

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

***“Determinación de la participación de la proteína HAP2
en la fusión de fases sexuales de Babesia bigemina”***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

María Elena Paredes Martínez

Directora de tesis

Dra. Minerva Camacho Nuez

México, D.F. Abril, 2015

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora-Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Profesor-Investigador

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma de Querétaro

ASESORES

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesora-Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

Investigadora titular

CENID Fisiología y Mejoramiento Animal

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas Y Pecuaria

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica de Agentes Infecciosos de Importancia Veterinaria del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la tutoría de la Dra. Minerva Camacho Nuez y en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Campus Aeropuerto y en la Nave de Infectómica Animal, Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo tutoría del Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

El alumno recibió una beca CONACYT durante la realización de su proyecto de maestría (No. de apoyo 320894).

Así mismo, este proyecto fue financiado por SECITI a través del convenio UACM/SECITI/060/2013, por la UAQ a través del programa de Fortalecimiento a la Investigación 2012 y PROMEP Redes Temáticas 2012-2014.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico y económico recibido durante la realización de mi maestría.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por los conocimientos que compartió conmigo durante la realización de este proyecto, por su tiempo, su esfuerzo y su paciencia para que el proyecto saliera adelante.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda por ser un importante pilar de sostén durante mi formación como maestra en ciencias, por las enseñanzas, por la motivación que me proporcionó en los momentos de incertidumbre, por la confianza que tuvo en mí y todo el apoyo que me brindó en los momentos más difíciles.

A mis padres y a mi hermano que siempre me han apoyado, en cada paso durante mi desarrollo como persona y como profesionista, que siempre me han dado palabras de aliento y de consuelo. A ustedes, por sus consejos sabios y sobre todo por su fe en mí.

A mis amigos y compañeros, que hicieron de esta etapa de mi vida una experiencia única e inolvidable. Gaby por siempre estar ahí para mí. Dante, Elizabeth, Elba, Argelia, Yolanda, Lucia, Claudia, Maira, por el apoyo en el laboratorio, por las risas, los consejos y su amistad, ustedes son mi segunda familia. Adolfo, Uriel, Rodrigo, Ricardo, Jaqueline, José Luis, por el apoyo en la realización de mis experimentos y por su tiempo en el laboratorio.

A todos los profesores del posgrado que me transmitieron el conocimiento que me permitió llegar tan lejos.

¡GRACIAS!

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	La babesiosis bovina.....	1
2.	La babesiosis ocasionada por <i>B. bigemina</i>	3
	Signos Clínicos	3
	Distribución geográfica de la babesiosis en México	3
	Control de la babesiosis.....	4
3.	Vacunas Bloqueadoras de la transmisión	7
4.	Características de <i>Babesia bigemina</i>	9
	Clasificación taxonómica de <i>B. bigemina</i>	9
	Estructura de los parásitos apicomplexos.....	9
	Ciclo de vida del parásito.....	11
	Ciclo de vida en el bovino.....	12
	Genoma de <i>Babesia</i> spp.	14
	Familias de Proteínas de <i>Babesia</i> spp.....	15
5.	Antecedentes directos	21
	Proteína HAP2 en protozoarios	21
	HAP2 en <i>Babesia bigemina</i>	25
6.	Importancia de estudiar la participación de HAP2 en la fusión de fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	26
II.	HIPÓTESIS.....	28
III.	OBJETIVOS	28
IV.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.	Material biológico.....	30
	Cepas de <i>E. coli</i>	30
	Cepa de <i>Babesia bigemina</i>	30
	Obtención de fases asexuales de <i>B. bigemina</i>	30
	Obtención de fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	31

2.	Expresión de la proteína HAP2	31
	Síntesis del fragmento de DNA de <i>hap2</i>	31
	Subclonación en pCold.....	32
3.	Transformación de células BL21 con clona positiva.....	32
4.	Inducción de la expresión.....	33
5.	Análisis de la inducción de la expresión	33
6.	Diseño de péptidos conteniendo epítomos B de HAP2 de <i>B. bigemina</i>	34
7.	Producción de anticuerpos	35
8.	Inmunodetección de HAP2 del parásito	36
	Inmunoelectrotransferencia	36
	Inmunofluorescencia Indirecta	37
9.	Inhibición de la fusión de fases sexuales.	37
10.	Cuantificación del contenido de DNA.	38
VI.	RESULTADOS	40
1.	Expresión de la proteína HAP2 extracelular	40
2.	Diseño de péptidos sintéticos con epítomos B conservados	43
3.	Inmunodetección de HAP2 mediante Inmunoelectrotransferencia	47
4.	Inmunodetección de HAP2 mediante Inmunofluorescencia Indirecta.....	48
5.	Inhibición de la fusión de fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	52
VII.	DISCUSIÓN.....	56
VIII.	CONCLUSION.....	63
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
X.	APÉNDICE	i
1.	SOLUCIONES	i

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del vector <i>Rhipicephalus</i> en México .	4
Figura 2. Esquema del funcionamiento de una vacuna bloqueadora de la transmisión en un modelo de malaria en ratón.	7
Figura 3. Estructura de los parásitos apicomplexos..	10
Figura 4. Ciclo de vida de <i>B. Bovis</i>	13
Figura 5. Comparación entre HAP2 de diferentes organismos..	20
Figura 6. Estructura primaria de HAP2 en diferentes especies de <i>plasmodium</i>	21
Figura 7. HAP2 es esencial para el desarrollo sexual de <i>p. Berghei</i> en el mosquito..	22
Figura 8. Tasa de infección y eficiencia de transmisión de parásitos con mutación en <i>hap2</i>	23
Figura 9. Anticuerpos contra HAP2 interrumpen el ciclo de vida de <i>p. Berghei</i> . ..	24
Figura 10. Digestión enzimática de PBDT-smart- <i>bam</i> hl- <i>hap2</i> excel- <i>xba</i> I.....	40
Figura 11. Inserto purificado de gel y digestión enzimática de pCold.....	41
Figura 12. Digestión enzimática de pCold para verificar la presencia del inserto..	42
Figura 13. Análisis de la secuencia obtenida a partir del plásmido purificado.....	42
Figura 14. Ubicación de los diferentes elementos de HAP2 en la secuencia predicha de la proteína.	45
Figura 15. Verificación de la conservación de los péptidos seleccionado en cepas de diferentes partes del mundo de <i>B. Bigemina</i>	46
Figura 16. Inmunodetección de HAP2 utilizando los anticuerpos contra el péptido 1 en extractos totales de fases sexuales.	47
Figura 17. Tinción de giemsa de las fases sexuales inducidas <i>in vitro</i>	48
Figura 18. Identificación de la proteína HAP2 mediante el uso de anticuerpos contra péptidos específicos.	50
Figura 19. Identificación de la proteína hap2 en fases intraeritrocíticas.	51
Figura 20. Gráficas que permiten visualizar la distribución de los núcleos cuantificados al incubar con α -antipéptido1 y al incubar con α -antipéptido3. .	54

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características generales del genoma de <i>b. Bovis</i> (adaptado de brayton y cols., 2007).	14
Cuadro 2. Variación en el número de nucleótidos del gen <i>hap2</i> de diferentes cepas de <i>b. Bigemina</i> (rocha, 2010).	25
Cuadro 3. Criterios para la selección de péptidos	34
Cuadro 4. Resultados de los valores predictivos que cada algoritmo otorga a la secuencia de aminoácidos analizada.	44
Cuadro 5. Secuencias de los péptidos seleccionados que fueron mandados a sintetizar	44
Cuadro 6. Localización de las diferentes regiones de <i>hap2</i> y de los péptidos seleccionados. Se indica el aminoácido de inicio y de término de cada región y péptido.	45
Cuadro 7. Cantidad de núcleos encontrados en los cuatro grupos de intensidades identificados a las 36 horas postinducción.....	53

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1. La babesiosis bovina

La babesiosis es una enfermedad que afecta a un amplio rango de animales y ocasionalmente al hombre. Esta enfermedad, provocada por parásitos protozoarios intraeritrocíticos obligados del género *Babesia*, es transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae y se caracteriza por producir hemólisis además de fiebre, depresión, anemia, hemoglobinuria, ictericia y ocasionalmente llega a causar la muerte (McCosker, 1981; Barros y Figuera, 2008; OIE, 2009).

El primer reporte de esta enfermedad ocurrió en Rumania en el año de 1888, cuando el Médico humano Víctor Babes se encontraba estudiando una enfermedad que afectaba al ganado bovino de esta región, la cual ocasionaba brotes cada verano y como signo característico se encontraba la presencia de hemoglobina en la orina. Cuando Babes observó la sangre de los animales enfermos, visualizó microorganismos similares a cocos en pares, en el interior de los eritrocitos y al teñirlos con violeta de genciana pudo apreciar como los dos microorganismos tenían una forma de pera y estaban sostenidos por un filamento en la región angular, que se formaba entre ambos. El bazo también tenía grandes depósitos de glóbulos rojos con cocos y observó que cuando la sangre de un animal enfermo era utilizada para inocular un toro sano, éste enfermaba. Hasta ese momento el agente causal fue identificado como una bacteria denominada *Haematococcus bovis* (Babes, 1888).

En años posteriores, en Estados Unidos, Theobald Smith y Frederick Kilbourne se dedicaron a investigar la fiebre de Texas. Ellos determinaron que esta enfermedad era transmitida por garrapatas y que el agente causal no era una bacteria sino un protozooario que se encontraba en pares dentro de los glóbulos rojos y por ello lo nombraron *Pyrosoma bigeminum*. Cuando compararon los hallazgos patológicos y

los signos observados por ellos con los reportados por Babes en los becerros enfermos, pudieron determinar que se trataba de la misma enfermedad reportada en Rumania (Smith, 1893). Sin embargo no fue hasta años más tarde que el parásito fue nombrado como *Babesia* en honor a Víctor Babes, quien fue el primero en describirlo. Actualmente se sabe que los reportes de la enfermedad en Rumania correspondían a *Babesia bovis* y que los reportes de la fiebre de Texas correspondían a *Babesia bigemina* (Bock, 2004).

Posterior a la publicación de Smith y Kilbourne se detectó la babesiosis en varios países del mundo donde era conocida como Agua roja, Tristeza bovina, Piroplasmosis, Fiebre de Garrapata, Fiebre del ganado, entre otros. Ahora se sabe que la babesiosis puede encontrarse en cualquier lugar donde exista el vector, siendo éste común en áreas tropicales y subtropicales. Las especies de mayor importancia económica, identificadas en el ganado bovino son: *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*. Sin embargo, tanto *B. bovis* como *B. bigemina* tienen mayor importancia en Asia, África, Centro y Sudamérica, Sudeste de Europa y Australia, debido a la amplia distribución de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (antes, *Boophilus microplus*) que trasmite ambas especies de *Babesia* (De Vos, 1992; Bock, 2004; Vignau, 2005; OIE, 2009). En México la presencia de las garrapatas *R. annulatus* y *R. microplus*, determina la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* (Callow y cols, 1997; Bock y cols, 2004; Quiroz, 2005).

Datos obtenidos en 1990 ya estimaban que cerca de 300 millones de bovinos a nivel mundial corrían riesgo de infectarse con *B. bovis* y *B. bigemina* reflejando el impacto económico que la babesiosis tenía en la ganadería (Wright, 1990). Los costos ocasionados por la presencia de babesiosis bovina en el ganado no se han estimado recientemente, pero información recabada en 1975 estimaba que las pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad eran de 186 millones de dólares (Beltrán, 1975). El impacto económico mencionado provocado por la babesiosis se debe a la mortalidad del ganado, los abortos, la disminución en la producción de carne y leche, principalmente. Sin embargo, los costos de acaricidas, costos de tratamientos contra *Babesia*, costos de vacunación y las

restricciones para la movilización de animales también ocasionan el aumento en la pérdida económica derivada de la enfermedad (Bock y cols, 2004). Finalmente, aunque *B. bovis* es considerada más peligrosa (Callow y cols 1997), *B. bigemina* también provoca una enfermedad aguda y en casos clínicos de campo, usualmente ambas especies están presentes al mismo tiempo (Mosqueda y Castro, 2007).

2. La babesiosis ocasionada por *B. bigemina*

Las manifestaciones clínicas ocasionadas por la babesiosis bovina dependen del agente del que se trate, *B. bovis* o *B. bigemina*. Para el caso de la babesiosis ocasionada por *B. bigemina* los signos se presentan de 2 a 3 semanas después de la infestación por garrapata, ya que esta especie es transmitida solo por las ninfas y garrapatas adultas. El periodo de incubación, una vez que el parásito es inoculado por la garrapata al bovino, puede variar de 4 a 5 días (Barros y Figuera, 2008).

Signos clínicos

La infección por *B. bigemina* produce diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la virulencia y patogenicidad de la cepa. Los signos característicos se deben a la anemia y la hemólisis. Los más comúnmente presentados son: fiebre de hasta 41°C, anorexia, debilidad, depresión, mucosas pálidas, frecuencia cardíaca alta, frecuencia respiratoria elevada, hemoglobinemia, hemoglobinuria, aborto en hembras gestantes. En machos se observa una baja temporal de la fertilidad (Barros y Figuera, 2008; OIE, 2009).

Distribución geográfica de la babesiosis en México

Dado que *B. bigemina* requiere de la garrapata para completar su ciclo de vida, las zonas libres del vector también se consideran libres de babesiosis. En México la presencia de las garrapatas *R. annulatus* y *R. microplus*, determina la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* (Callow y cols, 1997; Bock y cols, 2004). Según los

últimos datos reportados por SENASICA en el 2014 (Figura 1), el vector está ampliamente distribuido en el país en zonas tropicales, subtropicales y templadas (áreas en color rojo en la Figura 1). Lo anterior, implica que de los 32,936,334 millones de cabezas de bovinos del país, el 75% se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad (SIAP, 2012).



Figura 1. Distribución del vector *Rhipicephalus* en México (SENASICA, 2014).

Control de la babesiosis

Las medidas para controlar la enfermedad siguen siendo limitadas a pesar de que se han abordado diferentes estrategias. A la fecha, solo ha sido erradicada exitosamente de Estados Unidos mediante el control del vector transmisor de la

enfermedad y de una exigente normativa para la importación y exportación de ganado (Pengram y cols, 2000).

Actualmente, el control de la babesiosis bovina se realiza a través del uso de acaricidas con el objetivo de eliminar la población de garrapatas, la vacunación de bovinos en riesgo, la administración de medicamentos derivados de acridinas, derivados de quinolonas y derivados de diamidinas (Kuttler, 1988; Bock y cols, 2004).

Un ejemplo del control de la población trasmisora de *Babesia* es la erradicación de la garrapata en Estados Unidos, sin embargo, la erradicación del vector solo se logra en zonas ecológicamente aisladas, por lo cual, el uso de acaricidas no es muy útil para el control de la garrapata debido a que la mejora genética del ganado en países en desarrollo requiere en la importación del ganado de mejor calidad, impidiendo el aislamiento ecológico de las regiones ganaderas (De Vos, 1992). Adicionalmente el uso de las sustancias garrapaticidas tienen consecuencias como la contaminación al medio ambiente y los residuos químicos que quedan en los productos de origen animal, como los residuos de foratos, clorpirifós y otros organofosforados que se han detectado en canales, vías fluviales e incluso en leche comercial (Salas y Cols, 2003).

Otra medida de control para la babesiosis es el uso de especies de bovinos resistentes a la infestación con garrapatas, el cual consiste en aprovechar que los bovinos *Bos indicus* tienen pieles más resistentes que disminuyen la infestación, mientras que los bovinos *Bos taurus* suelen infestarse con mayor facilidad. Esta medida no resulta tan atractiva para los productores debido a que las razas *B. taurus* suelen tener tasas de producción más elevadas que las razas de bovinos *B. indicus* (Jonsson, 2006).

El uso de medicamentos con fines terapéuticos implica grandes gastos de manejo además del costo de los fármacos por si solos. En ocasiones los tratamientos

químicos no son empleados únicamente con fines terapéuticos, sino también como medidas profilácticas. A pesar de que el uso de medicamentos interfiere con la generación de inmunidad pues al ser empleado para eliminar el parásito y evitar el desarrollo de la enfermedad no se permite que el ganado produzca una respuesta inmune (Kuttler 1988; Bock y cols, 2004).

Además del gasto económico generado por los tratamientos, cuando el ganado es movilizado a zonas endémicas de la enfermedad, es recomendable realizar medidas profilácticas para prevenir la enfermedad y una de ellas es la vacunación. Existen diferentes tipos de vacunas contra la babesiosis bovina en el mercado. Un tipo de vacunas son las vivas atenuadas en las que se desconoce el mecanismo que confiere protección, sin embargo se ha sugerido que el parásito pierde la capacidad de expresar algunos genes durante el procesos de atenuación (Florin-Christensen y cols, 2014). El uso de vacunas vivas atenuadas empleadas hasta la fecha tiene limitantes, ya sea por el riesgo de transmitir enfermedades concurrentes, los pérdida de efectividad por problemas de manejo o el riesgo de reversión a la virulencia (Bock y cols, 2004; Cárdenas y cols, 2011).

