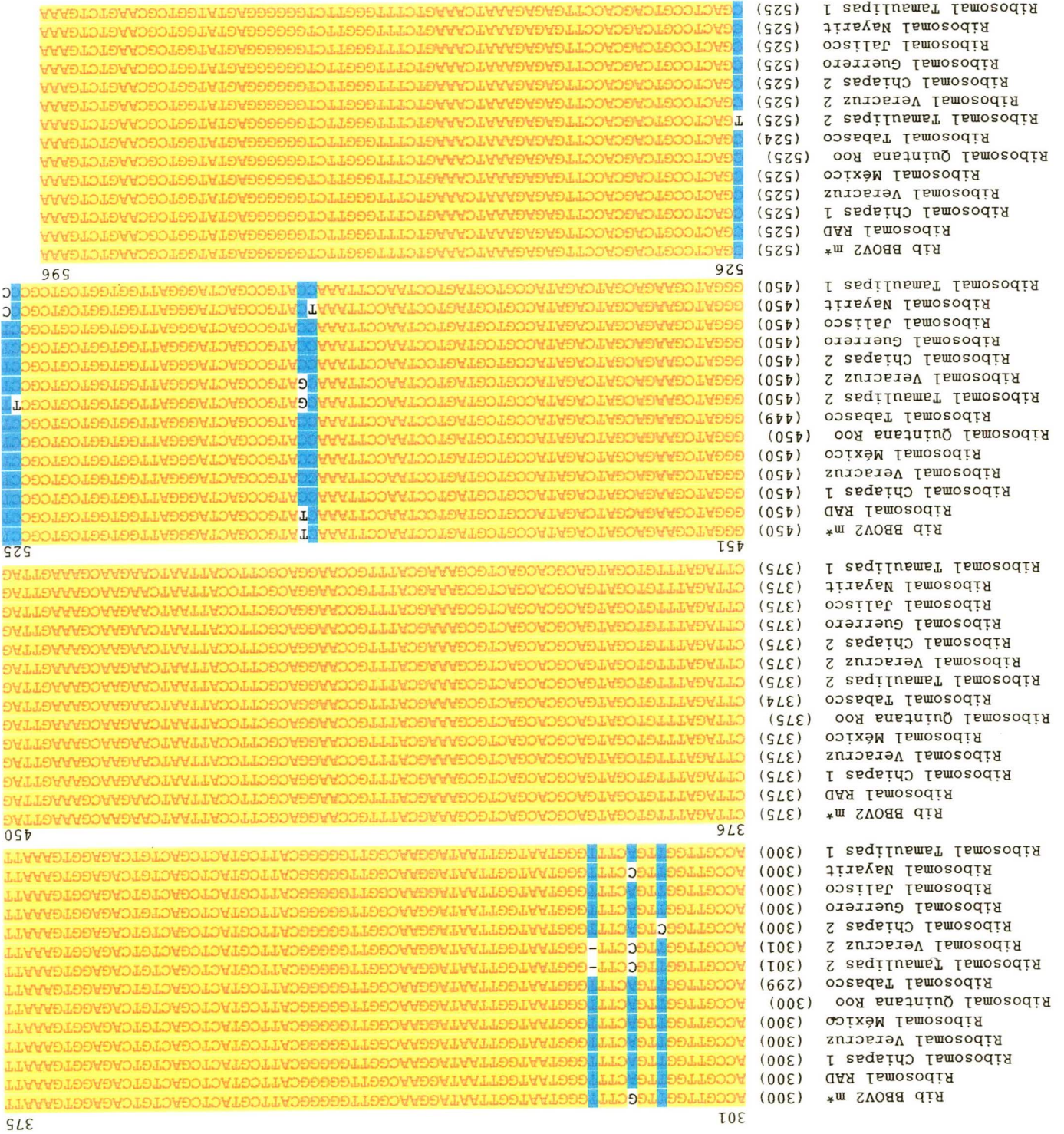
151 225

Rib BBOV2 m\* (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal RAD (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Chiapas 1 (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Veracruz (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal México (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - G C A T G T T C A C T A G G C GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Quintana Roo (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT T A C T T C G T C C - G C C A T G T T C A C T T G G C GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Tabasco (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - G C A T G T T T C A C T A G C GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Tamaulipas 2 (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT T T A C T T T C G T C C T G T A T G T T T C A A T G A C A C T C G T A C T T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Veracruz 2 (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT T T A C T T T C G T C C T G T A G T G T T T C A A G T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Chiapas 2 (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Guerrero (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Jalisco (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Nayarit (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT  
 Ribosomal Tamaulipas 1 (151) TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT A T T CGTCC - C G S T GAC CCTCGTTACTT

226 300

Rib BBOV2 m\* (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal RAD (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Chiapas 1 (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Veracruz (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal México (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Quintana Roo (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Tabasco (224) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Tamaulipas 2 (226) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Veracruz 2 (226) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Chiapas 2 (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Guerrero (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Jalisco (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Nayarit (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT  
 Ribosomal Tamaulipas 1 (225) TGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGGTTT GCCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTGTCTGT

**Figura 14.** Alineamiento múltiple de la región hipervariable del gen ribosomal. Se muestran las regiones de nucleótidos completamente conservadas, en letra roja y fondo amarillo; en letra azul con fondo azul turquesa, nucleótidos conservados; letras negras con fondo verde, nucleótidos con consenso con una presencia mayor al 50%; letra sin fondo, nucleótidos que no tienen similitud; guión, hueco o gap. La identidad determinada fue de 94%.







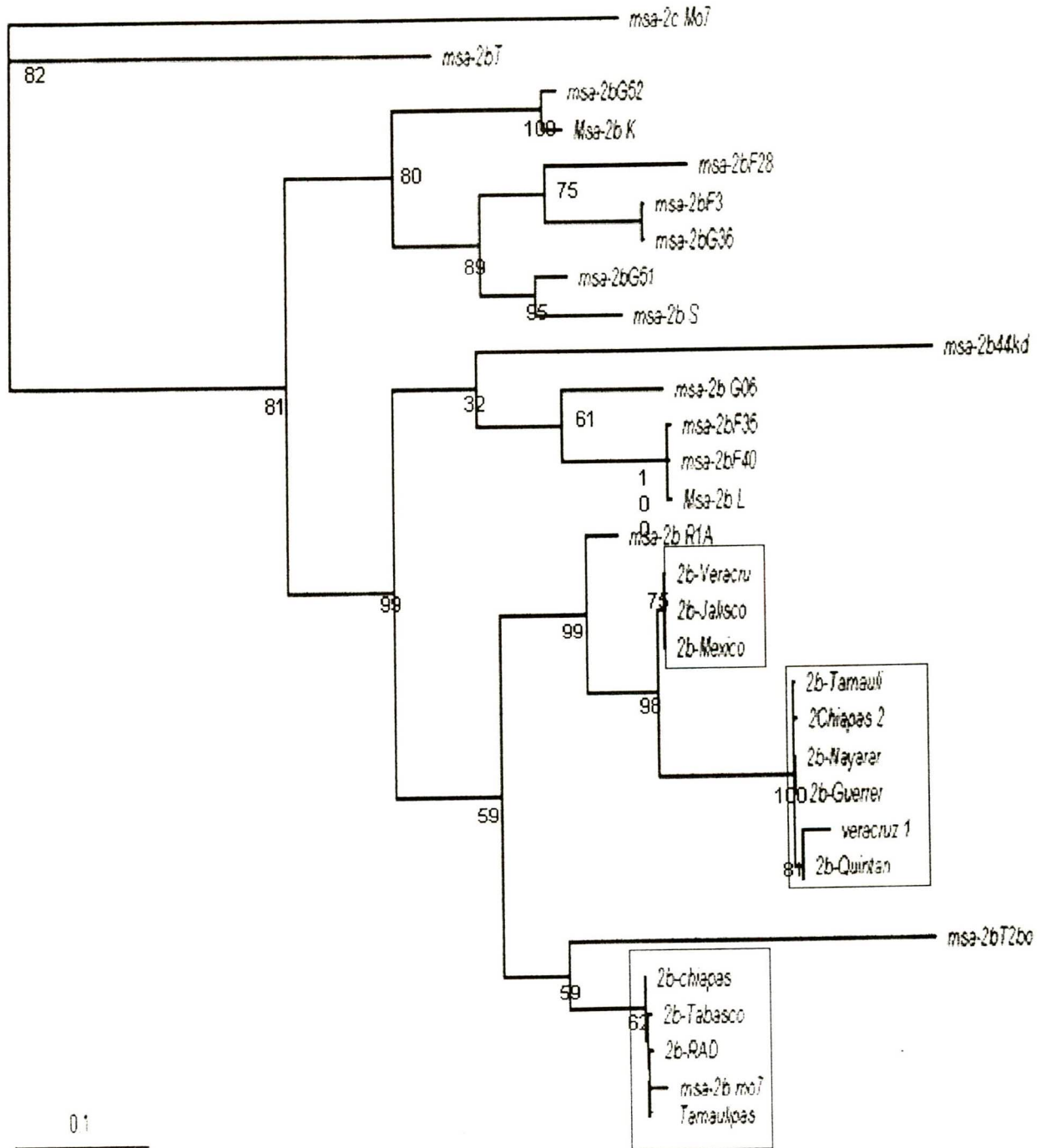
### **Análisis filogenético:**

Con el objeto de establecer relaciones filogenéticas o de parentesco entre los 13 aislados estudiados en este trabajo, se construyeron filogramas para cada uno de los genes (*msa-2b*, *msa-1*, *msa-2c* y *ssrRNA*).

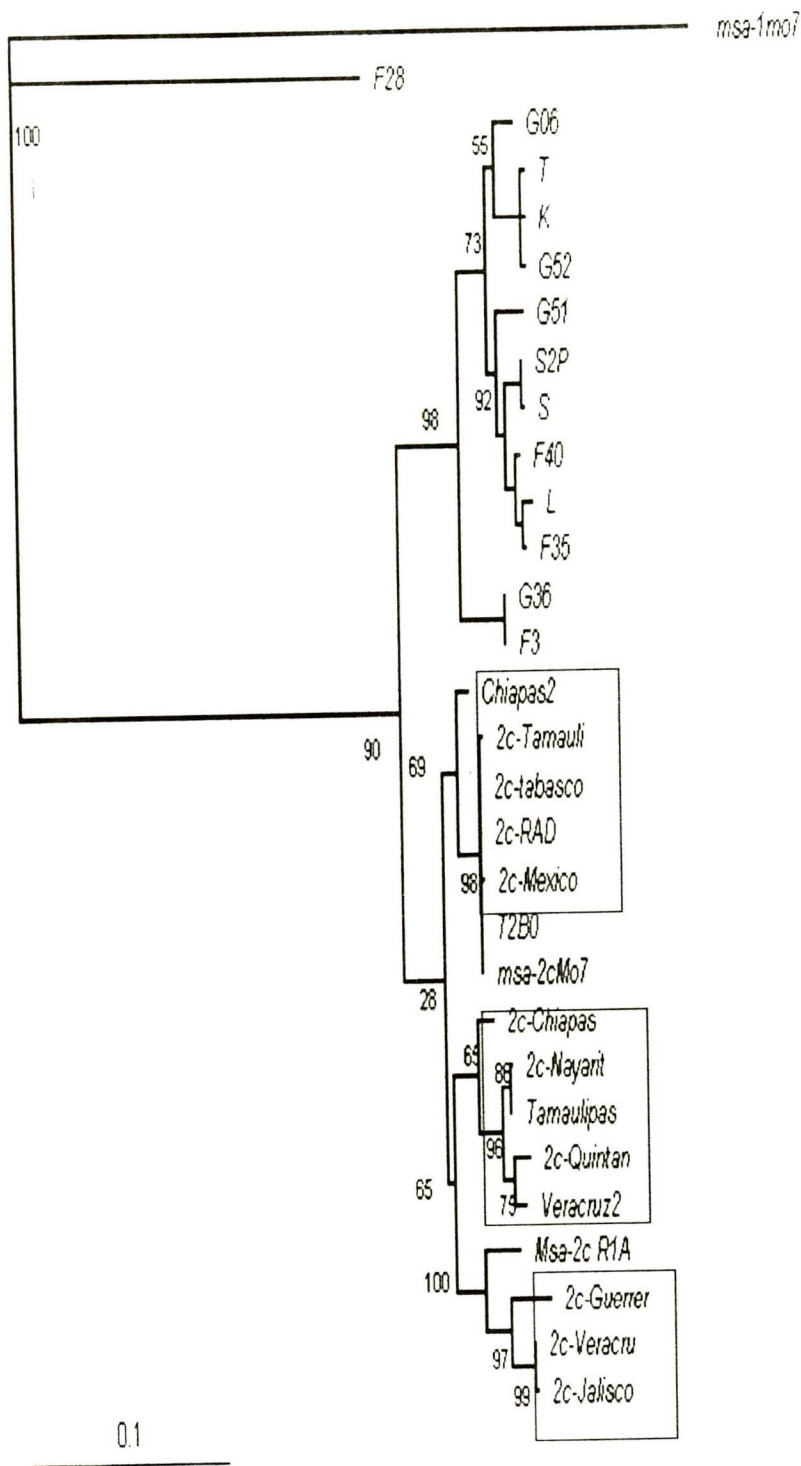
Se compararon las secuencias de los 13 aislados obtenidos junto con secuencias ya antes reportadas en el GenBank. En el filograma realizado con secuencias de otras regiones del mundo, se obtienen dos grandes ramas, los aislados americanos y los aislados australianos. El diseño de los árboles se llevó a cabo con el programa *phylip* 3.6, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre las distintos métodos de agrupación. En la mayoría de los casos se observó una alta consistencia entre ellos, la evaluación de los árboles se efectuó calculando el valor de remuestreo con el programa *BOOTSTRAP* con 1000 réplicas.