Como alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas, se ha tratado de producir vacunas a partir de subunidades de *Babesia* spp, para ello se han realizado esfuerzos para identificar blancos vacunales presentes durante la interacción bovino-patógeno. Algunos de los blancos identificados han sido proteínas como MSA2, AMA1, VESA, RAP entre otros, sin embargo a partir de las vacunas no se ha generado la protección deseada, por lo que, a la fecha no existe una vacuna inactivada segura contra esta enfermedad, ni una vacuna recombinante contra la babesiosis bovina (Bock y cols, 2004; Mosqueda y cols, 2007; Cárdenas y cols, 2011; Florin-Christensen y cols, 2014).

Las vacunas bloqueadoras de la transmisión que existen, se han desarrollado con el objetivo de interrumpir el ciclo de vida de algunos parásitos protozoarios como *Plasmodium* spp., pero al ser una estrategia para el control de enfermedades

transmitidas por vector relativamente nueva, no existe ninguna vacuna de éste tipo contra la babesiosis bovina, por lo que es importante plantear esta estrategia como posible herramienta para el control de la babesiosis bovina.

3. Vacunas bloqueadoras de la transmisión

Para el control de las enfermedades transmitidas por vectores, como la Malaria, se están explorando nuevas medidas de control y una de las propuestas son las vacunas bloqueadoras de la transmisión. El objetivo de estas vacunas es evitar que el artrópodo transmisor se infecte, interrumpiendo el ciclo de vida del parásito (Hirai y Mori, 2010).

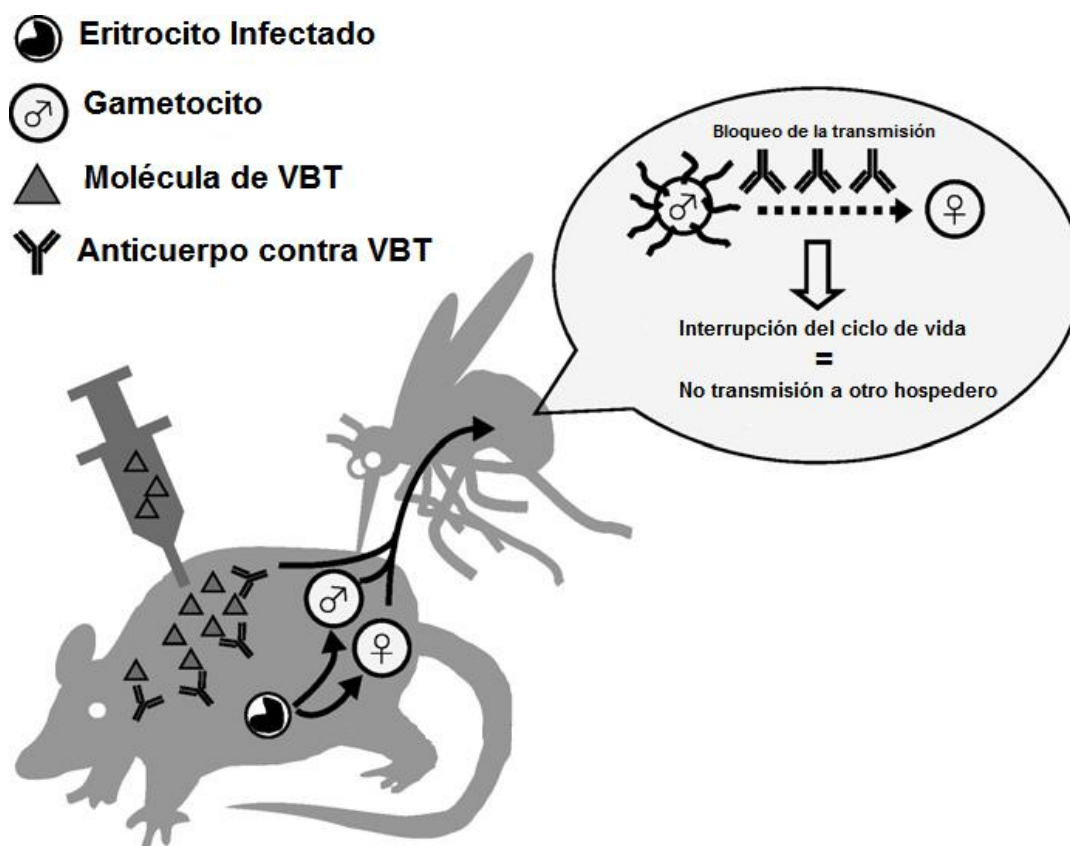


Figura 2. Esquema del funcionamiento de una vacuna bloqueadora de la transmisión en un modelo de Malaria en ratón (Tomado de Hirai y Mori, 2010).

El fundamento este tipo de vacunas bloqueadoras de la transmisión del patógeno se basa en identificar proteínas en la superficie de los estadios parasitarios que ocurren dentro del vector. La propuesta consiste en generar vacunas a partir del uso de dichas proteínas o de subunidades de las mismas e inocularlas en el hospedero vertebrado. El hospedero vertebrado generará anticuerpos contra dichas moléculas. Una vez que un vector no infectado se alimenta de la sangre infectada de un hospedero vertebrado inoculado con las proteínas, en su interior entran en contacto los anticuerpos del hospedero vertebrado con las proteínas del protozooario y de esta manera se bloqueará su función (Figura 2), al bloquear la función de dichas proteínas se espera que se interrumpa el ciclo de vida del parásito y de esta forma se evitará la infección del vector y consecuentemente se evitaría la transmisión a un nuevo hospedero vertebrado (Hirai y Mori, 2010).

Como candidatos para desarrollar este tipo de vacunas contra *Plasmodium* se encuentran diversas proteínas de la superficie del gameto, como las proteínas pfs48/45 y pfs230 que han demostrado ser buenos inmunógenos (Kaslow, 1997; Carter, 2001). Para el desarrollo de las vacunas bloqueadoras de la transmisión también se han estudiado algunas proteínas presentes en el vector como la alanyl aminopeptidasa N anophelina, específica de intestino (AnAPN1) que se presume es un importante ligando para la invasión de los ooquistos de *Plasmodium* al intestino del mosquito (Mathias y Cols., 2012).

La proteína HAP2 de *Plasmodium* se ha propuesto recientemente como candidato para este tipo de vacunas. HAP2 es una proteína de fases sexuales y tiene función en la fusión de las membranas de los gametos (Blagborough y cols 2009). En 2013, Miura y colaboradores lograron probar que proteínas como Pfs25, PFS230C y HAP2 de *P. falciparum* pueden inducir la producción de anticuerpos bloqueadores de la transmisión. Actualmente se sabe que existe un homólogo del gen *hap2* en *B. bigemina* y se desconoce su función (Rocha, 2010).

4. Características de *Babesia bigemina*

Clasificación taxonómica de *B. bigemina*

B. bigemina es un protozooario piriforme que mide 4.5 por 2 μm , pertenece al filo apicomplexa y se caracteriza por la presencia de un complejo apical en los estadios de esporozoito y merozoito. El complejo apical está formado por una serie de organelos que le sirven al parásito para la penetración a la célula blanco. Este parásito tiene un ciclo de vida complejo compuesto de un ciclo de reproducción sexual y uno de reproducción asexual (García, 2012; Petrigh, 2010). Estas características han permitido incluir a *B. bigemina* en la siguiente clasificación taxonómica (Levine, 1982):

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Phylum:	Apicomplexa
Clase:	Sporozoa
Subclase:	Piroplasmia
Orden:	Piroplasmida
Familia:	Babesiidae
Género:	<i>Babesia</i>
Especie:	<i>bigemina</i>

Estructura de los parásitos apicomplexos

Al ser un parásito apicomplejo, *B. bigemina* posee los organelos característicos de los microorganismos pertenecientes a dicho *phylum*. La Figura 3 muestra el esquema de la estructura de un merozoíto. El complejo apical se ha descrito como una prominencia cónica situada en un extremo de los parásitos apicomplexos

(Bannister y cols, 2003). En dicho complejo se sitúan las roptrías, gránulos densos para el caso de *Plasmodium* y cuerpos esféricos, para el caso de *Babesia* spp y además de los micronemas, organelos esenciales durante el proceso de invasión.

Las roptrías son las vesículas más grandes del complejo apical y descargan sus secreciones mediante unos ductos estrechos (Blackman y Bannister, 2001).

Los micronemas son producidos y translocados de la cisterna de Golgi hacia el complejo apical mediante los microtúbulos. Una vez en el complejo apical se sitúan cerca de la punta de las roptrías (Blackman y Bannister, 2001).

Los gránulos densos se sintetizan cerca de la Cisterna de Golgi, pero a diferencia de los micronemas no son transportados al complejo apical. Durante la invasión de la célula blanco tanto las roptrías como las micronemas descargan su contenido en la región donde el parásito está penetrando (Blackman y Bannister, 2001).

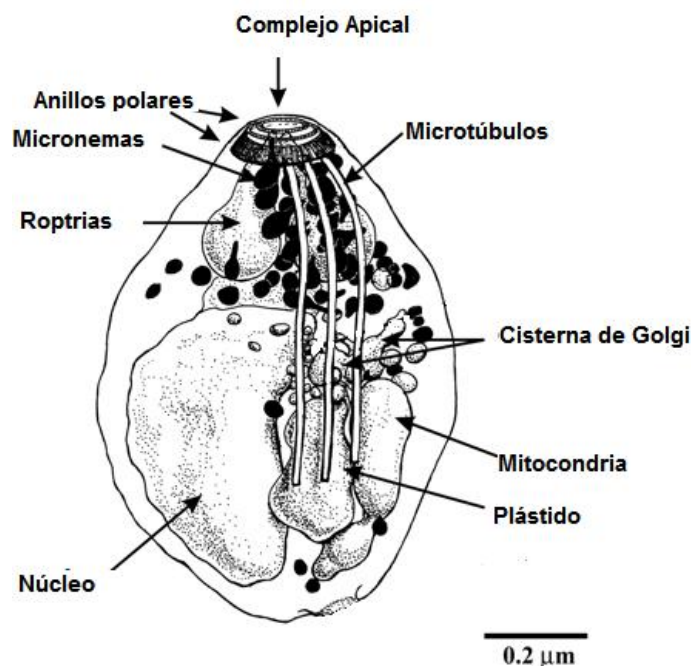


Figura 3. Estructura de los parásitos apicomplexos, basado en *Plasmodium* spp. Adaptada de Bannister y cols, 2003.

Otra característica adicional de estos parásitos apicomplexos es que poseen un plástido que es un organelo semiautónomo cuyo origen se supone a partir de un evento endosimbiótico secundario ocurrido durante su evolución. Este plástido ha sido denominado apicoplasto y posee un genoma que codifica para diversas proteínas (Brayton y cols, 2007).

Ciclo de vida del parásito.

A pesar de todos los estudios del desarrollo de *Babesia* spp., aún no se conoce su ciclo de vida completo con toda exactitud, lo cual hace necesario seguir realizando investigación para conocer con más detalle la biología del parásito, ya que se sabe que *B. bigemina* tiene un ciclo de vida complejo que requiere de un huésped invertebrado, la garrapata *Rhipicephalus*, donde se reproduce sexualmente y un huésped vertebrado, el bovino, donde realiza un ciclo de reproducción asexual (Bock y cols, 2004; Vignau, 2005, García, 2010). El ciclo de reproducción sexual inicia cuando una garrapata se alimenta de sangre de un bovino infectado con *B. bigemina* e ingiere los merozoítos que se encuentran al interior de los eritrocitos (Smith, 1978; Vignau, 2005). En la garrapata los eritrocitos se destruyen liberando las formas intraeritrocíticas de *Babesia* spp. en el lumen intestinal (Figura 4). Las condiciones ambientales de temperatura, pH y concentración de dióxido de carbono del intestino, permiten que muchos parásitos sean degradados pero los que sobreviven dan lugar a los microgametos y macrogametos responsables de producir la infección (Riek, 1964; Smith, 1978; Bock, 2004; Chauvin y cols, 2009; García, 2010). Antes de que los microgametos y macrogametos se desarrollen, aparecen estadios intermedios denominados “Strahlenkörper” o cuerpos radiados que forman conglomerados, los cuales son multinucleados se dividen por gametogonia y dan lugar a fases sexuales (Rudzinka y cols, 1983; Mackenstedt y cols, 1995; Chauvin y cols, 2009).

Una vez que las fases sexuales se han formado, ocurre la singamia, donde los gametos se fusionan produciendo un cigoto diploide (Vignau, 2005; Chauvin y

cols, 2009). El cigoto se convierte en una forma invasiva llamada oocisto, el cual, presenta un organelo en forma de flecha que utiliza para penetrar selectivamente las células intestinales de la garrapata y una vez en el interior de estas células dicho organelo se degenera. Posteriormente, por meiosis se genera una forma móvil llamada quineto, la cual es poliploide (Smith 1978; Mackenstedt y cols, 1995; Vignau, 2005; Chauvin y cols, 2009). Los quinetos o vermículos salen de las células intestinales hacia la hemolinfa y migran a través de ella a diferentes tejidos de la garrapata como los tubos de Malpigio, glándulas salivales, hemocitos y ovarios donde infectan los óvulos fecundados. En los ovarios se forman los esporoquinetos los cuales permanecen en estado latente en los tejidos embrionarios de la garrapata. *Babesia* spp. se reactiva hasta que la larva inicia su alimentación en el bovino y es entonces cuando los parásitos invaden las células de las glándulas salivales y ocurre un desarrollo terminal que produce un esporonte. A partir del esporonte se generan unas formas haploides denominadas esporozoitos y que son las formas infectivas para el hospedero vertebrado (Riek, 1964; Smith, 1978; Bock y cols, 2004; Chauvin y cols, 2009).

Ciclo de vida en el bovino.

Cuando una garrapata infectada se alimenta del bovino inocular los esporozoitos de *Babesia* spp. que estaban almacenados en las glándulas salivales (Bock y cols, 2004; Chauvin y cols, 2009). Los esporozoitos solo parasitan los eritrocitos del bovino y ahí desarrollan todos sus estadios (Bock y cols, 2004; Chauvin y cols, 2009). Una vez en la célula blanco, el esporozoito se transforma en trofozoito, pierde los organelos del complejo apical y por fisión binaria genera dos merozoítos, que contienen DNA haploide (Rudzinka, 1976; Mackenstedt y cols, 1995; Chauvin y cols, 2009). Al finalizar su desarrollo, los merozoítos inducen la lisis del eritrocito y de esta manera los merozoítos quedan libres en la sangre donde infectan nuevos eritrocitos y ocurren nuevos ciclos de reproducción asexual (Chauvin y cols, 2009).

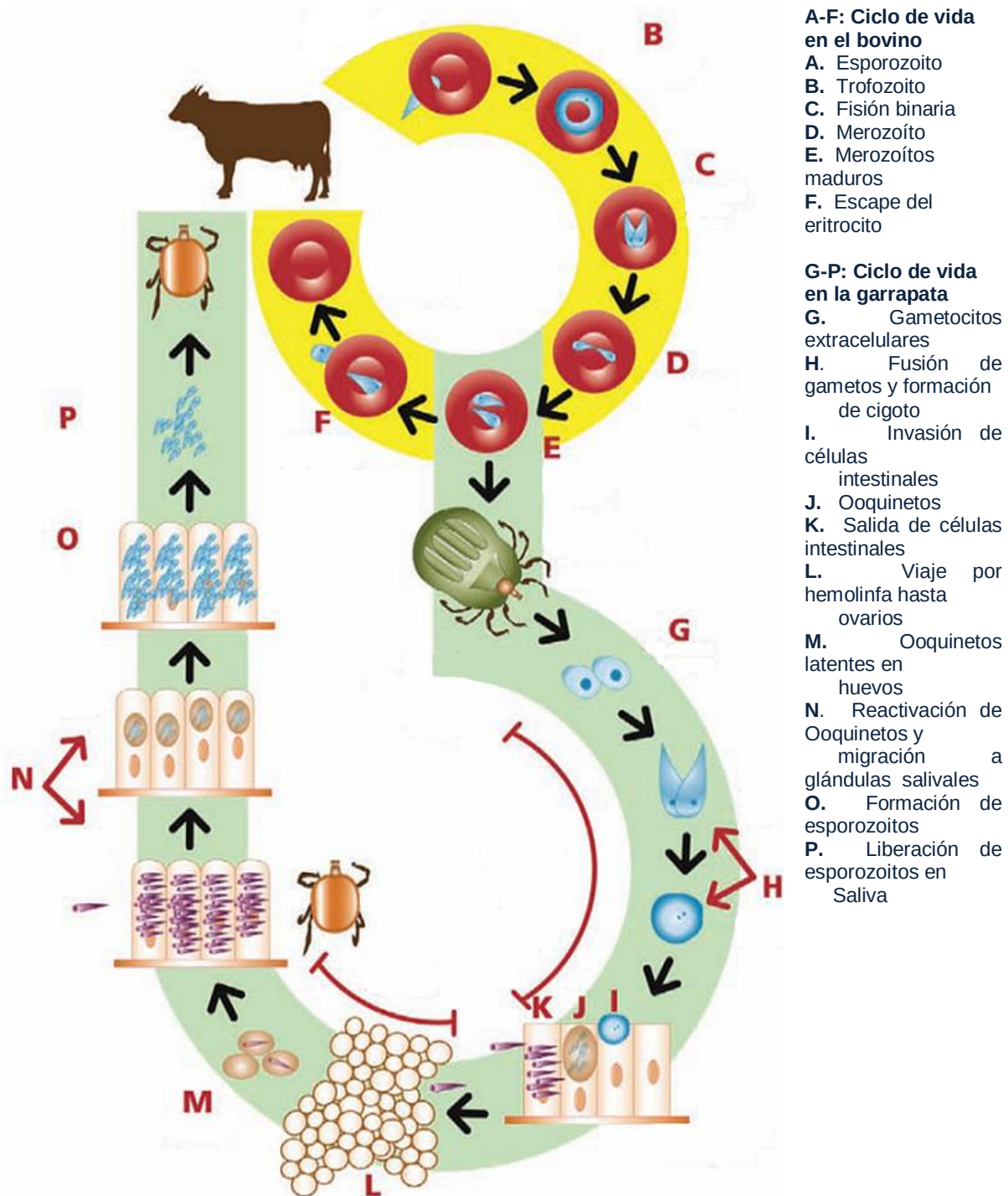


Figura 4. Ciclo de Vida de *B. bovis* (Modificado de Mosqueda, 2012).