En el filograma del gen *msa-2b* (Figura 17) se localizan dos grandes ramas, la primera agrupa aislados australianos únicamente; de esta se deriva otra rama que divide al grupo restante australiano y la otra que contiene solo aislados americanos. Esto, sugiere que los aislados mexicanos se derivaron de alguno de los aislados australianos, proponiendo como grupo origen a algunos de los aislados australianos.

La figura 18 representa las relaciones de parentesco con el gen *msa-2c*, en el cual se localizan dos ramas bien sustentadas, una que agrupa exclusivamente a aislados australianos cerca del origen y otra que solo agrupa aislados mexicanos. Por el largo de las ramas se sugiere que fue una evolución paralela, pero es más larga la rama de los aislados australianos, por lo que es consistente el posible origen australiano.



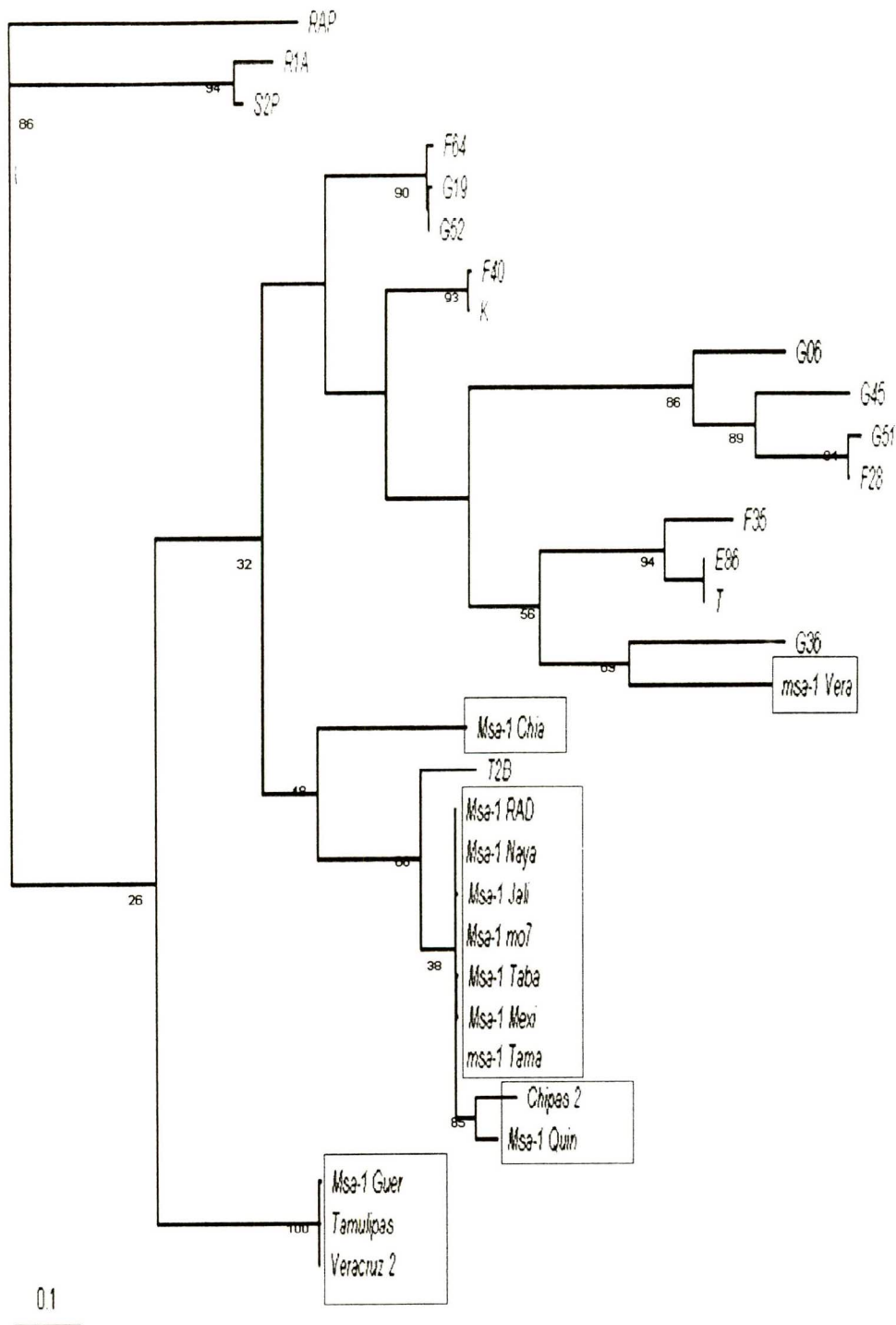
**Figura 17.** Representa las relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando la región variable del gen *msa-2b*. Filograma construido con el método de máxima parsimonia. Se fijó la raíz con el gen *msa-2c* de Mo7. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de una muestra de 1000 réplicas. En los cuadros se muestran los 13 aislados mexicanos.



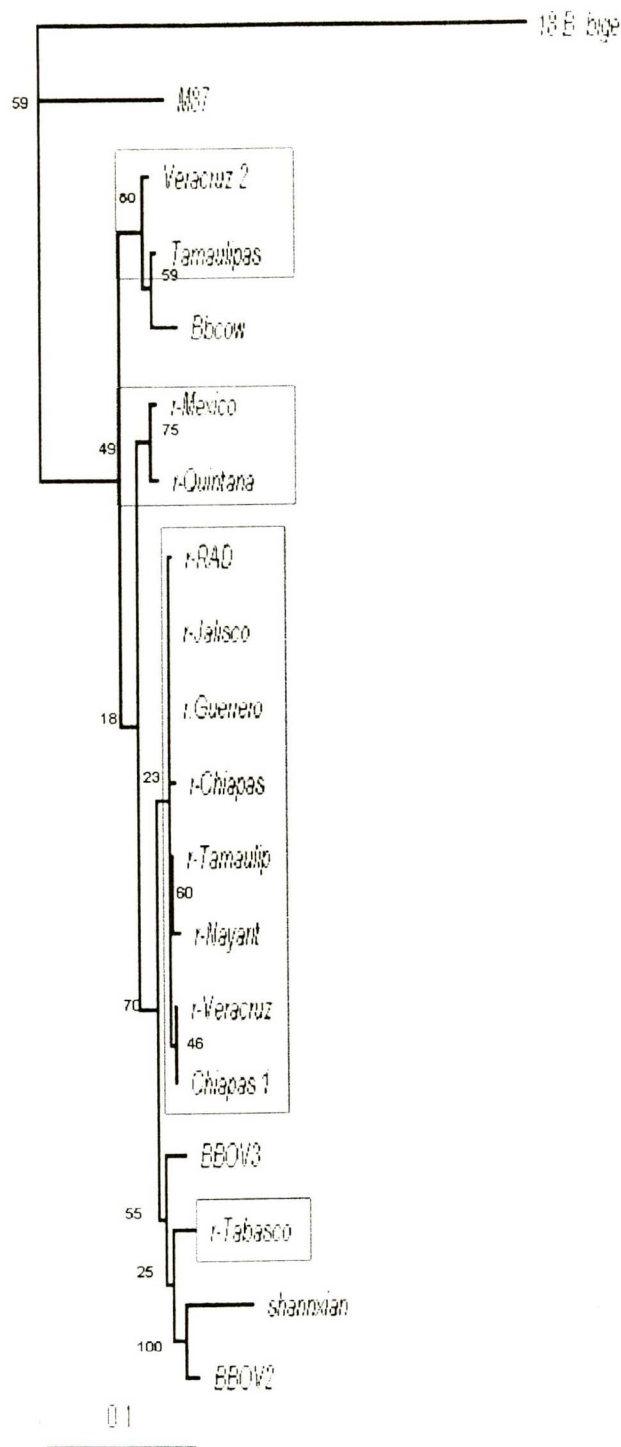
**Figura 18.** Representa las relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando el gen *msa-2c*. Filograma construido con el método de máxima parsimonia (ver método). Se fijó la raíz con el gen *msa-1* de Mo7. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de una muestra de 1000 réplicas. En los cuadros se muestran los 13 aislados mexicanos.

La figura 19 muestra el análisis filogenético realizado a partir de las secuencias del gen *msa-1*. Los resultados obtenidos son estadísticamente poco consistentes. Este filograma indica como posible grupo origen a los aislados argentinos. Las dos ramas sobresalientes indican una división entre los aislados australianos y los americanos. El programa de remuestreo indica que los resultados son estadísticamente poco significativos, debieran estar por arriba de 75% (Figura 19).

En el filograma obtenido con las secuencias del gen *ssrRNA* (Figura 20), se presenta estadísticamente poca consistencia entre sus ramas. Se observa una rama principal de la que se desprenden dos no claramente definidas, prácticamente los aislados chinos, australianos y mexicanos se agrupan juntos. El análisis filogenético no permite diferenciar los diferentes grupos conforme a los filogramas anteriores.



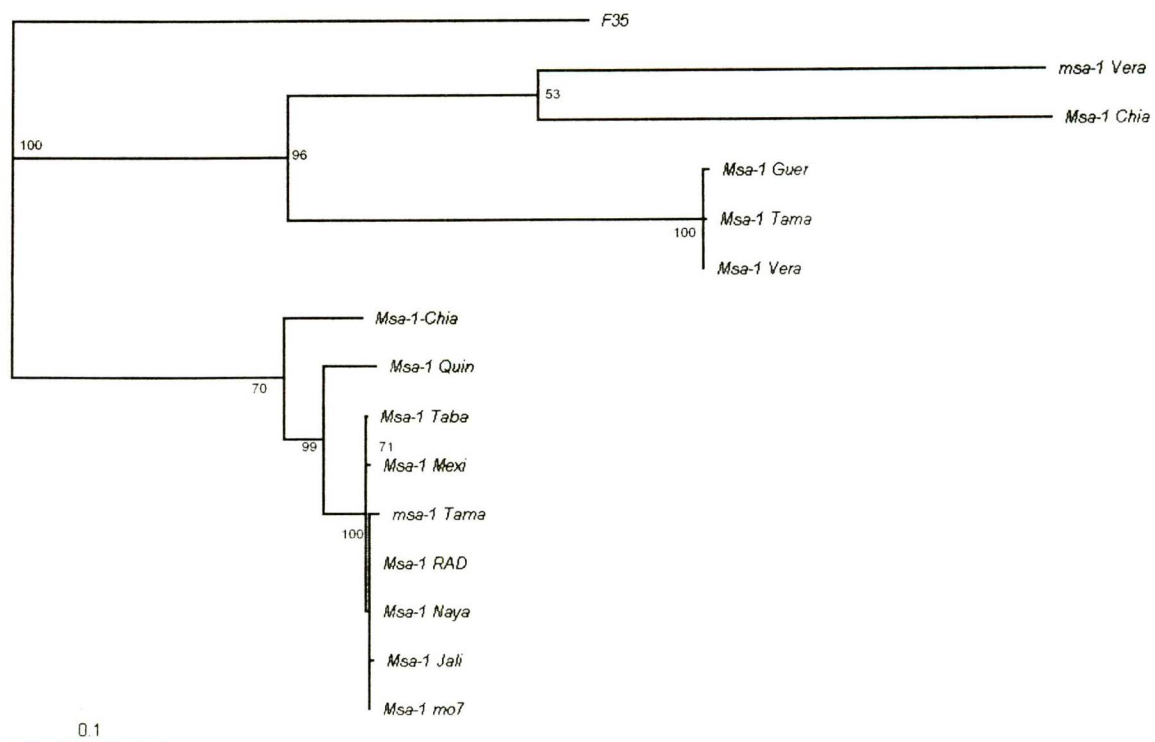
**Figura 19.** Representa las relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando el gen *msa-1*. Filograma construido con el método de máxima parsimonia (ver método). Se fijó la raíz con la secuencia del gen *rap*. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de una muestra de 1000 replicas. En los cuadros se muestran los 13 aislados mexicanos.



**Figura 20.** Representa las relaciones filogenéticas de 13 aislados mexicanos, utilizando la región hipervariable de la subunidad 18s del gen ribosomal. Filograma construido con el método de máxima parsimonia (ver método). Se fijó la raíz con la secuencia del gen *ssrRNA* de *B. bigemina*. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de una muestra de 1000 réplicas. En los cuadros se muestran los 13 aislados mexicanos.

El análisis filogenético realizado solo con los aislados mexicanos secuenciados en este estudio, indica una separación de grupos en la mayoría de los genes.

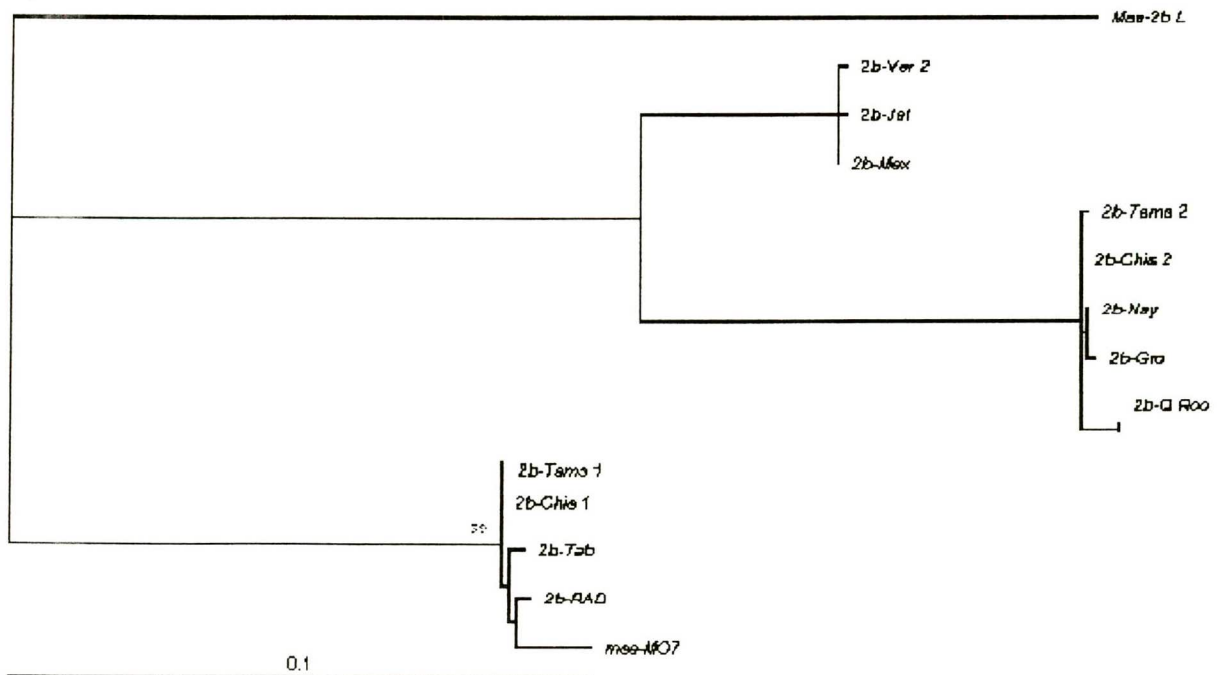
El filograma realizado con las secuencias del gen *msa-1* de los 13 aislados mexicanos, muestra una división de dos ramas principales, de una de ellas se derivan tres grupos y de la otra rama dos, con una consistencia estadísticamente significativa. En la primera rama se forma un grupo con Veracruz 1 y Chiapas 1, del cual se deriva otro más alejado conformado por Guerrero, Tamaulipas 1 y Veracruz, que se podría proponer como posible origen. Finalmente, de otra rama se deriva el grupo más grande conformado por Chiapas 2, Quintana Roo, Tabasco, México, Tamaulipas 2, RAD, Nayarit, Jalisco y el aislado de referencia Mo7.



**Figura 21.** Filogenia del gen *msa-1* construido con el método de máxima parsimonia (ver método) y utilizando solo las secuencias de los aislados mexicanos. Se fijó la raíz con la secuencia del gen f35. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de una muestra de 1000 réplicas.

El filograma de la figura 22, muestra el análisis filogenético con el gen *msa-2b* donde observaciones de tres grupos diferentes bien delimitados con una consistencia estadísticamente significativa. De una rama se derivan dos grupos, el grupo 1 formado por Veracruz 2, Jalisco y México, y el grupo 2 formado por Tamaulipas 1, Chiapas 2, Nayarit, Guerrero, Quintana Roo, y Tamaulipas 2, el tercer grupo integrado por Chipas 1, Tabasco RAD y el grupo de referencia Mo7, este último grupo podría ser el origen de los dos anteriores grupos.

En las secuencias de este gen se observan algunas deleciones descritas en el apartado de alineamientos, que definen a estos grupos.

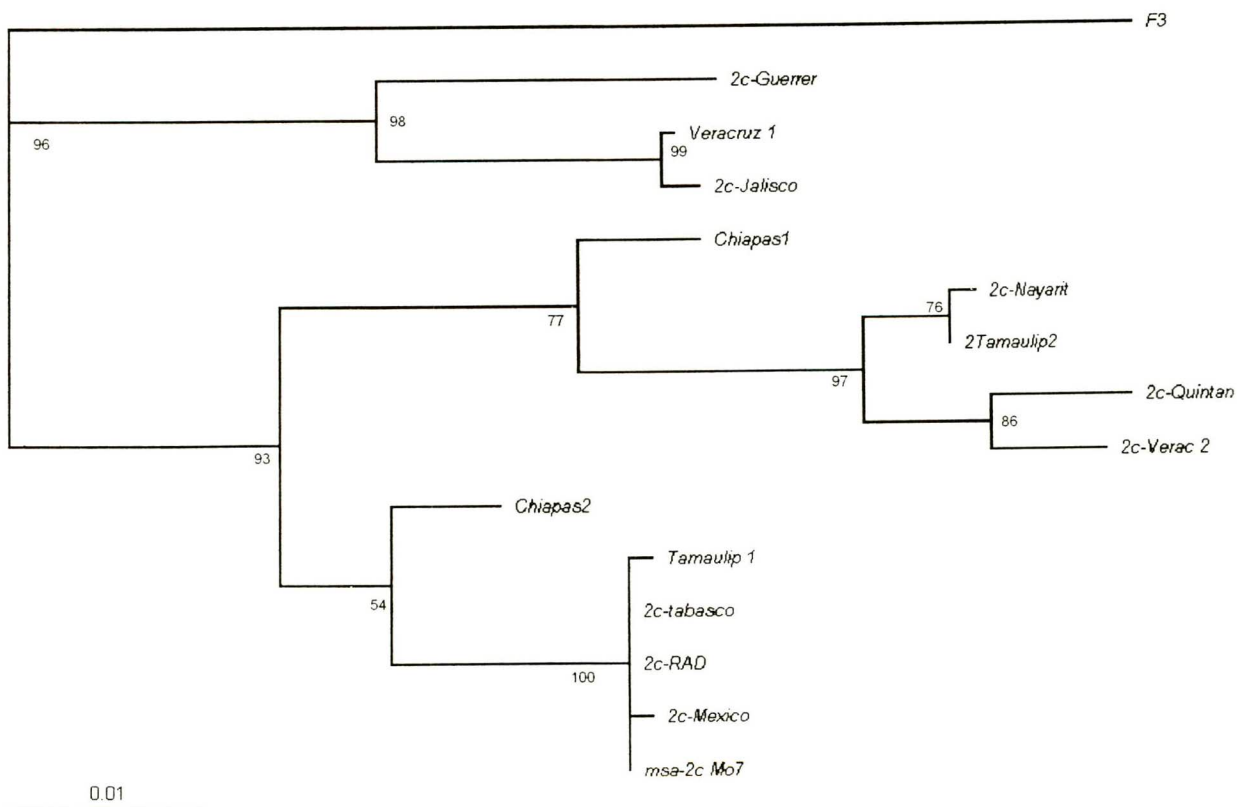


**Figura 22.** Filogenia del gen *msa-2b* solo con los aislados mexicanos. El árbol fue construido con el método de máxima parsimonia. Se fijó la raíz con la secuencia del gen *msa-b* L. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de la muestra de 1000 réplicas.

El filograma de la figura 23, muestra el análisis con el gen *msa-2c*. Se pueden observar tres ramas, con una consistencia estadísticamente significativa. En una de las ramas encontramos a los aislados de Guerrero, Veracruz 1 y Jalisco los cuales, por la cercanía al grupo externo, se podrían proponer como grupo origen.

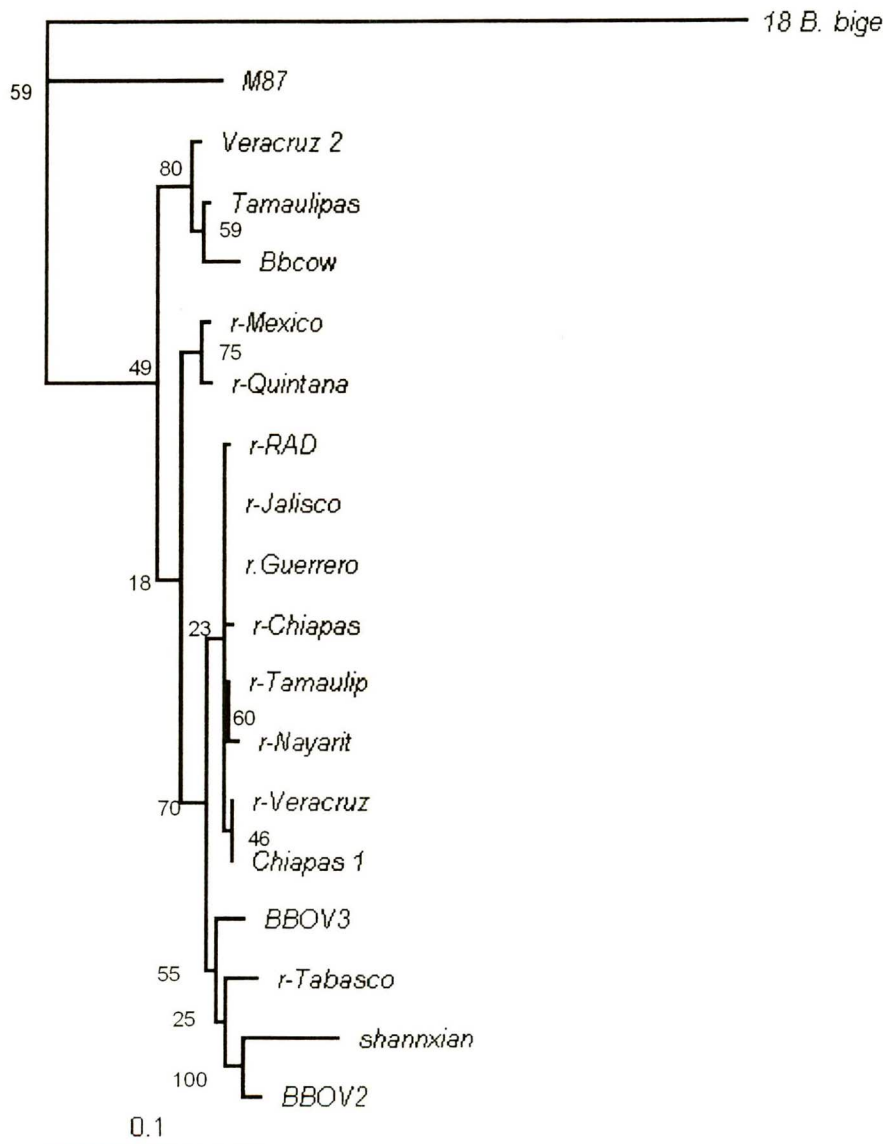
En otra rama encontramos a Chiapas 1, Nayarit, Tamaulipas 2, Quintana Roo, y Veracruz 2, a pesar de que se forman aparentes subgrupos todos se encuentran en la misma rama por lo que se pueden considerar un grupo.