Genoma de *Babesia* spp.

El genoma de *B. bigemina* aún no ha sido publicado, sin embargo, ya se encuentran reportados los segmentos de DNA de la secuenciación sobrelapados de este genoma en las bases de datos del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>) aunque aún no han sido ensamblados. Hasta la fecha, los ensayos de electroforesis en gel de campo pulsado publicados por Ray y colaboradores en 1992, muestran que el genoma de *B. bigemina* es de 10Mpb y tiene 4 cromosoma.

El genoma de *B. bovis* ha sido más estudiado y ya fue publicado (Brayton, 2007). *B. bovis* posee un genoma nuclear, uno mitocondrial y uno en su apicomplasto, los dos últimos son ricos en adenina y timina. El genoma nuclear contiene tres operones de RNAr y 44 secuencias codificantes para RNAt. A continuación se resumen las características generales del genoma de este protozoo (Cuadro 1).

Cuadro 1 Características generales del genoma de *B. bovis* (Adaptado de Brayton y cols., 2007).

Característica	<i>Babesia bovis</i>
Tamaño del genoma nuclear	8.2 Mbp
Número de genes codificantes para proteínas	3,671
Genes con intrones	61.5 %
Longitud promedio de la región intergénica	589 pb
Número total de cromosomas	4
Contenido de guanina y citosina	41.8 %
Tamaño del genoma del apicomplasto	33 kb
Tamaño del genoma mitocondrial	6kb, lineal
Porcentaje de genes con intrones	61.5 %
Porcentaje codificante	70.2 %

Algunas de las características adicionales reportadas del genoma de *B. bovis* son: que el genoma nuclear posee un contenido de 58.2% de adenina y timina, el genoma del apicomplasto codifica para 32 proteínas hipotéticas y que posee genes para RNAt y RNAr, el genoma mitocondrial codifica para tres proteínas que participan en la respiración mitocondrial (Brayton y cols, 2007).

A través de genómica comparativa del genoma de *B. bovis* con respecto al de otros dos parásitos apicomplexos; *Theileria parva* y *Plasmodium falciparum*, se hizo evidente que el genoma de *B. bovis* es el más pequeño de los tres, pero tiene una mayor proporción de G+C. El que su genoma sea más pequeño, implica una menor cantidad de genes codificantes y por lo tanto un número menor de proteínas. El análisis comparativo de genes que codifican para enzimas en genomas de patógenos apicomplexos, mostró que el genoma de *B. bovis* codifica para un menor número de enzimas y por lo tanto tiene un potencial metabólico reducido. Esto permite sugerir que quizás algunas de las proteínas de *B. bovis* puedan realizar más funciones que las reportadas para otros parásitos apicomplexos; todo lo anterior indica que hace falta un mejor entendimiento de la biología de este parásito, por lo que en ocasiones para el estudio del género *Babesia*, se hace la extrapolación con la información conocida de *Plasmodium* y *Theileria* (Brayton y cols, 2007).

Familias de Proteínas de *Babesia* spp.

Babesia además de genes constitutivos, posee genes que codifican para dos familias grandes de proteínas características: la familia VESA (*variant erythrocyte surface antigen*) o Antígeno variable de la superficie del eritrocito y la familia SmORF (*small Open Reading Frame*) o pequeños marcos de lectura. Adicionalmente otra familia de proteínas característica de *Babesia* spp., es la familia VMSA (*Variable merozoite surface antigen*) o Antígeno variable de la superficie del merozoito. Otras proteínas asociadas a los organelos característicos de *Babesia* lo son: las proteínas SBP (*Spherical body protein*) o proteínas de los

cuerpos esféricos, las proteínas RAP1 (*Rhoptry-Associated Protein 1*) y la proteína AMA1 (*Apical membrane antigen 1*) o Antígeno de la membrana apical 1 (Mosqueda y cols., 2002; Brayton y cols., 2007). Muchas de estas proteínas se están estudiando como posibles candidatos para herramientas diagnósticas y para el desarrollo de vacunas a partir de subunidades con el objeto de ofrecer más alternativas para el control de la babesiosis bovina.

Familia VESA 1: La familia de proteínas VESA 1 son heterodiméricas compuesta por los grupos VESA1a y VESA1b. Estas proteínas son codificadas por los genes *ves1 α* y *ves1 β* que se encuentran en grupos de dos o más genes y es lo que permite que se tenga un potencial de 119 productos variables de la proteína. Esta proteína es sintetizada por el parásito y luego es exportada a la superficie del eritrocito del hospedero. VESA 1 es una proteína con gran variación antigénica y su principal función es que participa en la evasión de la respuesta inmune y participa en la adhesión celular. De todas las variantes de la proteína VESA solo siete poseen un péptido señal aminoterminal. Las proteínas VESA1a poseen un dominio extracelular seguido de una región transmembranal y una pequeña porción citoplasmática, mientras que las proteínas VESA1b poseen una región con estructura de bobina en la región central (Brayton y cols, 2007).

Familia smORF: En el genoma de *B. bovis* se han identificado 44 genes asociados a la familia de genes *ves1* que se encuentran distribuidos en todos los cromosomas. La longitud de estos genes varía de 381 a 1377 nucleótidos y codifican para proteínas que no han sido previamente reportadas en las bases de datos llamadas SmORF (*small Open Reading Frame*) o pequeños marcos de lectura. Cuarenta y tres de las proteínas predichas poseen un péptido señal. La asociación de los smORFs con los genes *ves1* permiten especular que la función de los smORFs está asociada al de las proteínas VESA1 o que contribuyen a las variación antigénica (Brayton y cols, 2007).

Familia VMSA: Estas proteínas participan en la invasión de los eritrocitos ya que tienen un papel en la adhesión de los merozoítos y esporozoítos y son expresadas en la cubierta de superficie (Mosqueda y cols, 2002). Esta familia se compone de las proteínas MSA1 y MSA2. Las VMSA son glicoproteínas expuestas en la superficie y que están ancladas a la membrana celular mediante un glicolípidio GPI (glicosilfosfatidilinositol). Los genes que codifican para esta familia de proteínas son el *msa1* y los cuatro genes *msa2* (*msa-2c*, *msa-2a1*, *msa-2a2*, and *msa-2b*) y se localizan en el cromosoma 1. Estas proteínas poseen un péptido señal, una región hidrofóbica conservada que es YFK para MSA1 y YYKK para MSA2 (Florin-Christensen y cols, 2002; Brayton y cols, 2007).

Familia SBP: La familia de proteínas SBP se expresan y almacenan en los cuerpos esféricos y participan en el proceso de invasión del parásito al eritrocito. Una proteína perteneciente a esta familia es SBP2 y se localiza en el lado citoplásmico de la membrana. En *B. bovis*, esta proteína tiene un peso molecular aproximado de 225 kDa y el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 4. Además, secuencias incompletas del gen SBP2 se encuentran en *tandem* en grupos de dos, cuatro y cinco, en el cromosoma tres. Estas secuencias en *tandem* también se transcriben y traducen. Las proteínas SBP2 tienen una alta identidad en los primeros 30 aminoácidos (Brayton y cols, 2007). Otra proteína de esta familia es SBP4 la cual se transloca al citoplasma de los eritrocitos parasitados. SBP4 de *B. bovis* posee un marco de lectura abierto de 1119 pb y la secuencia predicha de la proteína tiene 372 aminoácidos. A esta proteína se le han atribuido funciones como estabilización del ambiente intracelular, modificación del citoesqueleto de los eritrocitos para permitir la adhesión al endotelio vascular y evitar su paso por el bazo (Alaa y cols 2011). En *B. bigemina* SBP4 tiene un peso molecular aparente de 29.4 kDa (Cruz, 2014).

RAP1: Esta proteína también juega un papel en la invasión de los eritrocitos, pues se sabe que anticuerpos específicos contra ella, impiden la unión del esporozoito a la célula blanco. La proteína RAP1 se localiza en la superficie apical dentro de las

roprías en los merozoítos. El gen que codifica para la proteína RAP1 es *rap1a* y se encuentra en dos arreglos en grupo los cuales codifican para la proteína de 60 kDa (Mosqueda y cols 2002; Yokoyama y cols 2006).

AMA1: Es una proteína transmembranal de 82 kDa en *B. bovis* que es sintetizada en estadios maduros del parásito y localizada inicialmente en el cuello de las roprías y posteriormente transportada y almacenada en las micronemas. No obstante, durante la invasión, esta proteína se localiza en la superficie del parásito y se le atribuye la función de reorientación del complejo apical. Como características peculiares de la proteína AMA1 en protozoarios apicomplexos, se identifica un dominio extracelular en la región aminoterminal, un dominio transmembranal único en la porción central de la proteína y un dominio citoplasmático carboxilo terminal. El dominio extracelular contiene 14 residuos de cisteínas, lo cual permite que esta región a su vez forme tres dominios muy conservados en todas las especies estudiadas (Crewther y cols, 1990; Mitchell y cols, 2003; Gaffar y cols, 2004; Yokoyama y cols, 2006; Zhou y cols, 2006;).

Las familias de proteínas aquí descritas han sido las más estudiadas en *Babesia* con el objetivo de identificar antígenos involucrados en el mecanismo de invasión del parásito que puedan ser empleados para bloquearlo y así controlar la enfermedad. Además, con este mismo fin, en *Plasmodium* se han estudiado proteínas específicas de las fases sexuales. Una de ellas es la proteína HAP2, de la cual, recientemente se ha encontrado un homólogo en *B. bigemina* (Rocha, 2010).

HAP2: Es una proteína que fue inicialmente identificada en plantas como *Lilium longiflorum* y *Arabidopsis thaliana* donde se observó que esta proteína se expresaba en las células generativas, consecuentemente se le denominó GCS1 por las siglas del inglés *Generative Cell Specific 1*. Posteriormente la proteína también fue denominada HAP2 debido a que una mutación en el gen que codifica para dicha proteína produce pérdida del estado de haploidía en *A. thaliana*, es por

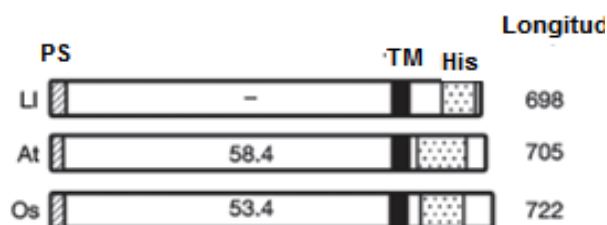
ello que el gen fue denominado *hap2* (*hapless*). Actualmente ambos nombres (*hap2* y *gcs1*) son utilizados para referirse al gen que codifica para esta proteína (Von Besser y cols, 2004; Mori y cols, 2006).

La función de esta proteína se determinó al realizar interrupciones en el marco de lectura del gen que codifica para HAP2. En *A. thaliana* se observó que los gametos con interrupciones en el gen *hap2* no eran fertilizados, además se logró identificar que HAP2 solo se expresa en el esperma de las plantas (Mori y cols, 2006; Von Besser y cols, 2006).

Los análisis bioinformáticos permitieron identificar secuencias homólogas a HAP2 de *L. longiflorum* y *A. thaliana* en otras plantas como *Oryza sativa* y en protozoarios como *Physarum polycephalum*, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Leishmania major* (Figura 5) y en artrópodos como *Pediculus humanus*. La presencia de estos homólogos en una amplia variedad de organismos sugieren que la reproducción por fusión de gametos es un mecanismo de reproducción sexual bastante antiguo y se originó en un ancestro común de las plantas modernas, animales y protistas (Mori y cols, 2006; Steele y Dana, 2009).

Las secuencias de HAP2 reportadas en diferentes organismos poseen aproximadamente 700 aminoácidos y comparten su arquitectura; una región amino terminal que contiene un péptido señal y una región carboxilo terminal que tiene una región intracitoplasmática seguida de una porción transmembranal. Sin embargo, a diferencia de la proteína HAP2 de protozoarios, en plantas se encuentra un dominio rico en histidinas en la región carboxilo terminal conservado predominantemente en plantas angiospermas (Figura 5) (Mori y cols, 2006; Von Besser y cols, 2006).

A



B

Proteínas HAP2 de plantas angiospermas tienen un dominio C-terminal rico en Histidinas

	Longitud (AA)	Identidad	Identidad N (AA)	Identidad C (AA)	H en C- terminal
<i>Arabidopsis thaliana</i>	705	100.0%	100.0%	100.0%	22.0%
<i>Populus trichocarpa</i>	698	66.1%	70.9%	41.5%	17.1%
<i>Lilium longiflorum</i>	698	56.4%	63.2%	26.0%	15.5%
<i>Oryza sativa</i>	722	55.0%	58.9%	37.4%	23.0%
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	748	24.8%	27.9%	8.1%	3.2%
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	744	20.0%	21.3%	10.6%	0.0%
<i>Plasmodium falciparum</i>	889	19.7%	20.9%	17.1%	2.2%
<i>Physarum polycephalum</i>	808	23.7%	24.8%	18.7%	1.2%
<i>Leishmania major</i>	917	23.8%	25.0%	23.6%	2.4%

AA, aminoácido; H, histidina; N, región del N-terminal hasta región transmembranal de la proteína; C, región del C-terminal hasta el dominio transmembranal; Gris, Plantas angiospermas

Figura 5. Comparación entre HAP2 de diferentes organismos. A. Esquematzación de HAP2 de: Li, *Lilium longiflorum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa* (Tomado de Mori, 2006) B. Porcentajes de Identidad de diferentes HAP2. PS, péptido señal; TM, región transmembranal; His, región rica en histidinas (tomado de Von Besser, 2006).

Las características estructurales de la proteína permiten concluir que HAP2 es una proteína asociada a membrana y el dominio rico en histidinas indica que ésta región posiblemente sea citoplasmática y el péptido señal de la región amino terminal es una señal de tránsito para que la proteína HAP2 sea transportada mediante vesículas a la membrana (Mori y cols, 2006; Von Besser y cols, 2006).

Una característica adicional de la proteína HAP2, identificada en protozoarios, es la presencia de una región de aproximadamente 50 aminoácidos altamente conservada entre diversos organismos y dentro de la cual existen cisteínas

posicionalmente conservadas (Figura 6). La presencia de los residuos de cisteína conservados determinan la formación de puentes disulfuro en la proteína. A esta región se le denominó dominio HAP2 y se le atribuye la función de la proteína (Mori y cols, 2006; Hirai, 2008; Wong y Johnson, 2010).

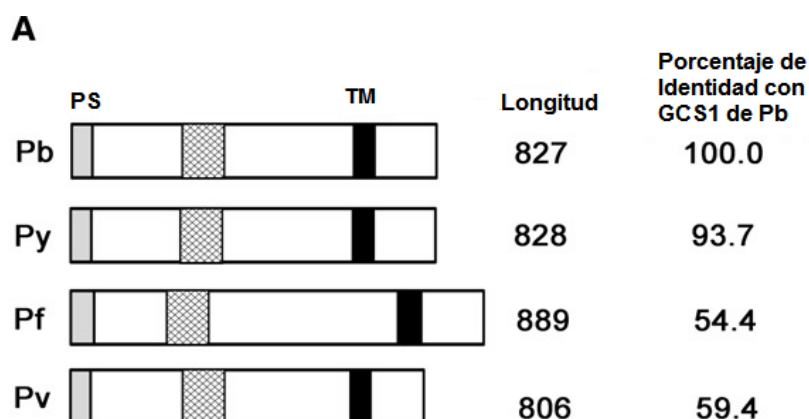


Figura 6. Estructura primaria de HAP2 en diferentes especies de *Plasmodium*. PS, Péptido señal; Tm, región transmembranal (Tomado de Hirai, 2008).

ESTADO DEL ARTE

5. Antecedentes de la investigación de HAP2

Proteína HAP2 en protozoarios

Los principales estudios de la proteína HAP2 en protozoarios han sido realizados en *Chlamydomonas reinhardtii* y en *Plasmodium* spp. De manera importante se detectó que *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. falciparum* y *P. vivax*, tenían homólogos de HAP2 con todas las características reportadas previamente en plantas; un péptido señal, la región del dominio HAP2 y una región transmembranal (Figura 6) (Hirai y cols, 2008).

La participación de la proteína HAP2 en la fertilización en plantas y su expresión específica en el gameto macho, fueron antecedentes claves en ensayos de fertilización *in vitro* en protozoarios, los cuales permitieron demostrar que HAP2 participa en la reproducción sexual y que es indispensable en los gametos machos (Liu, 2008). Reportes recientes han permitido conocer cómo ha evolucionado la dinámica de HAP2 de manera diferente en ambos sexos en *G. pectorale*, en gametos machos la proteína se transporta al sitio de fusión que se protruye durante la fertilización, mientras que en gametos hembra la proteína HAP2 es degradada en el citoplasma una vez que se activan los gametos (Kawai-Toyooka y Cols, 2014). En *P. berghei* se determinó que HAP2 es determinante en la formación de cigotos en el lumen intestinal del mosquito. En el mosquito se analizó el porcentaje de infectividad por *P. berghei*, en las células intestinales y la transmisión del parásito al hospedero vertebrado, usando parásitos mutados en el gen *hap2* (Hirai y cols, 2008; Liu y cols, 2008). Los resultados obtenidos mostraron que cuando se elimina la proteína HAP2 no se forman los ooquistes en el mosquito (Figura 7).

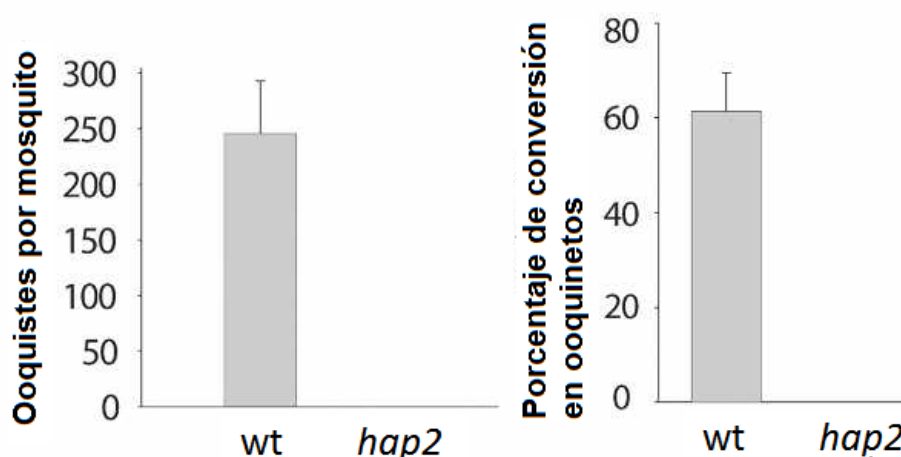


Figura 7. HAP2 es esencial para el desarrollo sexual de *P. berghei* en el mosquito. wt, genotipo silvestre; *hap2*, parásitos con mutación en *hap2*. El panel izquierdo muestra el número de ooquistes encontrados por mosquito y el panel derecho muestra el porcentaje de parásitos transformados en ooquinetos encontrados (Tomado de Liu, 2008).

La proteína HAP2 también interviene en la tasa de infección en el mosquito y su transmisión a un nuevo hospedero vertebrado ya que al utilizar los parásitos con una mutación que interrumpe el marco de lectura del gen *hap2*, la tasa de infección en el mosquito era nula (Figura 8). Además se observó que los mosquitos infectados con parásitos mutados no podían transmitir la enfermedad a un nuevo hospedero vertebrado (Hirai y cols, 2008). Estos hechos remarcan la importancia de HAP2 en la infectividad de *P. berghei* y su impacto en el ciclo de vida del parásito.

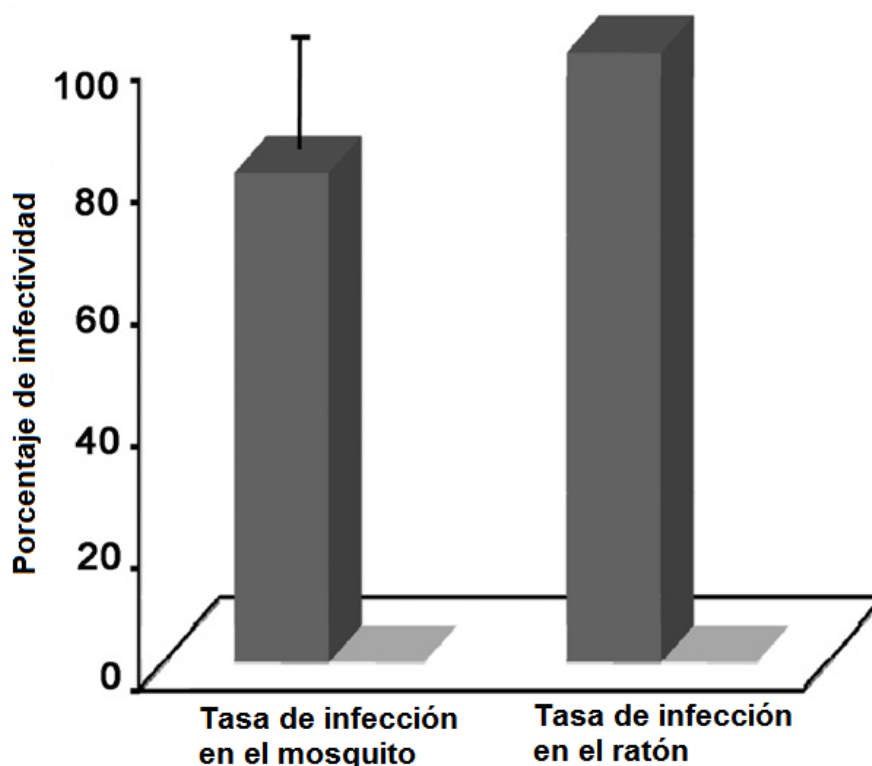


Figura 8. Tasa de infección y eficiencia de transmisión de parásitos con mutación en *hap2*. Las barras en gris oscuro representan *P. berghei* silvestre y las barras gris claro representan los parásitos mutados (Tomado de Hirai y cols, 2008).

Una vez que se determinó que HAP2 era esencial para la infección en el mosquito y la transmisión al hospedero vertebrado, se planteó que un bloqueo mediado por anticuerpos contra HAP2 podría ser efectivo para inhibir la fusión de fases

sexuales dentro del mosquito y así detener el ciclo de vida del parásito (Hirai y cols, 2009). Para probar ésta hipótesis se utilizaron anticuerpos policlonales contra un fragmento recombinante de HAP2 de *P. berghei*, que incluyó los aminoácidos 355 al 609 de la proteína completa, para interrumpir el ciclo de vida por inhibición de la fertilización (Blagborough y Sindén, 2009).

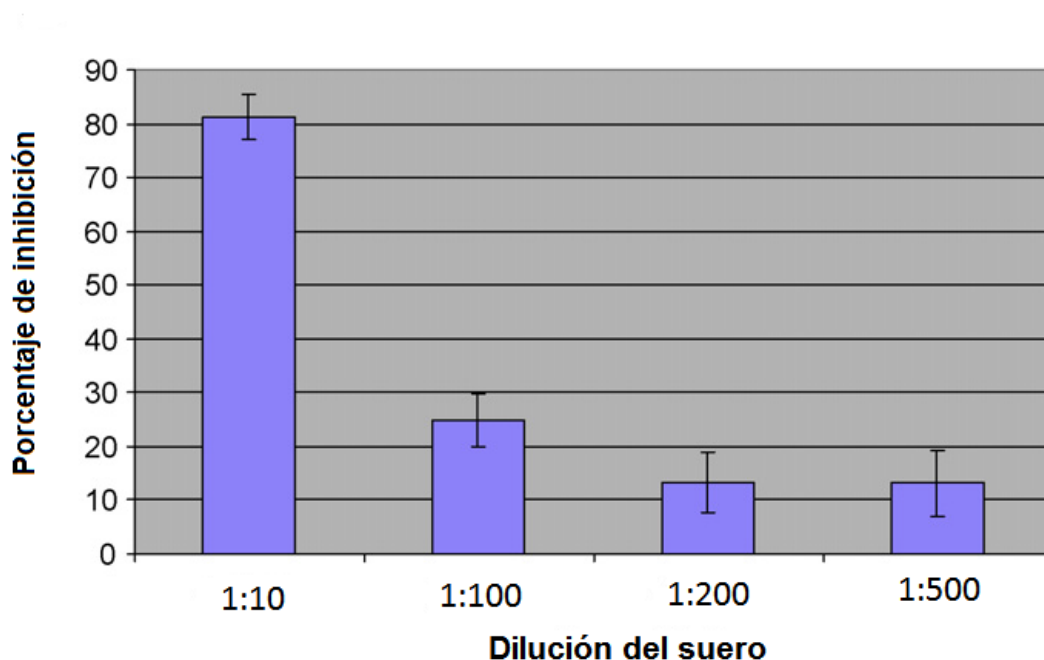


Figura 9. Anticuerpos contra HAP2 interrumpen el ciclo de vida de *P. berghei* porcentaje de inhibición de la fusión de los gametos (tomado de Blagborough y Synden, 2009).

Al analizar el porcentaje de inhibición de la fusión de gametos utilizando el suero anti-HAP2, se observó que se inhibió la formación *in vitro* de ooquistos hasta en un 81% (Figura 9) (Blagborough y Synden, 2009). Estos resultados han servido para proponer a HAP2 como un candidato potencial en la elaboración de vacunas bloqueadoras de la transmisión de Malaria.

ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

HAP2 en *Babesia bigemina*

Plasmodium al igual que *Babesia* pertenece al *phylum Apicomplexa* donde se han encontrado homólogos de HAP2, por lo que, se hipotetizó que *B. bigemina* tenía un homólogo del gen *hap2* en su genoma. Con base a los antecedentes anteriormente expuestos se realizó un análisis del genoma de *B. bigemina* mediante el cual se detectó un gen de 2459 pb que codifica para una proteína de 780 aminoácidos (Rocha, 2010). Además al estudiar la proteína en diferentes cepas de *B. bigemina* se observó que la proteína está altamente conservada (Cuadro 2).

Cuadro 2 Variación en el número de nucleótidos del gen *hap2* de diferentes cepas de *B. bigemina* (Rocha, 2010).

Cepa	No. de nucleótidos	No. de aminoácidos
Chiapas	2,474	778
Nayarit	2,447	777
Rio grande da sur	2,447	777
Turquía	2,474	784
Seed	2,474	778
Rondonia	2,450	768

En *B. bigemina* se ha estudiado la expresión del gen y la localización de la proteína en fases sexuales y fases asexuales. A diferencia de lo reportado en otros parásitos apicomplexos en cuanto a la expresión de la proteína HAP2, en *B.*

bigemina el análisis de la transcripción del gen *hap2* mostró que se expresa en los estadios sexuales y en estadios intraeritrocíticos. El estudio de la localización de HAP2 permitió identificar una distribución en la membrana de gametos y en fases intraeritrocíticas (Rocha, 2010). Finalmente, un alineamiento entre cepas de *B. bigemina* de diferentes regiones del mundo mostró que la proteína posee un 98% de identidad entre dichas cepas.

IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA

6. ¿Por qué estudiar la participación de HAP2 en la fusión de fases sexuales de *B. bigemina*?

En años recientes se ha hecho un esfuerzo especial para comprender el ciclo de vida de parásitos apicomplexos como *Plasmodium* spp, en particular se han enfocado en los estadios sexuales debido a que muchas de las proteínas expresadas por estas fases del parásito están relacionadas con la transmisión de la enfermedad del vector hacia el hospedero vertebrado. A pesar de esto, aún no se logran dilucidar dos áreas de interés; qué gen es el responsable del mecanismo que permite a las fases eritrocíticas transformarse en fases sexuales y cuáles son los mecanismos moleculares y eventos de señalización de las fases sexuales en estos parásitos durante la fertilización (Kuehn y Pradel, 2010). En el caso de *Babesia* spp. también es necesario continuar el estudio de las fases sexuales para comprender mejor la biología del parásito. Estudiar una de las proteínas de las fases sexuales de *B. bigemina* como HAP2, es un aporte importante para tratar de esclarecer algunos de los mecanismos moleculares de las fases sexuales durante procesos como la fertilización.

Por otra parte, actualmente no existen medidas que sean eficientes y económicas para el control de la babesiosis. Por lo que, es necesario desarrollar métodos de prevención y control de la enfermedad. Una estrategia para el control de las enfermedades transmitidas por vector ha sido el diseño de vacunas bloqueadoras

de la transmisión (Carter, 2001). Los ensayos en *P. berghei* para interrumpir el ciclo de vida del parásito utilizando anticuerpos específicos contra la proteína HAP2 han mostrado que la fusión de gametos se inhibe en el intestino del mosquito hasta en un 81% (Blagborough, 2009).

Aunque el gen *hap2* se ha identificado recientemente en *B. bigemina*, se desconoce la función de la proteína por lo que resulta de gran importancia conocer si HAP2 participa en la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina* y si un bloqueo con anticuerpos específicos contra esta proteína puede interrumpir la fusión de las membranas al momento de la unión de los gametos de *B. bigemina*.

El hecho de conocer si la proteína HAP2 participa en los procesos celulares antes mencionados, para el caso de *B. bigemina*, aportaría nuevo conocimiento sobre la biología del parásito, y se podría evaluar en un futuro a la proteína HAP2 como un candidato potencial en el desarrollo de una vacuna bloqueadora de la transmisión de la babesiosis bovina.

II. HIPÓTESIS

Anticuerpos específicos contra la proteína HAP2 de *B. bigemina* inhiben la fusión de fases sexuales de *B. bigemina*.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

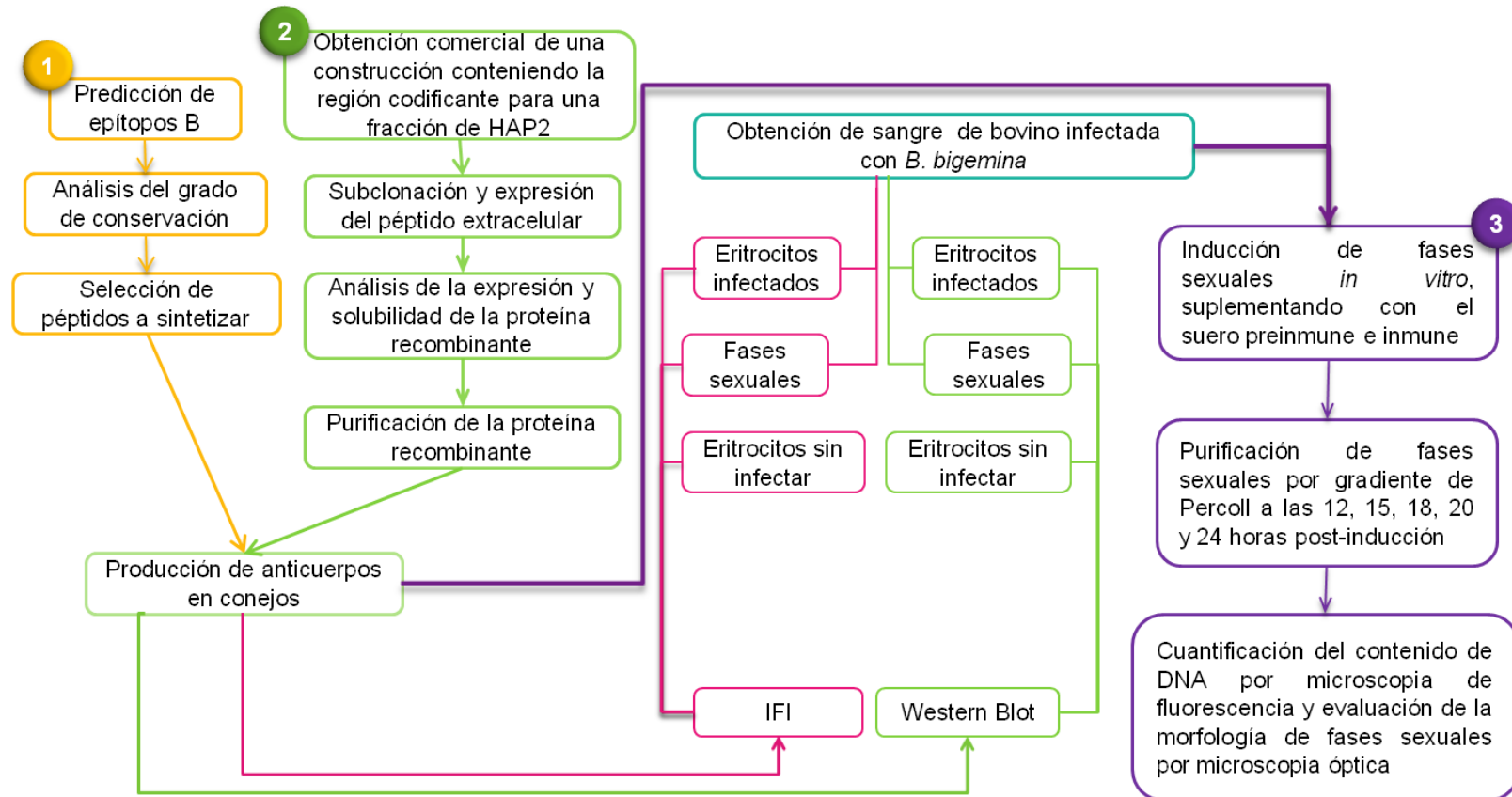
Determinar si anticuerpos específicos contra la proteína HAP2 de *B. bigemina* inhiben la fusión de fases sexuales.