En la última rama se encuentran Chiapas 2, Tamaulipas 1, Tabasco, RAD, México y el aislado de referencia Mo7, los cuales forman otro grupo.



**Figura 23.** Filogenia del gen *msa-2c* realizado solo con los aislados mexicanos. El árbol fue construido con el método de máxima parsimonia. Se fijó la raíz con la secuencia del gen *msa-2c* F3. Los números representan las veces que los nodos se repitieron en el consenso de la muestra de 1000 réplicas.

La figura 24 muestra las relaciones filogenéticas entre los aislados mexicanos con el gen *ssrRNA*, con el cual se observa en general una rama de la que se derivan 4 grupos, los cuales por tener un grado de certeza estadísticamente poco significativo, no proporciona suficiente información como para inferir las relaciones filogenéticas de los 13 aislados mexicanos, en general es un gen estadísticamente poco informativo.



**Figura 24.** Filogenia del gen *ssrRNA*, fue construido a partir de los 13 aislados mexicanos con el método de máxima parsimonia. Se fijó la raíz con la secuencia del gen *ssrRNA* de *Babesia bigemina*. Los números representan las veces que los nodos se repitieron, el consenso de la muestra de 1000 réplicas.

## **Genotipos:**

El análisis filogenético y los alineamientos de aminoácidos permitieron determinar varios genotipos, a partir de las secuencias mexicanas y con las secuencias obtenidas en el banco de datos de otras regiones del mundo, los cuáles se describen en las siguientes tablas.

A partir de los alineamientos de la proteína MSA-2c se generaron 2 genotipos, tomando en cuenta las posiciones de 9 aminoácidos distintos. Así, se puede discriminar perfectamente los genotipos Americanos, en donde se incluyen los 13 aislados recién secuenciados, el aislado texano (T2bo) y uno de los aislados argentinos (R1A), de los aislados Australianos (Tabla 6).

A partir de los alineamientos realizados con las secuencias de las proteínas predichas MSA-2b se obtuvieron 5 genotipos (Tablas 7 y 8).

Los alineamientos de la proteína MSA-2b a pesar de ser menos conservados permitieron diferenciar al igual que con la proteína MSA-2c dos genotipos, uno Americano y otro Australiano (Tabla 7).

**Tabla 6.** Dos genotipos generados con el alineamiento de la proteína MSA-2c, en negro el genotipo Americano y en naranja el genotipo Australiano, los cuales se determinaron a partir de los residuos identificados en nueve posiciones distintas.

Aislado/AA	11	14	30	32	33	34	118	200	228
Mo7	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Chiapas 1	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Tabasco	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
RAD	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
México	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
T2bo	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Chiapas 2	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Tamaulipas 1	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Nayarit	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Tamaulipas 2	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Quintana Roo	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Veracruz 2	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
R1A	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Guerrero	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Veracruz 1	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
Jalisco	F	I	T	Q	V	N	L	R	N
G06	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
MSA-2C T	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
K	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
G52	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
G51	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
S2P	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
S	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
F40	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
L	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
F35	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
G36	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I
F3	I	I	Z	H	V	Y	I	L	I

**Tabla 7.** A partir de la proteína MSA-2B se generaron dos genotipos bien definidos a partir de 8 posiciones distintas de aminoácidos, de los cuales se desprenden, el genotipo Americano en negro y el genotipo Australiano en naranja.

Aislado/AA	13	16	24	21	17	30	101	128
Mo72b	L	L	V	-	K	I	K	I
Tamaulipas 2	L	L	V	-	K	I	K	I
RAD	L	L	V	-	K	I	K	I
Chiapas 1	L	L	V	-	K	I	K	I
Tabasco	L	L	V	-	K	I	K	I
Veracruz 2	L	L	V	-	K	I	K	I
Tamaulipas 2	L	L	V	-	K	I	K	I
Veracruz 1	L	L	V	-	K	I	K	I
Nayarit	L	L	V	-	K	I	K	I
Jalisco	L	L	V	-	K	I	K	I
Guerrero	L	L	V	-	K	I	K	I
Quintana roo	L	L	V	-	K	I	K	I
Mexico	L	L	V	-	K	I	K	I
Chiapas 2	L	L	V	-	K	I	K	I
R1A	L	L	V	-	K	I	K	I
F28	F	F	-	D	V	V	F	F
F3	F	F	-	D	V	V	F	F
G51	F	F	-	D	V	V	F	F
G36	F	F	-	D	V	V	F	F
F40	F	F	-	D	V	V	F	F
F35	F	F	-	D	V	V	F	F
G06	F	F	-	D	V	V	F	F
G52	F	F	-	D	V	V	F	F
44kd	F	F	-	D	V	V	F	F
K	F	F	-	D	V	V	F	F
L	F	F	-	D	V	V	F	F
S	F	F	-	D	V	V	F	F
T	F	F	-	D	V	V	F	F

Subgenotipos Americanos, los alineamientos de la proteína MSA-2b generaron tres subgenotipos americanos, tomando en cuenta las deleciones detectadas en el alineamiento de aminoácidos (Tabla 8).

**Tabla 8.** Subgenotipos Americanos. Utilizando la proteína predicha MSA-2B se generaron tres genotipos mexicanos, el genotipo 1 en negro, el genotipo 2 en naranja y el genotipo 3 en azul.

Aislado	165	166	167	178	179	180	181	184	185	186	190	199	200	204
Chis. 1	E	S	A	N	R	P	S	S	P	Q	S	L	N	K
RAD	E	S	A	N	R	P	S	S	P	Q	S	L	N	K
Tab.	E	S	A	N	R	P	S	S	P	Q	S	L	N	K
Tamps1	E	S	A	N	R	P	S	S	P	Q	S	L	N	K
Jal.	Q	P	D	T	P	A	A	P	G	P	Q	-	-	T
Mex.	Q	P	D	T	P	A	A	P	G	P	Q	-	-	T
Ver. 2	Q	P	D	T	P	A	A	P	G	P	Q	-	-	T
Chis. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A
Gro.	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A
Nay.	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A
Q. Roo	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A
Tamps2	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A
Ver. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	L	G	H	A

## **RESULTADOS ADICIONALES:**

### **Análisis proteico:**

Con la finalidad de obtener un análisis más completo de las secuencias obtenidas, se realizaron análisis *in silico* de las proteínas predichas MSA-2b y MSA-2c. Tomando en cuenta los análisis que se han realizado con anterioridad en otras regiones del mundo (Berens *et al.*, 2005) se obtuvo el análisis de la variabilidad de las proteínas MSA-2c y MSA-2b, incluyendo el análisis de hidrofobicidad y la búsqueda de dominios importantes de la proteína de cada uno de los 13 aislados.

### **Análisis de variabilidad e hidrofobicidad de la proteína:**

En los alineamientos realizados a partir de las secuencias de aminoácidos de proteínas predichas de los 13 aislados mexicanos, se identificaron las regiones más variables de las proteínas MSA-2b y MSA-2c. Además de identificar las regiones hidrofílicas de cada una.

Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron a partir de las secuencias predichas de proteínas de cada uno de los 13 aislados mexicanos, los perfiles obtenidos fueron comparados, se decidió empalmar sólo 3 secuencias representativas de cada uno de los grupos generados a partir del análisis filogenético realizado (Figuras 25 y 26).

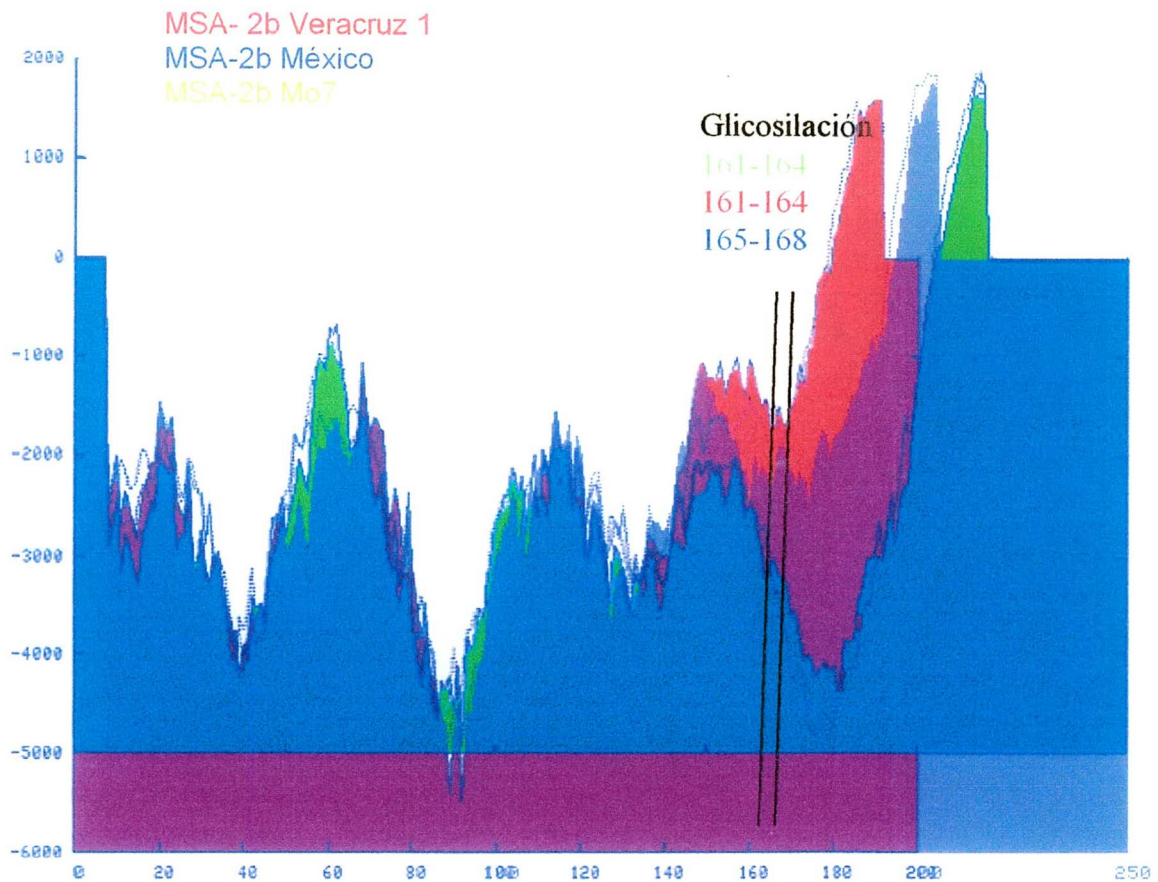
En el perfil de hidrofobicidad de la proteína MSA-2b, se puede observar también la longitud de cada uno de los grupos representativos (Veracruz 1, México y Mo7) y los sitios de mayor variabilidad, en donde los colores de la gráfica no se combinan (Figura 25).

En la Tabla 9 se observa el análisis del alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2B de los 13 aislados mexicanos, se muestran solo los sitios en donde los aislados cambian de aminoácido en la misma posición 3 o hasta 4 veces, por ejemplo en la posición 183 algunos aislados tienen al aminoácido alanina, otros tienen serina, uno tiene prolina, y en otro grupo hay un gap o una deleción.

**Tabla 9.** Posiciones hipervariables de la proteína MSA-2b

Aislado	157	160	165	166	167	178	179	180	181	183	184	185	186	187	196	197	199	200
Mo7	K	A	E	S	A	N	R	P	S	A	P	S	P	Q	T	S	L	N
Chiapas 1	K	A	E	S	A	N	R	P	S	A	P	S	P	Q	T	S	L	N
RAD	K	A	E	S	A	N	R	P	S	A	P	S	P	Q	T	S	L	N
Tabasco	K	V	E	S	A	N	R	P	S	A	P	S	P	Q	T	S	L	N
Tamaulipas1	K	V	E	S	A	N	R	P	S	A	P	S	P	Q	T	S	L	N
Jalisco	Q	A	Q	P	D	T	P	A	A	P	H	P	G	P	D	Q	-	-
México	Q	A	Q	P	D	T	P	A	A	S	H	P	G	P	D	Q	-	-
Veracruz 2	Q	V	Q	P	D	T	P	A	A	S	H	P	G	P	D	Q	-	-
Chiapas 2	Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H
Guerrero	L	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H
Nayarit	L	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H
Quintana	Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H
Roo																		
Tamaulipas2	Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H
Veracruz 1	Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	N	L	G	H

El perfil de hidrofobicidad para la proteína MSA-2b (Figura 25) indica la variabilidad de esta proteína, las distintas longitudes de la misma, las regiones conservadas y las que varían. Como proteína de superficie, ésta se ancla a la membrana con un dominio hipotético de glicosilación reportado anteriormente (Berens *et al.*, 2005). En la figura 25, se observa este sitio en una misma posición (161-164) en los grupos 1 y 3 de los aislados representativos, el representante del grupo 2, también presenta un sitio de glicosilación pero en otra posición (165-168). En los 13 los perfiles de hidrofobicidad se aprecia la conservación del extremo amino y en el extremo carboxi-terminal.



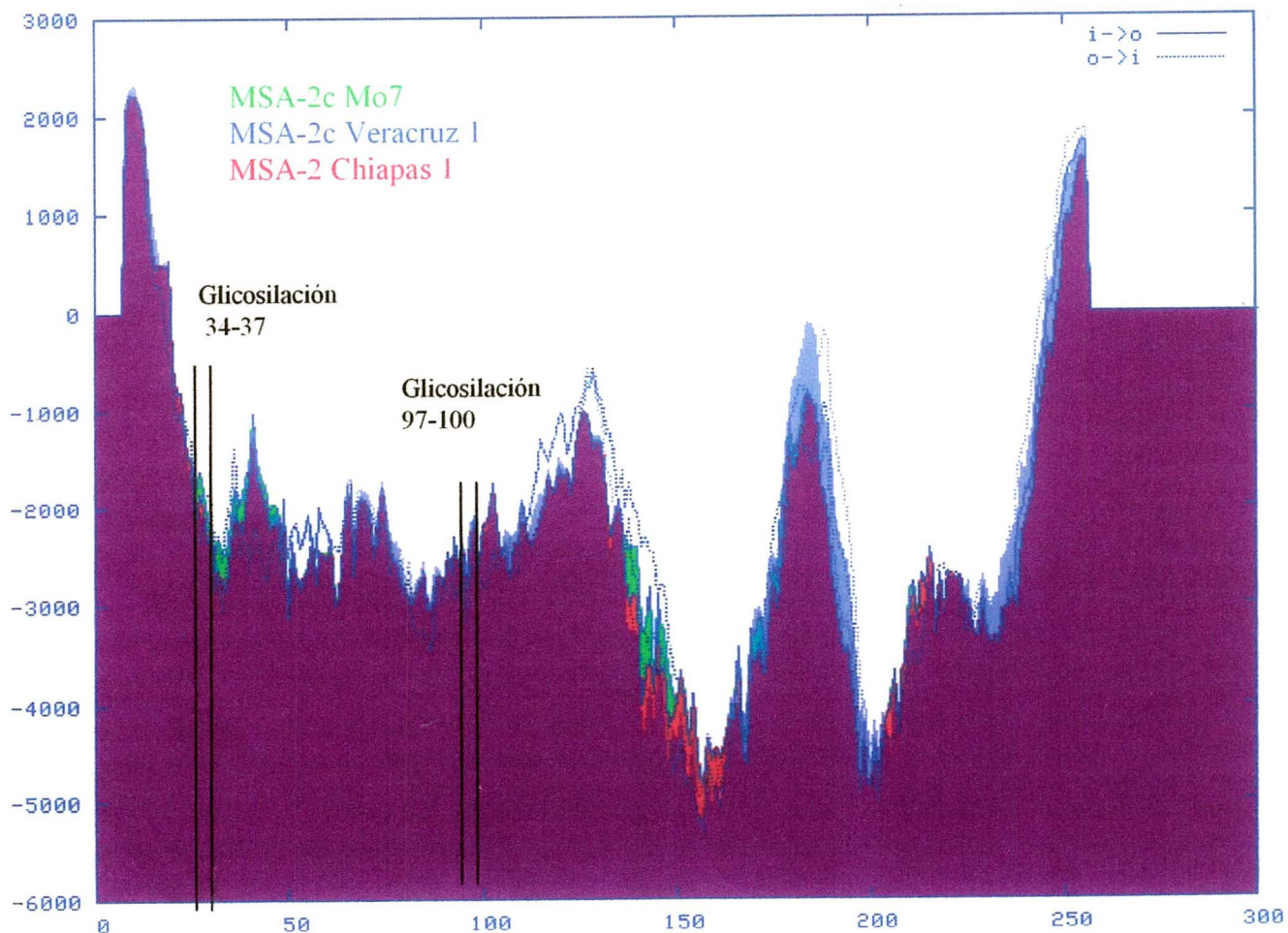
**Figura 25.** Perfil de hidrofobicidad de la proteína MSA-2b. Además de observar el perfil de hidrofobicidad de los tres grupos representativos de la proteína MSA-2b, también se puede observar la longitud de la proteína predicha para cada uno de estos grupos. El grupo representado por el aislado Mo7 en verde cuenta con 226 aa. El grupo representado por el aislado México tiene 215 aa, y el grupo representado por el aislado Veracruz 1, cuenta con 202 aa, así como el motivo de glicosilación de cada uno de los grupos.

La tabla 10 fue generada con el análisis del alineamiento múltiple de las secuencias predichas de la proteína MSA-2c, en donde se indica la región variable de la proteína. La proteína como ya se ha visto a lo largo del trabajo, es la más conservada de la familia. En ésta tabla se presentan las posiciones en donde existe una sustitución de 3 aminoácidos en la misma posición.

**Tabla 10.** Posiciones hipervariables de la proteína MSA-2c

	148	195	202	205	218
MO7	K	R	A	N	T
Chiapas 1	K	R	A	N	T
Chiapas 2	K	T	V	D	A
Guerrero	D	T	F	E	P
Veracruz 1	D	T	A	D	P
Jalisco	D	T	T	D	P
México	K	I	A	D	A
Quintana Roo	N	R	A	N	T
RAD	K	I	A	D	A
Tamaulipas 1	K	I	A	D	A
Tabasco	K	I	A	D	A
Nayarit	D	R	A	N	P
Tamaulipas 2	D	R	A	N	P
Veracruz 2	D	R	A	N	P

La figura 26 muestra el perfil de hidrofobicidad de tres aislados representantes (Mo7, Veracruz 1 y Chiapas 1) de la proteína MSA-2C. En la grafica se aprecia el empalme de los tres aislados representativos, en donde la mayor parte de la proteína es hidrofílica, y la región hidrofóbica esquematizada con un pico, conservada en los tres aislados. En la figura también se muestran los sitios de glicosilación, que se encuentran antes de la región variable muy conservados.



**Figura 26.** Perfil de hidrofobicidad para la proteína MSA-2c. Además de observar el perfil de hidrofobicidad de los tres grupos representativos de la proteína MSA-2C, se muestran los motivos de glicosilación de cada uno de los grupos.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

En este trabajo se llevó a cabo el análisis de las relaciones filogenéticas existentes entre 13 aislados de *Babesia bovis* de distintas regiones de la república mexicana y otras regiones del mundo, utilizando las secuencias del gen *ssrRNA*, y de los genes *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c*, cuyos productos se encuentran ubicados en la membrana del parásito, pertenecen a la familia variable de antígenos de superficie del merozoito, mismos que tienen la función de participar en el proceso de invasión al eritrocito.

En el 2002 en Argentina se realizó un análisis filogenético de la familia *vmsa* en donde se sugirió como gen ancestral de la familia a *msa-1* (Florin-Christensen *et al* 2002). Sin embargo, a la fecha, en México no se han realizado trabajos filogenéticos.

### Diseño de oligonucleótidos:

Para el presente trabajo se diseñaron iniciadores específicos para cada uno de los genes. El gen ribosomal que codifica para la subunidad pequeña 18s de *Babesia bovis*, *ssrRNA*, se propuso como marcador evolutivo, porque durante la evolución ha sido uno de los genes más conservados. Este gen tiene 1621 pb pero solo se amplificó la región hipervariable descrita así por Gubbels *et al.*, 1999. El gen es sumamente conservado y debido a que se propuso inicialmente determinar las relaciones filogenéticas entre aislados muy cercanos, se eligió la región hipervariable. Además, anteriormente se habían publicado trabajos filogenéticos utilizando esta región para discriminar entre especies, obteniendo resultados satisfactorios (Egea *et al.*, 1996; Ellis *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1991; Reddy *et al.*, 1992; Gozar *et al.*, 1995; Gozar *et al.*, 1993; Dalrymple *et al.*, 1992; Shin-Hyeong *et al.*, 2002). Debido a ésto se diseñaron oligonucleótidos para obtener un fragmento de 604 pb. Sin embargo, y como se discutirá más adelante, aparentemente esta región no fue suficiente para el análisis filogenético, el filograma generado con las secuencias de este gen resultó poco informativo.

Para el diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *msa-2b* únicamente se tomo en cuenta la región variable. El gen completo cuenta con 905 pb, este gen al derivarse de una duplicación en algún momento de su evolución (Florin-Christensen *et al.*, 2002) es muy parecido a los genes *msa-2a<sub>1</sub>* y *msa-2a<sub>2</sub>* e idéntico en la región 3' y 5', de tal manera que se realizaron varios alineamientos y análisis BLAST para asegurar que los oligonucleótidos fueran específicos, y amplificar exclusivamente la región deseada.

### **Amplificación de genes:**

La amplificación de los tres genes (*msa-2b*, *msa-2c* y *ssrRNA*) para algunos aislados se obtuvo con facilidad, pero en la mayoría se presentó alguna dificultad, como los que a continuación se describen:

Las muestras de sangre infectada de algunos aislados de campo, presentaron poca parasitemia (Guerrero, Jalisco, Nayarit), lo que dificultó la amplificación de los genes, en estos casos se utilizó otro método alternativo de extracción (columna de silica gel) para optimizar y obtener DNA suficiente para lograr la amplificación.

En otros aislados (Tamaulipas 1, Quintana Roo, Veracruz 1) no se lograba amplificar debido probablemente a contaminantes que inhibían la reacción, por lo que se modificó el protocolo, realizando extracciones adicionales con fenol/cloroformo.