Objetivos particulares

1. Identificar regiones inmunogénicas de la fracción extracelular de la proteína HAP2
2. Inmunodetectar la proteína HAP2 en eritrocitos infectados y en fases sexuales de *B. bigemina* con anticuerpos específicos
3. Determinar si anticuerpos específicos contra regiones inmunogénicas de la proteína HAP2 inhiben la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina*

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr el objetivo general se ha propuesto la siguiente estrategia experimental que permitirá llevar a cabo cada uno de los objetivos particulares.



V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Cepas de *E. coli*

Para la clonación de la región que codifica para la porción extracelular de HAP2 se utilizaron células de *E. coli* competentes One Shot® (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) y para la expresión de la porción extracelular de HAP2, se emplearon células BL21 Star™ (DE3) (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

Cepa de *Babesia bigemina*

En los ensayos realizados en este trabajo se utilizó *B. bigemina* cepa Chiapas. La cepa se mantuvo a través de pases en bovinos esplenectomizados. Los eritrocitos infectados se conservaron en una solución de DMSO con VYM en una proporción uno a uno.

Obtención de fases asexuales de *B. bigemina*

Para la obtención de sangre infectada se esplenectomizó e infectó un becerro con un vial de 5 ml de *B. bigemina* cepa Chiapas. El momento de recolección de la sangre infectada se determinó mediante un monitoreo a partir del día 5 postinfección hasta detectar un 3 % de parasitemia. La recolección de sangre se realizó con un matraz con vacío estéril y fue desfibrinada con perlas de vidrio. La sangre se centrifugó a 9000 x g por 15 minutos, se desechó el suero y las células blancas. El paquete celular se lavó con solución de VYM tres veces y se almacenó a 4 °C ó 20 °C hasta su uso.

Inducción de fases sexuales de *B. bigemina*

La inducción y purificación de las fases sexuales de *Babesia bigemina* se realizó de acuerdo con el protocolo publicado por Mosqueda y colaboradores en 2004. Según lo reportado la inducción de las fases sexuales se inició incubando 30 % de eritrocitos parasitados en medio M199 adicionado con 100 μ M de Ácido Xanturénico suplementado con 20 % de suero estéril de bovino durante un máximo de 36 h a 28 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 9,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El paquete celular recuperado fue purificado mediante gradiente de Percoll isosmótico al 47 % en PBS para recuperar las fases sexuales. En un volumen final de 12 ml se colocaron 11 ml de la solución de Percoll y 1 ml de paquete celular. Para separar las fases por gradientes, la centrifugación se realizó a 4200 x g por 2 h a 4 °C. Al término de la centrifugación se recuperó la fase color marrón la cual se lavó tres veces adicionando PBS y centrifugando a 9000 x g por 15 minutos para eliminar los residuos de Percoll. Para inmunofluorescencia indirecta, las fases sexuales purificadas se resuspendieron en 200 μ l de VYM y fueron extendidas en laminillas que se dejaron secar y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Para extracción de proteínas, después del lavado se secó la pastilla con las fases sexuales y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

2. Expresión de la proteína recombinante HAP2

Síntesis de DNA que codifica para el fragmento extracelular de la proteína HAP2.

La construcción se diseñó de manera que contiene una secuencia de 2007 pb correspondiente a la secuencia del gen *hap2* que codifica la porción extracelular de la proteína HAP2, de 669 aminoácidos, la que fue nombrada construcción pIDTSmart-BamHI-*hap2*Excel-XbaI y se adquirió con el servicio Custom Gene Synthesis de IDT Integrated DNA Technologies. El plásmido liofilizado fue hidratado en 80 μ l del amortiguador IDTE, después se homogenizó durante 20 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.

Subclonación en pCold

La subclonación se realizó a partir de la liberación del inserto de la construcción pIDTSmart-*Bam*HI-*hap2*Excel-*Xba*I mediante la digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. El vector pCold (Takara) fue linearizado con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I y desfosforilado con fosfatasa alcalina Intestinal de becerro. La reacción de ligación se realizó en una relación molar de 1:3 de vector:inserto con 1 µl de enzima T4 ligasa, 4 µl de buffer de ligasa en un volumen final de 20 µl. La reacción se mezcló gentilmente y se incubó durante 60 minutos a 16 °C. La reacción de ligación fue utilizada para transformar células de *E. coli* competentes One Shot® (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La siembra de las bacterias se realizó en dos placas de agar LB-Ampicilina (100 µg/ml) con 200 µl y 100 µl de la reacción de transformación en cada placa respectivamente. Se dejó incubar toda la noche a 37 °C. La selección de colonias positivas se realizó mediante un PCR de colonia. El DNA plasmídico de las colonias positivas fue extraído con el kit de purificación illustra plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare, Piscataway, USA). Las clonas positivas fueron verificadas mediante restricción enzimática (*Bam*HI y *Xba*I). Una vez seleccionadas las clonas, el DNA plasmídico fue purificado y enviado a secuenciar.

3. Transformación de células BL21 con el DNA de clonas positivas

10 ng de DNA plasmídico que contenía el inserto se agregó a un vial con células BL21 DE3 y se dejó reposar durante 30 minutos. Posteriormente se dio el choque térmico de 42 °C durante 30 segundos y se transfirió al hielo. 250 µl de medio S.O.C a temperatura ambiente fueron agregados y se agitaron las células a 70 x g a 37°C durante 30 minutos. El cultivo bacteriano se sembró en 2 placas de agar LB-ampicilina a volúmenes diferentes (150 y 100 µl) a cada placa y se dejaron incubar durante toda la noche a 37° C.

4. Inducción de la expresión de la proteína recombinante

Un matraz con 30 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) fue inoculado con 1.5 ml de cultivo bacteriano. El cultivo se dejó en crecimiento a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.4. El cultivo se dividió en dos matraces de 15 ml cada uno. A uno de los cultivos se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Una alícuota de 1 ml de cada cultivo se centrifugó a 5 900 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se congeló a -20 °C. La incubación para la inducción de la expresión de la proteína se realizó en un agitador refrigerado a 16 °C durante 24 h con agitación constante (200 rpm). Al finalizar el tiempo de inducción se tomó una alícuota de cada matraz y se procesó como se mencionó antes. Algunas variaciones en las condiciones para la inducción fueron el aumentar la temperatura de inducción a 28 °C y variar la concentración de IPTG entre 0.5 mM y 1 mM.

5. Análisis de la expresión del péptido recombinante

Para analizar la expresión del péptido se corrió un gel de poliacrilamida SDS/PAGE (10%) con cada uno de los paquetes celulares obtenidos del proceso de inducción y se realizó de la siguiente manera: las densidades ópticas de las muestras se normalizaron a una DO de 0.9 usando PBS 1X. La muestra se mezcló 1:1 con la solución de carga (950 µl de buffer Laemmli y 50 µl de βME). La muestra se hirvió por 5 minutos. Se cargaron 30 µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10%. El marcador de peso molecular empleado fue el Kaleidoscope™ (BioRad, California, Estados Unidos) para identificar la banda que corresponde con el tamaño de la proteína expresada (82 kDa). La electroforesis se corrió durante 1 h a 100 V. El gel se tiñó con azul de Coomassie durante una hora y se dejó lavando con solución desteñidora por cuatro periodos de 30 minutos.

6. Diseño de péptidos conteniendo epítomos B de HAP2 de *B. bigemina*

Con base en las secuencias de HAP2 de *B. bigemina* previamente reportadas por Rocha en 2010, se realizó el análisis para la selección de péptidos. Para ello, la secuencia que codifica para la región extracelular de la proteína se analizó en tres herramientas bioinformáticas que utilizan diferentes algoritmos para la predicción de epítomos B que fueron: ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), BCEPred antigenicidad, BCEPred hidrofiliidad (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y IEDB (<http://www.iedb.org/>). Los candidatos de péptidos se consideraron aceptables si se encontraban en aquellas regiones de HAP2 que obtuvieran un alto porcentaje de probabilidad de ser un epítomo B y que fueron predichos por las tres herramientas utilizadas. Los criterios considerados para la selección de los epítomos se muestran en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Criterios para la selección de péptidos

Herramienta	Criterios
ABCPred	Puntaje de probabilidad de ocurrencia de 0.80
BCEPred	Hidrofiliidad y antigenicidad superior a 1
IEDB	Puntaje de probabilidad superior a 0.80

Posteriormente se utilizó la herramienta blastp suite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para verificar que los péptidos seleccionados no reconocieran un organismo diferente a *B. bigemina*. A continuación se utilizó el servidor del Instituto Sanger para realizar un análisis blast contra todo el genoma de *B. bigemina* (https://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina) y así garantizar que el péptido seleccionado únicamente reconociera a la proteína HAP2. Finalmente se realizó un alineamiento de la diferentes cepas de *B. bigemina* reportadas previamente, para verificar que los péptidos candidatos obtenidos hasta ese momento se encontraran en regiones conservadas de las diferentes cepas.

Para cada péptido seleccionado se verificó que contara con los requisitos de: a) ser predichos por tres algoritmos diferentes para identificación de epítomos B; b) estar en regiones expuestas de la proteína; c) no ser idénticos con alguna otra proteína de *B. bigemina* y d) estar conservados en diferentes cepas de *B. bigemina*. Finalmente, los péptidos seleccionados se adquirieron con la empresa GL Biochem Ltd (Shangai, China) quien los sintetizó bajo el sistema de péptidos múltiples antigénicos con 8 ramificaciones, en la cual, cada péptido es sintetizado en forma de octámeros (MAP8) y liofilizado.

7. Producción de anticuerpos

Para la producción de anticuerpos contra cada péptido de HAP2 se utilizaron 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 2 meses de edad. De cada uno de los cuatro péptidos sintetizados, se realizó un preparado utilizando 100 µg de péptido sintético liofilizado que fue resuspendido en 500 µl de PBS y emulsionado con 500 µl de adyuvante Montanide ISA 71 (Seppic, Francia), de esta misma forma se prepararon las emulsiones para cada péptido. Cada una de las emulsiones preparadas se utilizó para inocular un conejo. Se realizaron un total de 5 inmunizaciones. Cada inoculación se realizó vía subcutánea en cuatro puntos cercanos a los ganglios linfáticos más accesibles del conejo, con intervalos de 15 días. Una muestra de suero preinmune fue colectada de todos los conejos y almacenada a -20°C hasta su uso. Un monitoreo mediante inmunofluorescencia indirecta se realizó para evaluar el momento de toma del suero inmune, utilizando como criterio la presencia de señal positiva al ocupar el suero en una dilución en 1:80. Cuando se detectó la señal positiva esperada se realizó la extracción de sangre de los conejos. La sangre obtenida fue centrifugada para separar el suero y éste se guardó a -20°C hasta su uso.

8. Inmunodetección de la proteína HAP2 utilizando los anticuerpos antipéptidos.

Inmunoelectrotransferencia

La inmunodetección de HAP2 se realizó en fases sexuales de *B. bigemina*, teniendo como control negativo eritrocitos sin infectar. Para obtener las proteínas de los parásitos intraeritrocíticos y de los eritrocitos sin infectar se realizaron 5 lavados agregando 10 ml de PBS frío a 5 ml de paquete celular y centrifugando a 9000 x g durante 15 minutos. Finalmente se concentró la muestra en una pastilla que se almacenó a -20 °C hasta su uso y 1 µg de cada pastilla; fases sexuales purificadas, eritrocitos infectados y eritrocitos sin infectar, fueron resuspendidas en 200 µl de PBS. Un volumen de amortiguador de corrimiento Laemmli 2X (BioRad, California, Estados Unidos) preparado con β-mercaptoetanol fue agregado según indicaciones del proveedor. La muestra se homogenizó, se hirvió por 5 minutos y se corrió en un gel de poliacrilamida SDS/PAGE al 10 % y posteriormente fue transferida a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 60 minutos.

La membrana se bloqueó con una solución tampón de Tris con Tween-20 (TTBS)-leche al 5% a 4°C toda la noche, posteriormente se realizaron 3 lavados por 30 minutos con TTBS en el agitador orbital. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-péptido sintético de HAP2 en una dilución 1:2000 en TTBS-leche 0.5 %, por 1 h a temperatura ambiente, al finalizar se lavó tres veces durante 30 minutos con TTBS y se realizó la incubación con un anticuerpo secundario cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 en TTBS-leche 0.5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 30 minutos con TTBS y se realizó el revelado con NBT/BCIP (BioRad, California, Estados Unidos). La inmunodetección se realizó utilizando los cuatro sueros contra los cuatro péptidos sintéticos por separado siguiendo el mismo protocolo cada vez.

Inmunofluorescencia Indirecta

Las fases sexuales y eritrocitos infectados se extendieron en portaobjetos y fueron fijadas con acetona al 100 % durante 15 minutos a temperatura ambiente en el caso de eritrocitos infectados y eritrocitos sin infectar. Las fases sexuales se fijaron con metanol al 100 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se dejaron secar 20 minutos. Los pozos se dibujaron con esmalte de uñas y se colocaron 20µl del anticuerpo primario de conejo antipéptido sintético (1:80) en un pozo y el suero preinmune (1:80) en otro pozo. Las laminillas se incubaron en cámara húmeda media hora a 37°C, luego fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 0.05% durante 5 minutos en agitación a 200 rpm (IKA, KS 130 basic). Las laminillas se dejaron secar a 37°C durante 15 min. Finalmente se realizó la incubación con 20 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) a una dilución 1:200, a 37 °C en cámara húmeda por media hora. Las laminillas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05 % durante 15 minutos y se dejaron secar. Las laminillas fueron montadas con glicerina fosfatada (1:10) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica2500P) con objetivo de 100X y un filtro específico para el espectro del fluorocromo Alexa-488.

9. Inhibición de la fusión de fases sexuales.

Con el objetivo de estudiar el efecto de los anticuerpos contra los péptidos de HAP2 durante la fusión de las fases sexuales se realizó el proceso de inducción de las fases sexuales in vitro. El suero de conejo anti-HAP2 se diluyó 1:10 en el suero de bovino que se emplea en el medio de inducción completo. El medio 199 con ácido xanturénico fue suplementado con la dilución de dos de los anticuerpos; contra el péptido 1 y contra el péptido 3, el suero preinmune de cada conejo utilizado para producir los anticuerpos fue usado como control. En una placa de cultivo se colocó 70 % de M199 adicionado con los sueros de conejo conteniendo los anticuerpos y 30 % de eritrocitos infectados, para un volumen total de 250 µl. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y una inducción con medio de

inducción con suero de bovino fue utilizada como control de la inducción de fases sexuales in vitro. Una muestra de células del cultivo control de inducción de fases sexuales se tomó a las 0 horas para realizar un frotis y obtener la cuantificación de la intensidad de núcleos haploides cuyo valor de intensidad debería corresponder a un núcleo haploide (n). Los cultivos se incubaron a 28 °C y se monitorearon a diferentes horas para evaluar el progreso de la inducción. Las primeras fases sexuales se recuperaron a las 16 horas post-inducción, de acuerdo con el tiempo que se determinó durante una previa inducción realizada en el laboratorio, pues a este tiempo ya se observaban cuerpos radiados en la tinción con colorante de Giemsa. De cada inducción realizada en la placa de cultivo se realizaron dos frotis con las células del cultivo, incluyendo las tres repeticiones. Las laminillas fueron fijadas con metanol absoluto durante 5 minutos. Una laminilla se tiñó con colorante giemsa y la otra se tiñó con DAPI. Los cigotos se obtuvieron a las 36 horas post-inducción, hora que se determinó en ensayos de inducción realizados previamente que mostraron que a las 36 h ya se detectaban cigotos. De igual forma se realizaron dos laminillas de células por cada inducción realizada en la placa de cultivo, incluyendo las repeticiones, esto con objeto de teñir una con Giemsa y otra con DAPI.

10. Cuantificación del contenido de DNA.

Las laminillas teñidas con DAPI fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (Leica DM 2500) con el objetivo para aceite de inmersión 100X y utilizando un filtro para DAPI. Las fotografías fueron tomadas con el software Leica Application Suite. Se tomó una imagen de campo fluorescente y una de campo claro de un total de cuarenta y cinco campos por laminilla, que fue el número total de campos en los que en los controles de inducción permitían evaluar un total de 30 núcleos. Las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) para obtener el dato numérico de la intensidad de los núcleos. Los datos de intensidad obtenidos del software se almacenaron en hojas de cálculo para realizar el análisis estadístico en Minitab (MiniTab Statistical Software, Pennsylvania). El análisis estadístico

realizado fue un análisis de Kruskal-Wallis. Como control se cuantificó el DNA de núcleos de parásitos intraeritrocítios de la hora cero post-inducción para estimar el valor correspondiente a un núcleo haploide (intensidad = $1n$). Los núcleos de los cigotos deben tener el doble de intensidad ($2n$) de acuerdo con lo reportado por Mosqueda *et al.*, (2004).

VI. RESULTADOS

1. Expresión de la proteína HAP2 extracelular

Para poder cumplir con el objetivo de producir anticuerpos contra una región específica de la proteína HAP2, se optó por realizar la expresión de la porción extracelular de la proteína, para esto se obtuvo un plásmido sintético que contenía la secuencia de DNA que codifica para dicha región, este plásmido contenía sitios de restricción específicos y fue obtenido liofilizado de la empresa IDT. El plásmido pIDTSmart-*Bam*HI-*hap*2Excel-*Xba*I rehidratado fue propagado en células *E. coli* competentes One Shot®, el plásmido de las clonas obtenidas fue purificado y digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa como se muestra en la Figura 10.

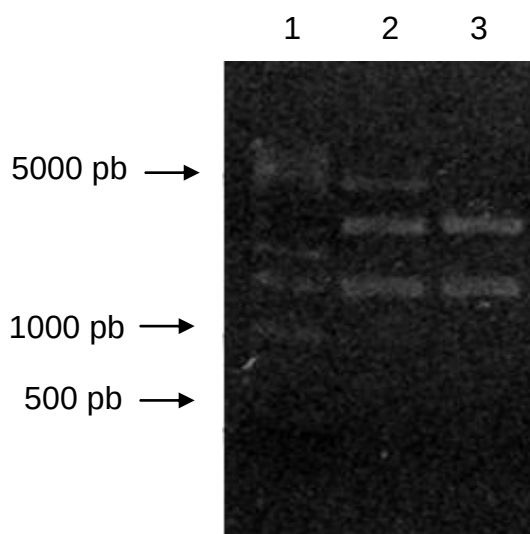


Figura 10. Digestión enzimática del plásmido pIDTSmart-*Bam*HI-*hap*2Excel-*Xba*I. Carril 1: Marcador de talla molecular de 5Kb, carril 2: pIDT purificado de la clona 1 y carril 3: pIDT purificado de la clona 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con RedGel.

Posteriormente, el inserto fue purificado a partir de gel de agarosa y se analizó su integridad en un nuevo gel de agarosa como se observa en el carril 2 de la Figura

11, donde se visualiza una banda de un tamaño aproximado a 2000 pb, el cual, coincide con el tamaño conocido del inserto.

El vector pCold fue linearizado con las mismas enzimas (*Bam*HI y *Xba*I) utilizadas para liberar el inserto. El producto de esta digestión fue visualizado en un gel de agarosa, el cual se muestra en la Figura 11, carriles 3 y 4 donde se observan dos bandas de aproximadamente 4000 pb correspondiente al tamaño del vector. Al comprobar la integridad de pCold y el inserto se procedió a realizar la ligación y transformación de células competentes de *E.coli*.

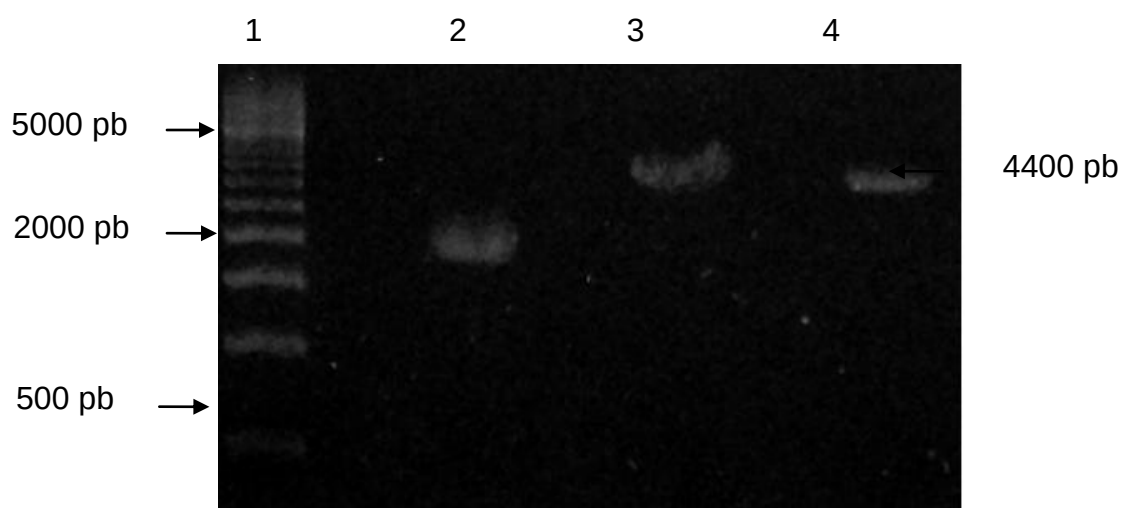


Figura 11. Inserto purificado de gel y Digestión enzimática de pCold Carril 1: Marcador de talla molecular de 5Kb. Carril 2: Inserto purificado, carril 3 y 4: pCold linealizado. Gel de agarosa al 1%, teñido con RedGel.

De las colonias obtenidas se purificó el plásmido y se realizó una digestión enzimática para verificar la presencia del inserto, la cual se muestra en la Figura 12, donde se visualizan dos bandas, la de 2000 pb corresponde al inserto y la banda de aproximadamente 4000 pb que corresponde al plásmido.

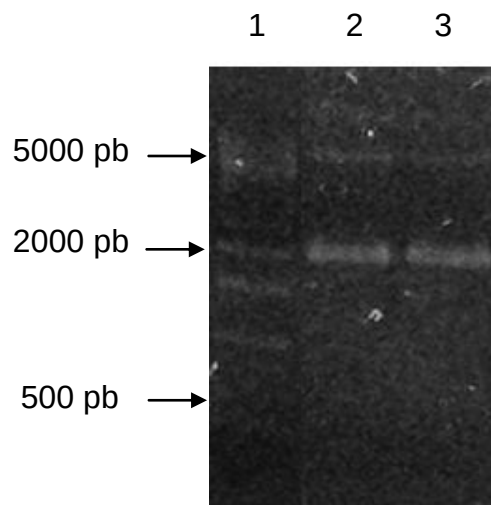


Figura 12. Digestión enzimática de pCold para verificar la presencia del inserto. Carril 1: Marcador de talla molecular 5Kb y carril 2: Digestión enzimática. Gel de Agarosa al 1% teñido con RedGel.

El DNA plasmídico de la clona positiva fue secuenciado para corroborar que el inserto se encontraba en marco de lectura utilizando los oligonucleótidos específicos para pCold (Figura 13). Los elementos importantes para indicar que el gen se encuentra en marco de lectura abierto como son la etiqueta de histidinas, el codón de inicio y el codón de paro se encontraban presentes en la secuencia del plásmido.

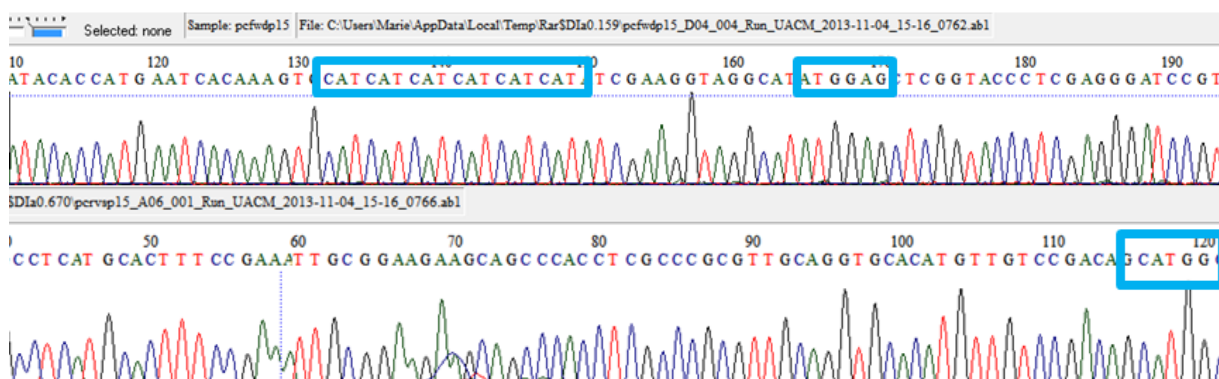


Figura 13. Análisis de la secuencia obtenida a partir del plásmido purificado. Los cuadros indican la etiqueta de histidinas (132b), el codón de inicio (165b) y el codón de paro (117b) (BioEdit).

Una vez que se determinó que el inserto se encontraba en marco de lectura, se indujo la expresión de la proteína recombinante. Sin embargo, no se visualizó la banda enriquecida que se esperaba de 82 kDa en geles de poliacrilamida ni tampoco fue detectada por Western blot usando anticuerpos comerciales anti tag de histidina, tampoco se obtuvieron resultados positivos cuando variamos las concentraciones de IPTG en el medio de inducción de 0.5 mM a 1.0 mM. El tiempo de incubación y la temperatura fueron incrementadas de 24 h hasta 48 horas y de 15 °C a 28 °C respectivamente; a pesar de estas modificaciones no se logró obtener la proteína recombinante. Por lo tanto, se optó por continuar el experimento mediante el diseño y selección de epítomos B en la proteína HAP2 para su obtención de manera sintética.

2. Diseño de péptidos sintéticos con epítomos B conservados de la proteína HAP2

La expresión de la proteína HAP2 extracelular no fue exitosa, por lo que, como una alternativa para obtener anticuerpos contra HAP2 se decidió trabajar con péptidos sintéticos que tuvieran epítomos B lineales conservados. Los péptidos sintéticos fueron seleccionados utilizando herramientas de predicción bioinformáticas. De este análisis de predicción de epítomos realizada *in silico* se obtuvieron cuatro péptidos con epítomos B lineales conservados entre diferentes cepas de *B. bigemina*. Los péptidos con valores predictivos altos en al menos dos de los cuatro algoritmos utilizados fueron seleccionados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de los valores predictivos que cada algoritmo otorgados a la secuencia de aminoácidos analizada.

Número del péptido	Bcepred Antigenicidad	Bcepred Hidrofilicidad	ABCpred	IEBD
Péptido 1	+3	+2	0.81	0.83
Péptido 2	+2	+2	0.90	0.86
Péptido 3	+1	+1	0.87	0.90
Péptido 4	+2	+2	0.86	0.68

El cuadro 5 enlista los péptidos que fueron seleccionados para ser enviados a sintetizar. El nombre del péptido se asignó con base en el puntaje recibido en los 4 algoritmos, siendo el péptido 1 el más antigénico e hidrofílico y el péptido 4 el que salió con valores más bajos en los predictores de epítopes B.

Cuadro 5. Secuencias de los péptidos seleccionados que fueron mandados a sintetizar

Número del péptido	Secuencia
Péptido 1	IKILSGEGSDKLECEVQLYS
Péptido 2	VIISPVRQCIDKGGRSVAEGDC
Péptido 3	VLRRKDKPNSGLYIHQTS
Péptido 4	FMHGKCVSMSCLEVVGWYS

Los cuatro péptidos seleccionados para producir los anticuerpos contra HAP2 están distribuidos en diferentes regiones de la secuencia de la proteína como se muestra en la Cuadro 6 y en la Figura 14.

Cuadro 6. Localización de las diferentes regiones de HAP2 y de los péptidos seleccionados para el estudio. Se indica el aminoácido de inicio y de término de cada región y péptido.

Regiones de la proteína	Longitud (N. de aa)	Inicio (aa)	Termino (aa)	Color
Péptido señal	34	1	34	Rojo
Dominio HAP2	50	350	400	Azul oscuro
Región transmembranal	75	704	778	Rosa
Péptido 1	20	615	635	Púrpura
Péptido 2	22	35	57	Verde
Péptido 3	16	79	95	Azul claro
Péptido 4	19	185	203	Amarillo

MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGA AVRPASA VIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS 60
 HTNIDVKGGEETASYVLR RKDKPNSGLYIHIQTS LTTLSELEYIMS QDVPSQYREHNRS 120
 VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTG 180
 FGAAFMHGKCVSMSCLEVVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNGY 240
 YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK 300
 FVAVPSWPETDKTVQGS SRKYNCDQEGRD PHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTIESDAIDTT 360
 GTQCDKIGVSMGTWGNEGRLCSTAPNSCIQNLGWYLSERKERVGSGLERPHCVQALLPK 420
 LYGVQPM LARREVRKSKQAAAMEEPESLAEESRTSTAKSAWRGPATYGAEDEDEGEDEDED 480
 EGEDEDEEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAVGFIVSATMD 540
 GPCKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQSVQVEPNSTT 600
 SSVVP IKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDVRSFDKFTDT 660
 SKEDHELKIGAMLSNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKY YTWFLGITGLSFLALL 720
 PVFIPLAR 780

Figura 14 Ubicación de los cuatro péptidos sintetizados de HAP2 dentro de la secuencia predicha de la proteína. Rojo: péptido señal, Verde: Péptido 2, Azul claro: Péptido 3, Amarillo: Péptido 4, Azul oscuro: Dominio HAP2, Rosa: Péptido 1 y Rojo Oscuro: Región transmembranal.

Los cuatro péptidos se localizan en regiones conservadas en cepas de *B. bigemina* de diferentes partes del mundo (Figura 15). La región correspondiente al péptido señal y la región transmembranal no se consideraron para el estudio, seleccionándose la región correspondiente a la porción extracelular de HAP2 que está expuesta y es susceptible de ser reconocida por el sistema inmune.

Nayarit	MTHAVLNRSYKSPLRGAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50
Brasil Río Grande del Sur	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50
Brasil Rondonia	MTHAVLNRSNKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50
Turquía	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50
Cepa Vacunal México	MTHAVLNRSYKSPLRGAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50
Chiapas	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASA	VIISPVRQCIDKGGRS	50

Nayarit	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
Brasil Río Grande del Sur	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
Brasil Rondonia	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
Turquía	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
Cepa Vacunal México	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
Chiapas	VAEGDCEWRSHNTIDVKGGEETASYVLR	RKDKPNSGLYIHIQTS	100
*****;			
Nayarit	ELEYIMSQDVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	150
Brasil Río Grande del Sur	ELEYIMSQDVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	150
Brasil Rondonia	ELEYIM--DVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	148
Turquía	ELEYIM--DVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	148
Cepa Vacunal México	ELEYIMSQDVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	150
Chiapas	ELEYIMSQDVPSQYREHNRSVDYSAMTGGCNC	DALDLEICSKPDALPPS	150

Nayarit	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	200
Brasil Río Grande del Sur	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	200
Brasil Rondonia	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	198
Turquía	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	198
Cepa Vacunal México	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	200
Chiapas	IQDSFNNKACCVCGKNVTDYSPRADFSCTGF	GAAFMHGKCVSMSCLEVVG	200

Nayarit	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	640
Brasil Río Grande del Sur	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	640
Brasil Rondonia	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	631
Turquía	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	647
Cepa Vacunal México	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	641
Chiapas	VQVEPNSTTSSVVP	IKILSGEGSDRLECEVQLYS	641

Figura 15. Péptidos seleccionados conservados en cepas de diferentes partes del mundo de *B. bigemina*. Verde Péptido 2, Azul claro: Péptido 3, Amarillo: Péptido 4, y Rosa: Péptido 1

3. Inmunodetección de HAP2 mediante Inmunoelectrotransferencia

Una vez que los péptidos fueron empleados para producir anticuerpos contra la proteína HAP2 y con el objetivo de probar que dichos anticuerpos reconocen HAP2 de *B. bigemina*, se realizó la inmunodetección de la proteína en el parásito. La inmunodetección fue realizada utilizando extractos totales de parásitos intraeritrocíticos y en extractos totales de fases sexuales inducidas *in vitro* purificadas. De los anticuerpos producidos contra los cuatro péptidos seleccionados, solo los anticuerpos anti-péptido 1 permitieron identificar una banda de un peso molecular de 93 kDa, el cual, es el peso esperado para la proteína HAP2 de *B. bigemina* (Fig. 16), el suero preinmune no reveló ninguna banda. Esto indicó que los anticuerpos anti péptido 1 reconocieron a la proteína HAP2 nativa en fases sexuales del parásito. En los ensayos de Inmunoelectrotransferencia realizados con los extractos totales de parásitos intraeritrocíticos no revelaron la banda correspondiente a la proteína nativa.