En los aislados de Quintana Roo y Tamaulipas 1, a pesar de que la sangre infectada ya estaba disponible de forma criopreservada, no se logró la amplificación hasta que posteriormente se recuperó más sangre infectada con el pase en un bovino inmunodeprimido, permitiendo elevar la parasitemia y así obtener la extracción de ADN genómico de *B. bovis* a partir de estos aislados.

La amplificación de los genes de los aislados de Jalisco y Nayarit, también presentó dificultad, pues a pesar de haberse obtenido DNA de las muestras y amplificado los genes *ssrRNA* y *msa-2c*, el gen *msa-2b* no se logró amplificar, quizá por degradación de la molécula, ya que la amplificación de este gen no se

realizó el mismo día, por lo que se volvió a realizar la extracción con sangre infectada recién colectada de la zona.

### **Clonación:**

El proceso de clonación se realizó, para los tres genes (*msa-2b*, *msa-2c* *ssrRNA*) de los 13 aislados mexicanos. Posteriormente se efectuó una digestión enzimática con la enzima *Eco* RI, con la finalidad de verificar la presencia del inserto.

La digestión enzimática realizada con los genes *msa-2c* y *ssrRNA* siempre dieron como resultado, el inserto del tamaño esperado, pero las digestiones enzimáticas obtenidas con el gen *msa-2b*, en su mayoría se detectó un sitio *Eco* RI adicional, aproximadamente ubicado a la mitad del inserto (Jalisco, Nayarit, Quintana Roo, Guerrero, Chiapas 2, Tamaulipas 2, Tamaulipas 1, México, Veracruz 2, Veracruz 1) (Figura 10).

Posteriormente, se observó que la secuencia cuenta con varias deleciones, e incluso se verificó la variabilidad de tamaño en cada uno de las secuencias. Se observaron tres distintos tamaños de secuencia de acuerdo a la presencia de deleciones: las que no tienen deleción cuentan con 684 pb, las que cuentan con una deleción tienen 648 pb, y las que tienen una deleción mayor contienen 609 pb.

La variabilidad presente en este gen se observó parcialmente con la digestión enzimática, y por lo que podría ser útil para discriminar cepas o aislados en la república mexicana: ya sea por el tamaño del amplicón mediante PCR y visualización en un gel de agarosa, o con un análisis de restricción enzimática con la enzima *Eco* RI.

### **Alineamientos múltiples:**

Se realizó el análisis y edición de las secuencias para cada uno de los tres genes (*msa-2b*, *msa-2c* y *ssrRNA*) de los 13 aislados mexicanos. Se secuenciaron 2 clonas distintas para cada aislado con oligonucleótidos sentido y antisentido, hasta obtener una clona representativa del aislado o región.

Para la mayoría de los aislados fue relativamente fácil decidir cual clona sería la representativa. Pero cuando se realizaron los alineamientos con el gen *msa-2c* para los aislados de Quintana Roo, Tamaulipas 2 y Chiapas 1, ésto no fue posible, ya que se detectaron varias diferencias entre las 2 clonas secuenciadas, por lo que se decidió secuenciar una tercer clona y así poder determinar la secuencia representativa del aislado.

Posteriormente se buscaron y seleccionaron secuencias previamente reportadas en el Genbank correspondientes a aislados de otras regiones del mundo y se alinearon con las obtenidas en este trabajo. Algunas de las secuencias reportadas principalmente en Australia fueron obtenidas a partir del locus publicado como *msa-2a/b* (Berens *et al.*, 2005). Para obtener sólo la región o gen correspondiente deseada, se realizaron alineamientos con las secuencias mexicanas obtenidas, en especial con el gen *msa-2b*. También se utilizaron las secuencias de 13 aislados mexicanos para el gen *msa-1*, obtenidas en el mismo laboratorio.

Se obtuvieron un total de 30 secuencias para el gen *msa-2b*; 30 secuencias para el gen *msa-2c*; 31 secuencias para *msa-1* y 19 secuencias para el gen ribosomal. Se realizaron alineamientos múltiples utilizando una serie de programas (Vector NTI, Bio Edit y MEGA 3.1) y se incluyeron modificaciones manuales para los genes *msa-2b* y *ssrRNA*, con el fin de obtener un mejor alineamiento.

El alineamiento obtenido a partir de los genes *msa-2c* y región hipervariable del gen ribosomal muestra una homología elevada, como era de esperarse, con una identidad del 88.7% y del 94%, respectivamente. El gen ribosomal se ha sugerido como marcador evolutivo, ya que los cambios son constantes, y el gen *msa-2c* se había reportado como un gen con un alto índice de conservación.

En los alineamientos realizados con las secuencias de los genes *msa-2b* y *msa-1*, se observó una heterogeneidad muy alta. Incluso, las secuencias obtenidas para el gen *msa-2b* variaron en longitud (684pb, 648pb y 609pb para tres grupos de aislados obtenidos), debido a inserciones o deleciones detectadas en las mismas, ésto originado quizá por la facilidad de variación que presentan estos genes en respuesta a la presión del sistema inmune.

Algunos patógenos a lo largo de la evolución han desarrollado diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune y pasar inadvertidos. Uno de los mecanismos es el mimetismo molecular, el microorganismo sintetiza moléculas antigénicas semejantes a las proteínas del hospedero, estrategia que aprovecha la tolerancia del sistema inmune (Regueiro *et al.*, 2004).

Otro mecanismo es a través de la vía del complemento a varios niveles: el péptidoglicano del parásito impide el acceso al Complejo de Ataque a la Membrana (MAC), sus proteínas M se unen al fibrinógeno y la albúmina, las H se unen a la IgG para impedir que active al C1 y su peptidasa de C5a degrada esta proteína quimiotáctica impidiendo que atraiga a los neutrófilos (Regueiro *et al.*, 2004).

Por otra parte, algunos patógenos presentan moléculas de superficie poco inmunogénicas, como la proteína de 35 kDa de *Treponema pallidum* (Schouls *et al.*, 1991).

Pero sin duda el mecanismo que más se ha estudiado es la variabilidad antigénica, lo utilizan varios organismos como *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, estos parásitos presentan genes multicopia que codifican para proteínas antigénicas que se pueden expresar de forma aleatoria (Regueiro *et al.*, 2004). El genoma de *Trypanosoma brucei*, puede codificar para 1000 glicoproteínas superficiales antigénicamente distintas (VSGs), producto de recombinación homóloga llevada por la proteína RAD51 (Proudfoot *et al.*, 2005).

En *Plasmodium vivax* también se han descrito mecanismos para evadir al sistema inmune, como la recombinación intragénica presente en la proteína MSP-13a descrita en Tailandia, parcialmente responsable de la diversidad genética del organismo (Pays, 2006; Dzikowski *et al.*, 2006; Mascorro *et al.*, 2005).

En *Babesia bovis* este mecanismo se ha estudiado en la familia de genes *vesa* que codifican para antígenos de superficie; se ha propuesto que la proteína VESA 1 es producto de la recombinación a partir de segmentos aparentemente transponibles, generando formas tan variables incluso de generación en generación. (Dzikowski *et al.*, 2006). Estos genes se sabe son sumamente variables, pero hasta la fecha no se han descrito los mecanismos de variación.

Posiblemente las proteínas de la membrana del merozoito (MSA-2b, MSA-2c, MSA-1) de *Babesia bovis* utilizan mecanismos similares para evadir la respuesta inmune, propiciando variaciones en la secuencia primaria como los que se observan en las figuras 15 y 16.

Aunque no podemos descartar los cambios evolutivamente descritos que pueden deberse a transiciones, transversiones, o por deleciones/inserciones al azar, estas variaciones, evolutivamente podrían presentarse como ventaja para el parásito (Futuyma *et al.*, 2003).

En el análisis de secuencias de proteínas predichas para el gen *msa-2b* se localizaron regiones variables y regiones conservadas (Berens *et al.*, 2005). Estas regiones se proponen como puntos relacionados con la recombinación de los genes de la familia de antígenos variables de la superficie del merozoito.

Las variaciones observadas en el presente trabajo (deleción e inserción de fragmentos en la secuencia primaria) seguramente se originaron con el propósito de evadir al sistema inmune del hospedero para la sobrevivencia del parásito, a partir de una región recombinante antes descrita por (Berens *et al.*, 2005), y por (Brown *et al.*, 2006). Sin embargo, hace falta estudiar los procesos que dan lugar a la variabilidad de estos genes en *B. bovis*.

En general, se sabe poco de la biología y evolución de los parásitos pero se ha propuesto, de acuerdo a la teoría molecular, que hay ancestros con una cierta combinación de dominios estructurales y funcionales conservados que le confieren alguna ventaja a los parásitos, por lo que los grupos o secuencias estrechamente relacionadas tendrán arreglos o dominios semejantes, de este modo se pueden proponer ancestros hipotéticos de distintos tipos de parásitos (Brian *et al.*, 2003).

## Filogramas:

A partir de los alineamientos de las secuencias de los genes *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c* y *ssrRNA*, se construyeron filogramas o árboles filogenéticos. Con cada uno de los métodos de reconstrucción filogenética (Distancias, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud), con el programa PHYLIP 3.6 y con el programa MEGA 3.1, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los distintos métodos. En general, se conserva la misma topología en los filogramas generados, entre los distintos métodos y entre los dos programas utilizados; en la mayoría de los casos se presentó una alta consistencia entre ellos.

La evaluación de los árboles se efectuó calculando el valor de remuestreo con el programa BOOTSTRAP con 1000 réplicas en cada uno de los árboles. Después de analizar todos los resultados se concluyó que los árboles generados por cualquiera de los métodos tienen una alta similitud; sin embargo, el método de Máxima Parsimonia toma en cuenta caracteres individuales, reflejando la verdadera historia evolutiva (Eguiarte *et al.*, 1999), por lo que se decidió presentar sólo los filogramas generados por este método.

El método de máxima parsimonia metodológicamente consiste en buscar los árboles evolutivos más cortos posibles, este principio alude a la hipótesis evolutiva más probable que implique menos cambios, ya que la naturaleza tiende siempre a la simplicidad, máxima que le da robustez al análisis (Futuyma 1997). Sin embargo dadas las características de consistencia entre los métodos, en realidad se pudo haber mostrado cualquiera de los árboles elaborados.

Algunos autores consideran que el método de máxima parsimonia es un método superior a los métodos de distancia, al utilizar la información individual de cada uno de los caracteres y no condensarla en un solo valor de distancia, lo que algunas veces provoca sesgos en el análisis (Eguiarte *et al.*, 1997). Pero en este caso los valores obtenidos en ambos métodos fueron muy similares.

En los filogramas obtenidos con las secuencias de los genes *msa-2b* y *msa-2c*, en general se observa un mismo patrón de distribución filogenético. Se puede observar una división clara entre los aislados pertenecientes al continente

americano y los del continente australiano, resultado quizá de la barrera geográfica marítima o la distancia de varios miles de kilómetros.

El análisis en general también nos indica que se podría sugerir que las secuencias de *Babesia bovis* obtenidas de los aislados americanos pudo originarse de alguno de los aislados australianos, quizá por alguna importación de ganado bovino en el pasado, proponiendo como grupo origen a los aislados australianos. Consecuentemente el movimiento del ganado por el comercio a nivel mundial, determina el origen del parásito, sin dejar de considerar la escasez de secuencias para los genes en estudio procedentes de aislados de otras regiones del mundo.

El filograma obtenido con el gen *msa-2b* forma dos grandes ramas, en donde se separan los grupos australianos de los americanos. De la primera rama se desprende otro grupo australiano del que deriva el grupo americano. De la rama en donde se agrupan los aislados americanos, se separan tres grupos generados por la presencia de deleciones o inserciones en la secuencia primaria de algunos aislados, y detectada en el alineamiento múltiple de las secuencias (Figura 12). Dos de los grupos generados están relacionados con un aislado argentino (R1A), y el otro grupo relacionado con un aislado texano (T2Bo). La relación mostrada entre estos grupos podría sugerir su posible carácter ancestral para este gen, probablemente generado por los intercambios comerciales dados entre estos países.