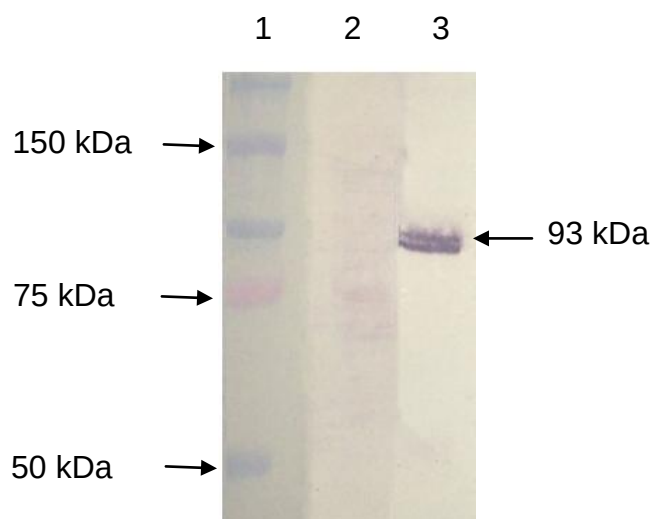


Figura 16. Inmunodetección de HAP2 utilizando los anticuerpos contra el péptido 1 en extractos totales de fases sexuales. 1. Marcador de peso molecular, 2. Fases sexuales incubadas con suero preinmune y 3. Fases sexuales incubadas con suero inmune. La flecha señala la banda equivalente al peso molecular de 93 kDa.

4. Inmunodetección de HAP2 mediante Inmunofluorescencia indirecta.

Una forma adicional de corroborar que los anticuerpos producidos utilizando los péptidos sintéticos reconocían la proteína HAP2 fue la inmunodetección de HAP2 mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos policlonales contra los diferentes péptidos seleccionados para detectar la proteína en fases sexuales del parásito, los resultados indicaron que los anticuerpos reconocieron a la proteína y permitieron visualizar el parásito.

Por otra parte realizamos una cinética para determinar el tiempo adecuado para detener la inducción de fases sexuales y así preparar del antígeno para realizar la inmunofluorescencia indirecta se realizó un monitoreo (Figura 17), el cual permitió determinar que la hora en la que se visualizaban los cuerpos radiados y conglomerados era a las 16 horas postinducción.

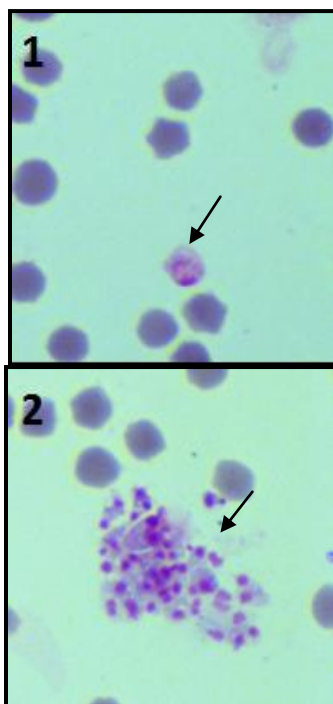


Figura 17. Tinción de Giemsa de las fases inducidas *in vitro*. 1. Tinción de Giemsa de 36 horas post inducción; 2. Tinción de Giemsa de parásitos a las 16 horas post inducción. Objetivo 100x para aceite de inmersión.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta donde se utilizan parásitos de 16 horas post-inducción, incubados con los diferentes anticuerpos contra los 4 diferentes péptidos, permitieron visualizar una señal positiva, verde intensa en forma de filamentos a largados y conglomerados. Esto corresponde con la forma característica de los conglomerados de fases sexuales de *B. bigemina* que han sido reportados previamente (Mosqueda y cols, 2004) y también corresponde con la fotografía teñida con Giemsa de los mismos parásitos, que se muestra en la Figura 17 (2). Como control, los parásitos de 16 horas postinducción que fueron incubados con suero preinmune no mostraron ninguna señal fluorescente. Cuando se incubaron parásitos de 36 horas postinducción con los anticuerpos, estos reconocieron una forma redonda, la señal fluorescente es intensa. La señal observada corresponde en forma y tamaño con la forma reportada para los cigotos de *B. bigemina* y que puede observarse en la Figura 17, 1. Los controles incubados con suero preinmune no emitieron ninguna señal fluorescente.

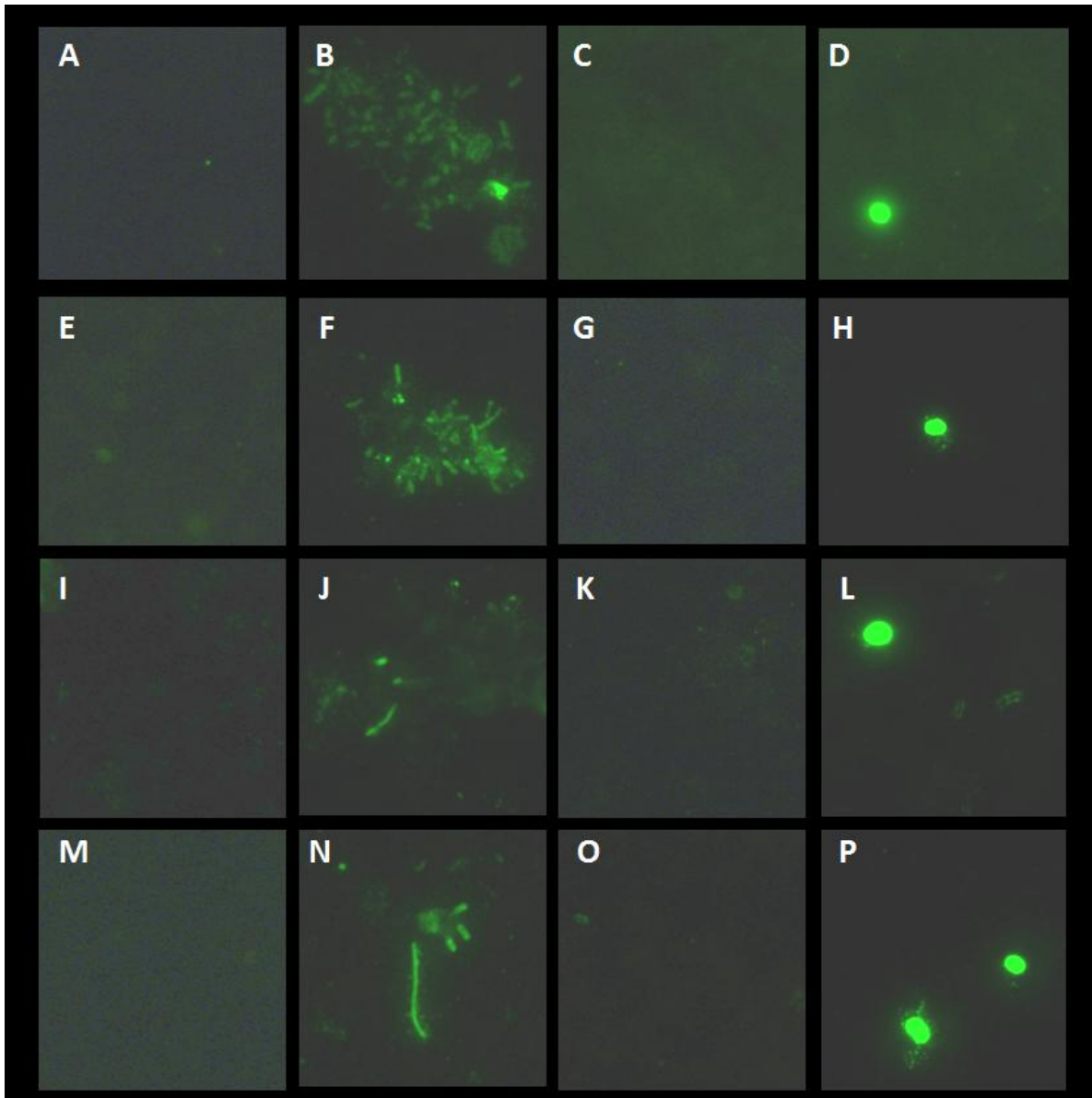


Figura 18. Identificación de la proteína HAP2 en fases sexuales purificadas mediante el uso de anticuerpos contra péptidos específicos. A-D anticuerpos anti-péptido 1, E-H, anticuerpos anti-péptido 2, I-L, anticuerpos anti-péptido 3 y M-P, anticuerpos anti-péptido3. A, E, I y M, fases sexuales de 16 horas incubadas con suero preinmune. B, F, J y N, fases sexuales de 16 horas incubadas con suero inmune. C, G, K y O, fases sexuales de 36 horas incubadas con suero preinmune. D, H, L y P, fases sexuales de 36 horas incubadas con suero inmune. Objetivo 100x PH3 para aceite de inmersión.

En las inmunofluorescencias indirectas realizadas en laminillas de parásitos intraeritrocíticos se observó una señal fluorescente en las laminillas incubadas con el suero inmune, que no fue detectada en el suero preinmune. Sin embargo la señal fluorescente no fue tan intensa (Figura 19) y parece más bien identificar las fases intraeritrocíticas que ya están abandonando los eritrocitos.

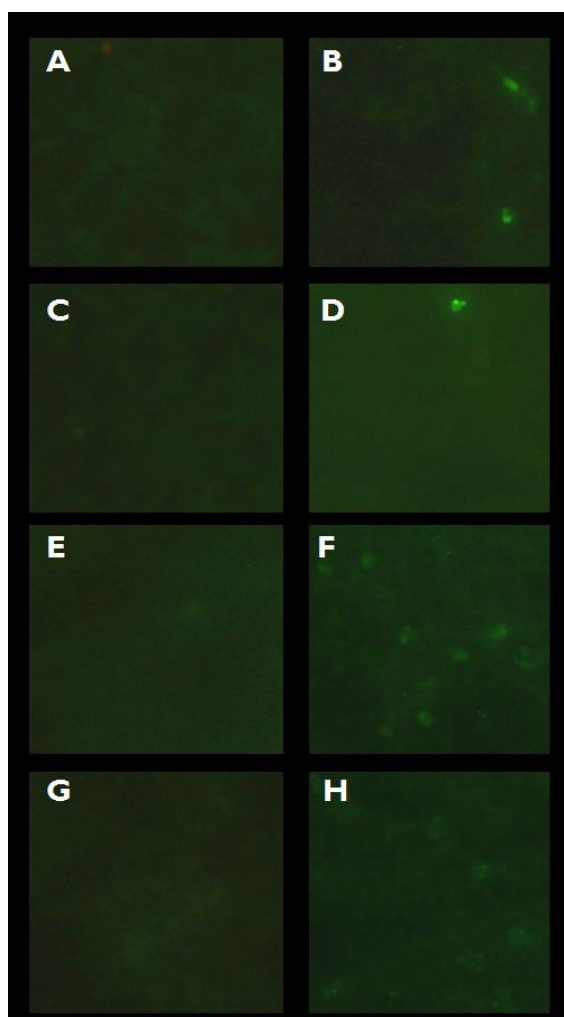


Figura 19. Inmunodetección de la proteína HAP2 en fases intraeritrocíticas. A, C, E y G: suero preinmune. B, D, G y H U: Suero Inmune, A y B Suero del conejo antipéptido 1, C y D Suero de conejo antipéptido 2, E y F Suero de conejo antipéptido 3 y G y H Suero de conejo antipéptido 4. Anticuerpo secundario Alexa488. Objetivo 100x de aceite de inmersión

5. Inhibición de la fusión de fases sexuales de *B. bigemina*

La inhibición de la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina* se realizó induciendo las fases sexuales *in vitro* en un medio adicionado con los anticuerpos anti-HAP2. Para determinar si las fases sexuales se fusionaron o no se evaluó la cantidad de DNA presente en el núcleo mediante la medición de la intensidad de fluorescencia emitida al emplear un fluorocromo (DAPI). El valor de referencia de intensidad se obtuvo cuantificando la intensidad de núcleos haploides a las 0 horas postinducción. El control de la inducción se realizó incubando a *B. bigemina* con el medio de inducción publicado por Mosqueda y colaboradores (2004).

El nivel de la intensidad de los núcleos en las fases sexuales y los cigotos encontrados en las laminillas de 36 horas se realizó utilizando anticuerpos contra el péptido 1 (α -antipéptido1) y anticuerpos contra el péptido 3 (α -antipéptido3). De los datos de intensidad obtenidos se detectaron cuatro poblaciones aquellas que tenían el valor correspondiente a un núcleo haploide ($n = 4.36 \pm 0.0624$) y aquellas con una intensidad correspondiente a un núcleo diploide ($2n = 8.72 \pm 0.0624$), como se esperaba. Además se recopiló información de núcleos con intensidad de núcleo superior a n , pero inferior a $2n$ (que correspondería a una tercera población) y una cuarta población que eran núcleos con valores de intensidad superior a $2n$ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cantidad de núcleos encontrados en los cuatro grupos de poblaciones identificados a las 36 horas postinducción.

Intensidad de núcleo	Medio de Inducción (Control)	α -antipéptido 1 Preimmune	α -antipéptido 1 Post	α -antipéptido 3 Preimmune	α -antipéptido 3 Post
1n	15.667	2	3	5.33	7.667
2n	4	6.333	2.667	6	1.333
1n<>2n	7.333	3.667	1.667	10	8.333
>2n	2.333	14	3.333	4.33	0

Los datos recopilados se procesaron en el programa estadístico Minitab con el cual se pudo determinar mediante una prueba de Shapiro que los valores obtenidos no tenían un comportamiento normal además de no ser paramétricos. Lo anterior se muestra en las gráficas de la Figura 20. Como se puede observar, los valores de intensidad están dispersos en intensidades que van de 3.7 a 28, sin embargo, la mayor concentración de población cae en 3.7 y 8.