El filograma obtenido con las secuencias del gen *msa-2c*, permite resolver los dos clados generados con el gen *msa-2b*; el clado americano y el clado australiano, con un grado estadísticamente significativo, además de sugerir de igual manera a las secuencias australianas como grupo ancestral.

El análisis del filograma realizado con las secuencias del gen *msa-1* indica como posible grupo origen a los aislados argentinos, ya que esta rama cuenta con una consistencia aceptable, no es así para el resto del árbol. Existe una separación poco consistente en donde se desprende el resto de las secuencias americanas de todas las secuencias australianas, excepto por el aislado Veracruz 1 el cual podría indicar la ruta de entrada a México, pues el aislado se obtuvo de

una zona ubicada en la costa del Golfo de Mexico. Sin embargo, en general los datos de robustez en las ramas son muy bajos, por lo que este filograma es poco informativo.

El filograma generado a partir de la región hipervariable de la subunidad pequeña del gen ribosomal (Figura 20), fue estadísticamente poco significativo. En general las secuencias se agrupan de manera muy parecidas. El análisis no logra distinguir las diferencias entre un aislado y otro, agrupa a la secuencia europea (Bbcow) junto con dos aislados mexicanos y a uno de los aislados del sur de África con la secuencia China y con el resto de los aislados mexicanos. Debido a esto el árbol no nos da información confiable. El origen australiano, se mantiene, con la secuencia australiana (M87). Sin embargo, nuevamente de manera general se puede concluir que este filograma es poco informativo.

Los filogramas obtenidos a partir de las secuencias del gen *ssrRNA* proporcionaron poca información debido quizá a la alta conservación de este gen (94%). Existen reportes de que se necesita una variabilidad “media” (Eguiarte *et al.*, 1999) para realizar análisis filogenéticos. Por lo tanto debido a la alta conservación del gen *ssrRNA* y a la baja variabilidad del gen *msa-1* (47.7%), los árboles generados no proporcionan la información requerida.

Trabajos realizados con *Anaplasma marginale* proponían a los genes de superficie *msh-4* y *msh-1a* como candidatos para realizar trabajos de filogeografía (de la Fuente *et al.*, 2003), pero al paso del tiempo y de hacer más trabajo experimental determinaron que la variabilidad del gen *msh-1a* era muy alta para realizar filogeografía y solo el gen *msh-4* fue útil para este tipo de estudios filogenéticos (de la Fuente *et al.*, 2005).

La relación filogenética que se encontró entre aislados de Texas y de Argentina puede sugerir las rutas de intercambio comercial de bovinos que existen o que existieron en el pasado; rutas de intercambio comercial que no están documentadas en México y que probablemente han sido responsables del establecimiento de la Babesiosis en México. Esto podría ser prueba de la poca vigilancia que existió o existe a nivel frontera en cuanto a las enfermedades de los

bovinos adquiridos de otros países, control que es necesario optimizar tanto para el control de la Babesiosis como para otras enfermedades.

### **Genotipificación:**

La diversidad entre las secuencias de aminoácidos mostrada en el alineamiento múltiple y respaldada por el análisis filogenético dio pauta para la genotipificación de *B. bovis* a partir de las proteínas MSA-2b y MSA-2c predichas. Esta diversidad arrojó 5 y 2 genotipos, respectivamente, por cada gen a nivel mundial. MSA-2c sólo logra diferenciar a los aislados americanos de los australianos y MSA-2b además de la diferenciación a nivel continental, también logra identificar tres genotipos mexicanos, generados a partir de presencia de la delección o inserción detectadas en las secuencias estudiadas y respaldados por el análisis filogenético. La propuesta de agrupación de tres genotipos mexicanos fue determinada por la delección o inserción detectada en los alineamientos. Este carácter se conserva dentro de los grupos formados y dado que se encontró en la secuencia de una proteína variable de la superficie es probable que esta distribución que hoy se encontró varió con el tiempo, como se observó con los genotipos del virus de la *Estomatitis Vesicular* del ganado, en donde han observado que los genotipos cambian cada 8 años aproximadamente (Rodríguez *et al.*, 1996).

En total, se proponen 7 genotipos diferentes generados por dos genes de superficie para caracterizar los aislados de *B. bovis*. Las diferencias encontradas fueron determinadas a partir de los alineamientos realizados. Se buscaron agrupamientos conservados de substitución en distintos aminoácidos en determinada posición, pero los cuales se repitieran constantemente entre los grupos.

La genotipificación de los organismos es elemental, pues permite clasificar a las diferentes cepas o aislados a nivel regional o determinar el origen o la ruta de migración o movimiento comercial del hospedero de *B. bovis*, como se ha realizado con el virus del dengue (Cisneros *et al.*, 2006) y con *Anaplasma*

*marginale*, tomando en cuenta genotipos generados a partir de regiones repetidas en las proteínas de superficie msp- $\alpha$  y msp-4 (de la Fuente et al., 2003).

La genotipificación propuesta en este trabajo, sería útil en el futuro para correlacionar el grado de virulencia o patogenicidad del ganado infectado por *Babesia bovis* de distintas regiones de México y poder prevenir algún brote de la enfermedad. Además se podrán utilizar como marcadores moleculares para la tipificación de cepas mexicanas en *Babesia bovis* a nivel regional o mundial.

## **Análisis proteico:**

El análisis realizado con las proteínas deducidas de MSA-2c y MSA-2b, confirmó el perfil de hidrofobicidad antes caracterizado por Florin-Christensen et al., (2002), en donde determinaron que estas proteínas son altamente hidrofílicas, con una región hidrofóbica que se ancla a la membrana del parásito.

En el presente trabajo se obtuvieron los perfiles de hidrofobicidad de los trece aislados por separado, sin embargo con la finalidad de hacer el trabajo más didáctico, se diseñó una figura en donde se observa el empalme de tres perfiles representativos. La figura 26 muestra el empalme de tres aislados representativos para la proteína MSA-2C con relación a los análisis filogenéticos, en los que se obtuvieron tres grupos de los cuales se tomó un aislado representativo de cada grupo (Mo7, Veracruz 1 y Chiapas 1). En términos generales, la figura reveló que se conserva el perfil en la mayoría de los aislados mexicanos; De igual manera fue posible determinar la región de mayor variabilidad (Figura 26).

La figura 25 muestra el empalme de tres aislados representativos de los aislados mexicanos (Veracruz 1, México y Mo7), de los grupos obtenidos en el análisis filogenético para la proteína MSA-2b. En la misma figura 25 se muestra el posible sitio de recombinación propuesto por Florin-Christensen *et al.*, (2002). Se distinguen, también, la región de mayor variabilidad, la cual se encuentra entre las posiciones 157 y 200 de los residuos de aminoácidos, la cual, en comparación con la proteína MSA-2c, es mayor; y los dominios de glicosilación, los cuales aparentemente le confieren a la proteína el anclaje a la membrana del parásito. La proteína MSA-2C cuenta con dos dominios de glicosilación en las posiciones 34-

37 y 97-100. Estas posiciones están conservadas en los 13 aislados estudiados (Figura 26).

Para la proteína MSA-2b sólo se obtuvo un dominio de glicosilación en la posición 161-164 para el grupo 1 y el grupo 3, mientras que en el grupo 2 el sitio del dominio esta ligeramente desfasado en la posición 164-168, posiblemente por las diferencias de longitudes detectadas desde la secuencia primaria. Pese a ésto, la proteína sigue conservando los dominios más importantes para un supuesto adecuado funcionamiento.

Con el análisis filogenético obtenido a través de las secuencias de genes (*msa-2b*, *msa-2c*, *msa-1* y *ssrRNA*) de aislados mexicanos de *Babesia bovis* fue posible obtener grupos evolutivamente relacionados a partir de clados generados de los árboles filogenéticos, proponiendo el primer análisis filogenético con *Babesia bovis*. Así como también la obtención de genotipos sugeridos para la clasificación de la Babesiosis y los aislados o cepas presentes en la enfermedad, acierto relevante, ya que es la primera aproximación para tratar de genotipificar al organismo, datos que posteriormente podrían ser útiles para correlacionar al genotipo del parásito con respecto a su patogenicidad y abrir otra alternativa para el control de la enfermedad.

## CONCLUSIONES:

Los alineamientos realizados con los genes *msa-2b*, *msa-1*, *msa2-c* y ribosomal de *Babesia bovis*, sugieren una homología consenso de 72.3% para el gen *msa-2b*; 47.7% para el gen *msa-1*; de 87.7% para el gen *msa-2c* y de 94% para el gen *ssrRNA*.

Los alineamientos realizados con las secuencias de las proteínas predichas de MSA-2B presenta el 63.2 % de homóloga consenso, a diferencia del 81.1%.en MSA-2C.

El análisis filogenético sugiere que los aislados se agrupan en clados de acuerdo a su origen: Americano o Australiano.

El árbol filogenético realizado a partir del gen *msa-2b* mostró mayor grado de certeza y de robustez en sus ramas a diferencia de los árboles obtenidos con los genes *msa-2c*, *msa-2b*, *msa-1* y *ssrRNA*.

A partir del análisis filogenético y de los alineamientos de aminoácidos se determinaron 7 genotipos de *B. bovis*:

- Con MSA-2b se logaron determinar 5 genotipos.
- Con MSA2-c se determinaron 2 genotipos.

Al utilizar estos genes no fue posible relacionar la evolución con la distancia geográfica en los aislados mexicanos.

La variación de las secuencias puede ser el resultado de la presión evolutiva diferencial entre los genes de superficie (*msa-1*, *msa-2b* y *msa2c*), o resultado del movimiento, debido al comercio del ganado bovino.

## PERSPECTIVAS:

En este trabajo se llevó a cabo un análisis filogenético con las secuencias de los genes de la familia de antígenos variables de la superficie del merozoito, los cuales son relevantes en el proceso de invasión al eritrocito.

A partir de este análisis se detectaron genotipos o marcadores genéticos específicos para aislados de distintas regiones del mundo ya que anteriormente no se contaba con una clasificación de estos parásitos.

Además de obtener grupos de aislados dentro de nuestro país con un elevado porcentaje estadísticamente significativo, las cuales se podrían describir como rutas de comercio ganadero.

Dada la importancia descrita anteriormente resulta conveniente el continuar con esta línea de investigación, colocando particular énfasis en la realización de experimentos tales como:

- La discriminación de cepas o aislados mexicanos a partir de los genotipos obtenidos a partir del gen *msa-2b*.
- Los genotipos mexicanos se podrán correlacionar con la patogenicidad del parásito para lograr un control más eficiente de la enfermedad.
- Realizar estudios de variabilidad genética de *B. bovis* dentro de un mismo individuo infectado, o entre poblaciones animales de un mismo hato, de distintos ranchos en regiones productoras de bovinos.
- Realizar un análisis filogenético de la estructura tridimensional de las proteínas MSA-1, MSA-2b y MSA-2c, para relacionarla con la función.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Allred D.R., 2003. Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Trends in Parasitol.* 19: No. 2. 51-54.
- Allred D.R., 2001. Molecular technology and antigenic variation among intraerythrocytic hemoparasites: do we see reality?. *Vet. Parasitol.* 101: 261-274.
- Allred D.R., Carlton J.M., Satcher R.L., Long J.A., Brown W.C., Patterson P.E., O'Connor R.M., Stroup S.E. 2000. The *var* multigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. *Mol. Cell. Biol.* 5(1):153-62.
- Allred D.R., Al-Khedery B 2006. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. *Vet Parasitol.* 138:50-60.
- Allsopp M.T., Cavalier-Smith, T., de Waal, D.T., Allsopp, B.A. 1994. Phylogeny and evolution of piroplasms. *Parasitology.* 108 :147-152
- Barbour A.G., Restrepo B.I. 2001. Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 7:486.
- Berens S., Brayton K.A., Molloy J.B., Bock R., Lew A.E., McElwain F. 2005. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect. Immun.* 73: 7180-7189
- Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitol.* 129: s247-s269.
- Bork S., Yokohama N., Matsuo T., Claveria F.G., Fujisaki K. 2003. Clotrimazole, Ketoconazole, and Clodinafop-propargyl inhibit the in vitro growth of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* (Phylum Apicomplexa). *Parasitol.* 127: 311-315.

- Bork S., Yokohama N., Ikehara Y., Kumar S., Sugimoto C., Igarashi I. 2003. Growth-inhibitory effect of heparin on *Babesia* parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 236-241.
- Bork S., Okamura M., Boonchit S., Hirata H., Yokohama N., Igarashi, 2004. Identification of *Babesia bovis* L-lactate dehydrogenase as a potential chemotherapeutical target against bovine babesiosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136:163- 172.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T.P., Gorenflot, A. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by restriction fragment length polymorphism analysis on small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:298-303.
- Chae, J., Lee, J., Kwon, O., Holman, P.J., Waghela, S.D., Wagner, G.G. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer. *Vet. Parasitol.* 75:41-52.
- Cisneros A., Diaz-Badillo A., Cruz-Martinez G., Tovar R., Ramirez-Palacios L.R., Jimenez-Rojas F., Beaty B., Black W.C., de Lourdes Munoz M. 2006. Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Arch. Virol.* 151:113-25.
- Dalrymple B. 1990. Cloning and characterization of the rRNA gene and flanking regions from *Babesia bovis*: use of the genes as strain discriminating probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43:117-124.
- Dalrymple B.P., Dimmock C.M., Parrodi F., Wright I.G. 1992. *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*: Comparison of ribosomal RNA gene organization. *Int. J. Parasitol.* 22:851-855.

- De la Fuente, J., Massung, R., Wong, S., Chu, F., Lutz, I., Meli, M., von Loewenich, D., Grzerzczuk, A., Naranjo, V., Sttuen, S., Kocan, K. 2005. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. J.Clin. Microbiol. Mar;43:1309-17.
- Domínguez M., Zabal O., Wilkowsky S., Echaide I., Torioni de Echaide S., Asenzo G., Rodríguez A., Zamorano P., Farber M., Suarez C., Florin-Christensen M. 2004. Use of a monoclonal antibody against *Babesia bovis* merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive ELISA test. Ann. New York Acad. Sci. 1026: 165-170.
- Dzikowski R, Templeton T.J., Deitsch K. 2006. Variant antigen gene expression in malaria. Cell Microbiol. 8:1371-81.
- Egea N., Lang-Unnasch N. 1996. Phylogeny of large extrachromosomal DNA of organisms in the Phylum *Apicomplexa*. J. Eukaryot, Microbiol. 43:158-163.
- Eguiarte, L., Souza, V., Nuñez-Farfán, J., Hernandez-Baños B. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. Bol. Soc. Bot. México 60:169-181.
- Eligio L., Jiménez E., Galván S. 2002. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. Rev. Invest. Clín. 54 :113-118.
- Ellis J., Herdford C., Baverstock P.R., Dalrymple B.P., Johnson A.M. 1992. Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. Mol. Biochem. Parasitol. 54: 87-95.
- Ellis J., Griffin H., Morrison D., Johnson A. M. 1993. Analysis of dinucleotide frequency and codon usage in the phylum Apicomplexa. Genes. 126:163-170

- Figueroa 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.
- Franssen F.F.J., Gaffar F., Yatsuda A.P., Vries E. 2003. Characterisation of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing. *Microb. Infect.* 5:365-372.
- Florin-Christensen M., Suarez C., Hines S.A., Palmer G., Brown W.C., McElwain F. 2002. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect. Immun.* 70:3566-3575.
- Futuyma, D. 1997. *Evolutionary Biology*. Third Edition. Sinauer Associates. USA.
- Gaffar F.R., Franssen F.J., Vries, E. 2003. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. *Int. J. Parasitol.* 33:1595-1603.
- Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.F.J., Vries E. 2004a. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 72 :2947- 2955.
- Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.J., Vries, E. 2004b. 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.

- Graur, D., Li, W. 1999. Fundamentals of molecular evolution. Second edition Sinauer associates, INC., publishers. Sanderland, Massachsetts.
- Georges K., Loria G.R., Riili S., Greco A., Caracappa S., Jongejan F., Sparagano O. 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet. Parasitol.* 99:273-286.
- Gozar M.M., Bagnara A. 1993. Identification of a *Babesia bovis* gene with homology to the small subunit ribosomal RNA gene from the 35-kilobase circular DNA of *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 23:145-148.
- Gozar M.M., Bagnara A. 1995. An organelle-like small subunit ribosomal RNA gene from *Babesia bovis*: Nucleotide sequence, secondary structure of the transcript and preliminary phylogenetic analysis. *Int. J. Parasitol.* 25:929-938.
- Gubbels J.M. Vos A.P., Weide M.V., Viseras J., Schouls L.M., Vries E., Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37:1782-1789.
- 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.
- Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R., Krause P.J., Persing D.H. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 451-469.
- Hotzel I., Suarez C., McElwain T.F., Palmer G.H. 1997. Genetic variation in the dimorphic regions of *rap-1* genes and *rap1* loci of *Babesia bigemina*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90:479-489.

- Jones S.H., Lew A., Jorgensen W.K., Barker S. 1997. *Babesia bovis*: Genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridization. *Int. J. Parasitol.* 27: 1569-1573.
- Kocan, k., De La Fuente, J., Blouin, E., Garcia-Garcia J. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology.* 129:285-300.
- LeRoith T., Brayton K.A., Molloy J.B., Bock R.E., Hines S.A., Lew A., McElwain T.F. 2005. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect. Immun.* 73:5388-5394.
- Le Roith, T., Berens, S., Brayton, K., Hines, S., Brown, W., Norimini, J., McElwain, T. 2006. The *Babesia bovis* merozoite antigen I hypervariable region induces surface-reactive antibodies that block merozoite invasion. *Infect. Immun.* 74:3663-3667.
- Lew A.E., Dluzewski A.R., Jonson A.M., Pinder J.C. 2002. Myosins of *Babesia bovis*: Molecular characterization, erythrocyte invasion, and phylogeny. *Cell Mot. Cytoskel.* 52:202-220.
- Lew, A., Jorgensen, W., 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *African Journal of Biotechnology.* 4:292-302.
- Luo, J., Yin, H., Liu, G., Guan, G.Z., Yang, D., Liu, A., Ma, M., Liu, Z., Dang, Z., Liu G., Bai, Q., Lu, w., Chen, P. 2005a. A comparison of small-subunit ribosomal RNA gene sequences of bovine *Babesia* species transmitted by *Haemaphysalis* sp in China. *Parasitol. Res.* 95:145-149.

- Luo, J., Yin, H., Liu, Z., Yang, D. Guan, G., Liu, A., Ma, M., Dang, S., Lu, B., Sun, C., Bai, Q., Lu, w., Chen, P. 2005b. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* 133:1-6.
- Pays E. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. 2005. *Trends Parasitol.* 21:517-20.
- Proudfoot C., McCulloch R. 2005. Distinct roles for two RAD51-related genes in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Nucleic Acids Res.* 2;33:6906-69019.
- Mascorro, C., Zhao, K., Khuntirat, J., Sattabongkot, G., Yan, A., Escalante, A. Cui I. 2005. Molecular evolution and recombination of the merozoite surface protein MSP-3 $\alpha$  from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. *Parasitology.* 131:25-35.
- Martinez A.R., Sanchez C., Hernandez S., Navarrete J., Diez P., Quiroz H., Carvalho M. 1999. *Parasitologia Veterinaria*. Ed. Mcgraw Hill – Interamericana. Cap. 19:283-302 pp.
- Mehlhorn, H., Schein S. 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol* 23:37-103.
- Mosqueda J., McElwain T.F., Palmer G.H. 2002a. *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.
- Mosqueda J., McElwain T.F., Stiller D., Palmer G.H. 2002b. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. 2002. *Infect. Immun.* 70:1599-1603.

- Mosqueda J.J., Ramos J.A., Falcón, A., Figueroa J.V., Alvarez J.A. 2004. Babesiosis bovina. Folleto Tecnico No. 1, CENID-PAVET, INIFAP.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford, university press, Inc. USA
- Nevils M.A., Figueroa J.V., Turk J.R., Canto G.J., Eilersieck V.M., Carson C.A. 2000. Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. Parasitol. Res. 86:437-443.
- Norimine J., Mosqueda J., Suarez C., Palmer G.H., McElwain T.F., Mbassa G., Brown W. C. 2003. Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. Infect. Immun. 71:5021-5032.
- Norimine J., Suarez C., McElwain T.F., Florin-Christensen M., Brown W. 2001. Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4+T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. Infect. Immun. 70:2039-2048.
- O'Connor R.M., Lane T.J., Stroup S.E., Allred D.R. 1997. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. Mol. Biochem. Parasitol. 89:259-70.
- Oura C.A.L., Bishop R.P., Wampande E.M., Lubega G.W., Tait A. 2003. Application of reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. Int. J. Parasitol. 34:603-613.

- Palmer G.H., McElwain T.F., Perryman L.E., Davis W.C., Reduker D.R., Jasmer D.P., Shkap V., Pipano E., Goff W.C., McGuire T. 1991. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect. Immun.* 59:3340-3342.
- Reddy G.R., Chakrabarti D., Yowell C.A., Dame J.B. 1991. Sequence microheterogeneity of the three small subunit ribosomal RNA genes of *Babesia bigemina*: expression in erythrocyte culture. *Nucleic Acids Res.* 19:3641-3645.
- Reddy G.R., Dame J.O. 1992. rRNA-Based method for sensitive detection of *Babesia bigemina* in bovine blood. *J. Clin. Microbiol.* 30:1811- 1814.
- Regueiro, J. R., Lopez, C., González, S., Martínez, E. 2004. *Inmunología, Biología y patología del sistema inmune*. Ed. Panamericana 3ra Edición. Madrid España.
- Riek, R. 1996. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (sporozoa: piroplasmida) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J. Agric. Res.* 17: 247-254.
- Ristic M., Kreier J. 1991. *Babesiosis*. Academic Press. Cap. 14, pp. 445-4457.
- Rodriguez, L., Fitch, W., Nichol, S. 1996. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1330-1335.
- Sahagún 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.* 30:59-64.
- Rougemont, M., Van Saanen, M., Sahili, R., Hinrikson, H.P., Bille, J., Jatou, K. 2004. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit and species-specific real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42:5836-5643

- Shin-Hyeong C., Tong-Soo K., Hyeong-Woo L., Masayoshi T., Chiaki I., Jong-Taek K., Sung-Taek K., Sung-Hwan W., Chung-Gil L. 2002. Identification of newly isolated *Babesia* parasites from cattle in Korea by using the Bo-RBBC-SCID mice. Korean J. Parasitol. 40:33-40.
- Standfast N.F., Bock R.E., Wiecek M.M. Vos A., Jorgensen W.K., Kingston T.G. 2003. Overcoming constraints to meeting increased demand for *Babesia bigemina* vaccines in Australia. Vet. Parasitol. 115:213-222.
- Schouls L.M., van der Heide H.G., Van Embden J.D. 1991 Characterization of the 35-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* recombinant lipoprotein TmpC and antibody response to lipidated and nonlipidated *T. pallidum* antigens. Infect Immun.59:3536-46.
- Suarez M., Castellano R., Pelaez M., Martinez, M. 1997. Pesquisaje de *Babesia* en trabajadores agropecuarios y donantes en la provincia de Ciego de Ávila. Rev. Cubana de Ciencias. 49:130-135.
- Suarez C.E., Florin-Christensen M., Hines S.A., Palmer G.H., Brown W., McElwain, T.F. 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. Infect. Immun. 68:6665-6670.
- Uilenberg, G. 2006. *Babesia* - a historical overview. Vet. Parasitol. 138:3-10
- Yokoyama N., Suthisak B., Hirata H., Matsuo T., Inoue N., Sugimoto C., Igarashi I. 2002 Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte binding activity. Infect. Immun. 70:5822-5826.

Wilkoswsky S.E., Farber M., Echaide I., Torioni de Echaide S., Zamorano P.I., Dominguez M., Suarez C.E., Florin-Christensen M. 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.