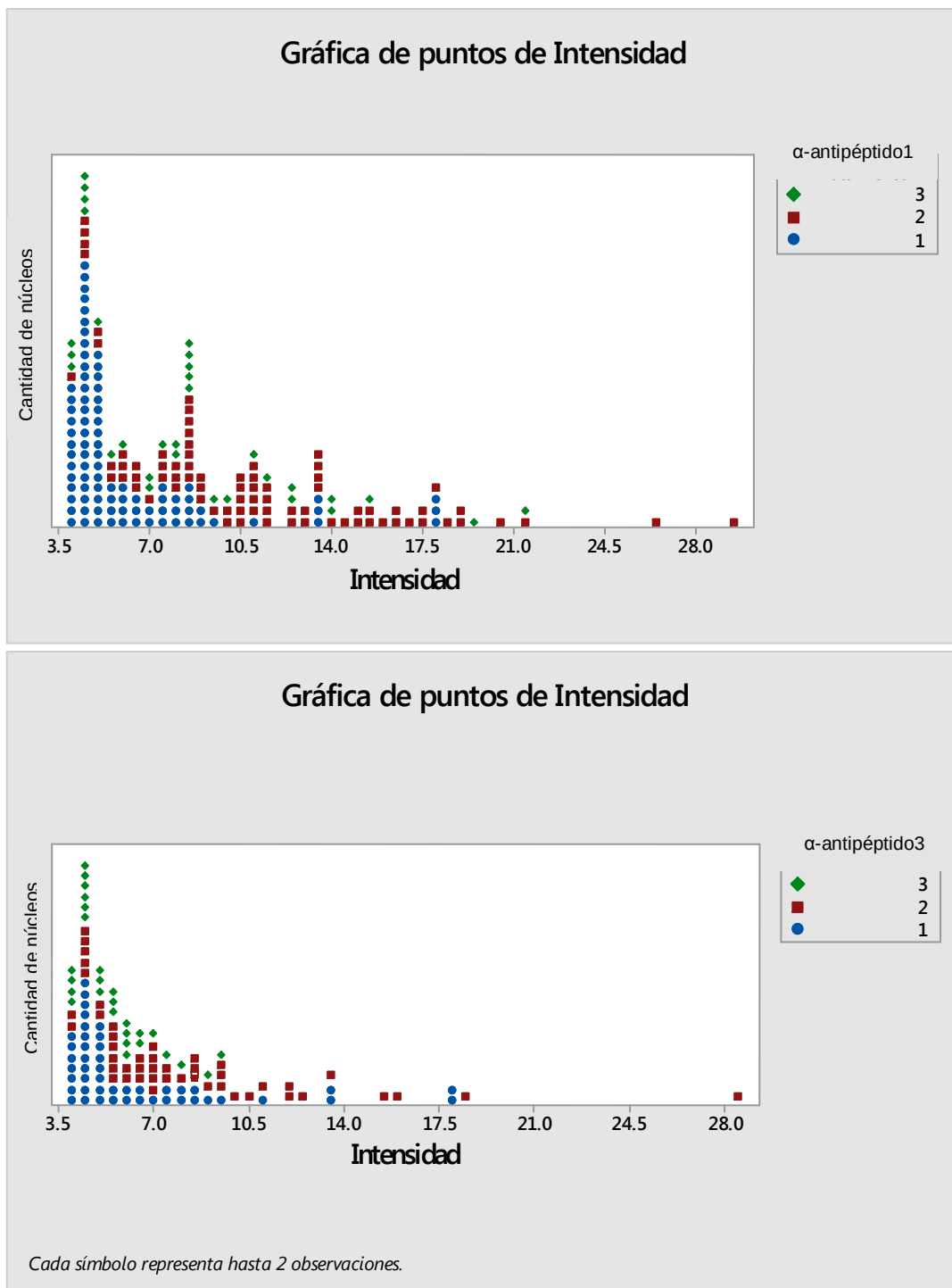


Figura 20. Gráficas que permiten visualizar la distribución de los núcleos cuantificados al incubar con α anti-péptido1 y al incubar con α anti-péptido3. 1= control (medio de inducción) 2= Tratamiento con suero preinmune y 3= tratamiento con anticuerpos (Minitab Ver. 17).

Debido a las características no paramétricas de los datos obtenidos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para determinar la significancia de los resultados cuando se incubó con α -antipéptido1 y con α -antipéptido3 en comparación con el control (medio de inducción). Los resultados obtenidos para la intensidad de los núcleos de la incubación con α -antipéptido1 comparada con la intensidad de los núcleos incubados con el medio de inducción mostraron una $H = 58.27$ $GL = 2$ $P = 0.000$ con valores de Z para el control de -7.29 , para la incubación con el suero preinmune de 6.85 y para la incubación con los anticuerpos de 0.75 , demostrando que para la incubación con los α -antipéptido 1 la diferencia con el control es significativa, mientras que para la intensidad de los núcleos de la incubación con α -antipéptido2 en comparación con la intensidad de los núcleos incubados con el medio de inducción se obtuvo una $H = 26.40$ $GL = 2$ $P = 0.000$ con valores de z para el control de -3.08 , para la incubación con el suero preinmune de 5.14 y la incubación con los anticuerpos de -2.22 .

VII. DISCUSIÓN

La babesiosis bovina representa un problema de salud animal que tiene un gran impacto económico en la ganadería a nivel mundial y de las vacunas que existen para controlar esta enfermedad las que tienen mayor uso hasta la fecha, son las vacunas vivas atenuadas y cuyo desarrollo no ha sufrido muchas modificaciones en los últimos años (Florin-Christensen y cols, 2014).

En años recientes se ha visto un aumento notable en la resistencia a acaricidas del vector transmisor de la babesiosis, incrementando la presión por controlar la enfermedad. Para tratar de contrarrestar este problema se han desarrollado estrategias de control de garrapatas mediante el uso de vacunas anti-garrapatas. El desarrollo de este tipo de vacunas aún depende de la información disponible sobre las interacciones del vector con el hospedero bovino y se enfrenta con el problema de que hace falta un mayor entendimiento de estas interacciones. En adición a lo anterior, se prevé que en los próximos años el hábitat de las garrapata se expanda debido al cambio climático y por lo tanto se incrementarían las posibilidades de transmisión (Florin-Christensen y cols, 2014).

Actualmente debido a la secuenciación del genoma de *B. bovis*, muchos centros de investigación han caracterizado genes y proteínas del parásito que puedan ser utilizados como antígenos vacunales para elaborar una vacuna a partir de subunidades. Sin embargo, el desarrollo de éstas medidas de control aún tiene que afrontar dificultades como tener un mejor conocimiento de la biología del parásito sobre todo en aspectos de las interacciones entre antígenos y el hospedero para identificar puntos de clave del ciclo de vida donde se pueda usar el sistema inmune para controlar la enfermedad. Por lo tanto, a la fecha no existe una vacuna a partir de subunidades de una proteína que haya podido ser empleada para controlar la enfermedad de manera efectiva (Florin-Christensen y cols, 2014; Mosqueda y cols, 2007).

Los esfuerzos para el control de enfermedades transmitidas por vectores como lo son la malaria y la babesiosis bovina están dirigidos al diseño de nuevas estrategias que permitan evitar la transmisión de la enfermedad y que superen los beneficios que se obtienen al emplear vacunas atenuadas vivas, terapia química de la enfermedad o control de las garrapatas mediante acaricidas. Dentro del estudio de la interface vector patógeno, las vacunas bloqueadoras de la transmisión son una prometedora alternativa para el control de enfermedades transmitidas por vectores (Carter, 2001; Mathias, 2012; Miura 2013). Dentro de los candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión se encuentra HAP2 que es una proteína que se está presente en varios organismos apicomplexos, incluyendo *B. bigemina* (Mori, 2009; Rocha, 2010).

El gen *hap2* reportado para *B. bigemina* (Rocha, 2010) codifica para una proteína que cumple con las características estructurales previamente descritas en *P. berghei*, ya que conserva el péptido señal, y un dominio transmembranal. Además la proteína HAP2 predicha posee una región de 50 aminoácidos, la cual es conservada en diferentes cepas de *B. bigemina* y que corresponde al dominio HAP2 reportado previamente por Wong y cols. (2010). La proteína HAP2 de *B. bigemina* debido al grado de conservación de la secuencia de aminoácidos posee características como la presencia del dominio HAP2 y similitud en la estructura de la proteína, esto significaría que tiene características de una proteína de membrana, debido a estas particularidades se plantea la posibilidad de que la función de la proteína HAP2 de *B. bigemina* es la misma a la que se ha reportado en otros protozoarios.

El presente trabajo tuvo por objetivo identificar si la proteína HAP2 participa en la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina*. Con base a la información reportada por Blagborough y Synden (2010) para *P. berghei* donde al utilizar anticuerpos contra la proteína HAP2 se impide la fusión de las fases sexuales de ese

protozoario, bajo esta premisa, realizamos una estrategia de estudio similar de la proteína HAP2, con el objetivo de determinar si anticuerpos anti-HAP2 de *Babesia* bloquean la formación de cigotos *in vitro* y evaluar el grado de importancia de esta proteína en el proceso de la reproducción sexual del parásito; lo que permitiría a futuro proponer a esta proteína como blanco vacunal.

Para cumplir con los objetivos de este trabajo y obtener anticuerpos contra HAP2, inicialmente se planteó la expresión recombinante de la porción extracelular de la proteína HAP2. Para ello se realizó la sub-clonación de un gen sintético en el vector de clonación pCold, que es un sistema con un alto rendimiento de expresión de proteínas, lo cual era una característica deseable ya que se necesitaba purificar suficiente cantidad de proteína para las inmunizaciones. La sub-clonación se realizó con éxito (Figura 13 y Figura 14), ya que el inserto se encontraba en marco de lectura con los demás elementos del vector que permitirían expresar la proteína. A pesar de esto, la inducción de la expresión de HAP2 en el sistema bacteriano no fue posible. Esto se puede deber a que este sistema quizá no fue el más indicado para realizar la expresión de una proteína con las características de HAP2, la cual es una proteína de membrana y que posee en su estructura varios residuos de cisteína, los cuales implican una estructura químicamente compleja. Por lo anterior, se propone a futuro cambiar el sistema de expresión bacteriano por un sistema eucariota como algún sistema de expresión en levaduras, como *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*, que permita expresar proteínas que requieran modificaciones características de los organismos eucariotas (Eckart y Bussineau, 1996).

Por otro lado, se propuso el diseño y el uso de péptidos sintéticos conteniendo epitopos B en regiones conservadas de HAP2 como una alternativa para poder obtener los anticuerpos anti-HAP2. Para el diseño de dichos péptidos se utilizaron predictores bioinformáticos. Los predictores bioinformáticos trabajan con base a algoritmos que predicen la probabilidad de ocurrencia de que una secuencia determinada posea un epitopo B de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de

los aminoácidos de una secuencia determinada y la antigenicidad. Por lo cual, para incrementar la probabilidad de que los péptidos seleccionados contuvieran un epítopo B se diseñó y seleccionó varios péptidos con elevados porcentajes de predicción en los distintos programas bioinformáticos (Mahdavi y cols, 2012).

Cuando se evaluó la capacidad de los anticuerpos generados para detectar la proteína nativa en extractos de fases sexuales del parásito mediante inmunoelectrotransferencia, se observó reconocimiento únicamente con los anticuerpos anti-péptido1. A diferencia de la detección por inmunofluorescencia de HAP2 en fases sexuales completas de *B. bigemina* donde los anticuerpos contra cada uno de los cuatro péptidos permitieron observar las formas características del parásito en sus estadios de reproducción sexual reportados por Mosqueda (2004). De acuerdo con Brayton y colaboradores (2007) quienes realizaron una comparación del genoma de *P. falciparum*, *T. parva* y *B. bovis*; *P. falciparum* tiene un genoma de un tamaño considerablemente mayor al de *B. bovis*, que el genoma de ambos difieren en cuanto al número de cromosomas, y de manera importante, que el número de genes codificantes es considerablemente menor en *B. bovis*. El genoma de *B. bigemina* y *B. bovis* difieren en tamaño, pues el de *B. bigemina* es mayor (10 Mpb), aunque si se compara con el de *Plasmodium* (22.8 Mpb) sigue siendo un genoma pequeño. Por lo tanto, existe la posibilidad de que los genes de *B. bigemina* tengan funciones diferentes, comparados con los genes de otros protozoarios apicomplexos con genomas más grandes. Un ejemplo lo anterior, es la proteína BOV57 de *B. bovis* que es homóloga a la proteína P67 de *T. parva* la cual solo se expresa en los esporozoitos de *Theileria*, y se le atribuye un papel en el tropismo celular del parásito y también en la invasión de la célula huésped, pero en *B. bovis* también se expresa en los merozoitos y los quinetos. En los quinetos se observó que la tasa de transcripción de *bov57* es 100 veces mayor que en los estadios intracelulares, indicando que tiene un papel en la biología de *B. bovis* al interior de la garrapata (Freeman y cols., 2010).

El ejemplo anterior, puede explicar que al igual que la molécula BOV57, la proteína HAP2 de *B. bigemina* puede tener otras funciones además de la fusión de las fases sexuales y por lo tanto pueda sufrir algún proceso de maduración o de modificación postraducciona para poder ejecutar sus diferentes funciones. Dicha hipótesis podría explicar por qué en fases sexuales, los anticuerpos contra los péptidos específicos permiten detectar señal positiva mediante inmunofluorescencia, pero que no reconozcan la proteína desnaturizada en la inmunoelectrotransferencia. Debido a que únicamente el péptido 1 generó anticuerpos que detectaron la proteína en los ensayos de inmunoelectrotransferencia y de inmunofluorescencia indirecta, se determinó que estos anticuerpos se emplearían para el ensayo de inhibición de la fusión de las fases sexuales. También se seleccionaron anticuerpos contra el péptido 3 para realizar la inhibición debido al patrón de señal visualizado en la inmunofluorescencia donde se observaron pocas estructuras alargadas, bastante separadas entre ellas y que morfológicamente asemejan a las prolongaciones de los cuerpos radiados característicos de las fases sexuales de *B. bigemina* cuando aún no se encuentran en conglomerados. El patrón observado en la inmunofluorescencia donde se utilizaron los anticuerpos anti-péptido 1 difiere ya que se observan estructuras estrelladas, en conglomerados. Debido a que se podría tratar de diferentes patrones de distribución de la proteína se determinó conveniente analizar si existiría una diferencia en el uso de unos u otros anticuerpos en el ensayo de inhibición de la fusión de las fases sexuales.

En el ensayo de inhibición de la fusión de las fases sexuales se obtuvieron resultados que indican una diferencia significativa entre los grupos control y los grupos de prueba. En el ensayo de inhibición de la fusión de fases sexuales se observaron pocos individuos en las laminillas durante la cuantificación de la intensidad de los núcleos por lo que los datos fueron no paramétricos. Mosqueda (2004) reportó que los núcleos haploides poseen una intensidad $1n$, mientras que los núcleos de los cigotos poseen una intensidad $2n$. Sin embargo, durante la realización de este ensayo el tiempo de incubación para observar cigotos difirió del

reportado por Mosqueda (2004) siendo un total de 36h el necesario para visualizar las formas características de los cigotos. Todos los ensayos se detuvieron a la misma hora post-inducción.

Al realizar el análisis del nivel de intensidad de los núcleos se observaron 4 poblaciones de núcleos; $1n$, $2n$, intensidad entre $1n$ y $2n$ y una población con una intensidad mayor a $2n$ (cuadro 7). Esta variación puede deberse al uso del suero de conejo durante la inducción. Los datos obtenidos del ensayo de inhibición fueron sometidos a un análisis estadístico el cual indica que al incubar con el α anti-péptido1 existe una diferencia significativa con respecto del control. La inhibición realizada incubando los α -anti-péptido 3 también muestra valores significativos con respecto del control. Sin embargo, a pesar de esta diferencia se alcanzan a detectar cigotos utilizando cualquiera de los dos tratamientos. Cabe destacar, que la presencia de otras poblaciones con núcleos con intensidades intermedias entre $1n$ y $2n$ o mayores a $2n$ también habla de una alteración en el desarrollo del parásito. Los valores de intensidades con valores entre $1n$ y $2n$ se atribuyen a parásitos que entraron en transformación a fases sexuales, mientras que hipotetizamos que los valores de intensidades superiores a $2n$ corresponden a núcleos que se encuentran fusionándose para formar el cigoto.

En el cuadro 7 se observa como varía la cantidad de núcleos encontrada incubando con los diferentes anticuerpos. Como se puede observar hay un importante efecto del suero de conejo sobre la cantidad total de núcleos observados. También se puede observar que la cantidad de núcleos visualizados por laminilla disminuye cuando se emplean los sueros post-inmunización, este efecto es más notorio cuando se incubaba con los α anti-péptido1. Un efecto interesante se observa en las muestras de los ensayos de inhibición en la que se emplearon los anticuerpos α anti-péptido 3 pues no se encontraron núcleos con intensidades superiores a $2n$ y solo se observaron entre uno y dos núcleos con el nivel de intensidad correspondiente a un cigoto en todas las laminillas. Por lo tanto, se puede hipotetizar que quizás los péptidos sintéticos empleados para la

producción de los anticuerpos no contenían las partes funcionales de la proteína y por ello no se logró bloquear la función de HAP2 de manera contundente, es decir, quizás otras regiones que no cumplieron con los requisitos para ser seleccionados como péptidos sintéticos tengan una localización clave en la proteína que permitan que la fusión de membranas siga ocurriendo. Además, considerando las diferencias entre *Plasmodium* y *Babesia*, se puede inferir que la proteína HAP2 no es la única responsable de la fusión de fases sexuales en *B. bigemina*, por lo que cabe la posibilidad de que la fusión de fases sexuales de este protozoario sea una acción conjunta de varias proteínas.

VIII. CONCLUSIÓN

Los anticuerpos producidos en este ensayo permiten identificar al parásito en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y solo los anticuerpos contra el péptido1 permiten reconocer la proteína en extractos totales de fases sexuales.

Los sueros de conejo al ser adicionados al medio de inducción de fases sexuales generan una disminución de la cantidad de parásitos observados por laminilla.

Los anticuerpos utilizados para el ensayo de inhibición de la fusión de las fases sexuales se generaron en conejos, los cuales al agregarse en el medio de inducción producen una disminución de parásitos observados por laminilla, este efecto es más notorio cuando se emplean los sueros postinmunización en comparación con el uso de sueros de conejo únicamente.

Al utilizar el suero con anticuerpos antipéptido1 se observa una mayor disminución de parásitos en las laminillas en comparación con la cantidad total de parásitos observados en las laminillas que se incubaron con los anticuerpos antipéptido3.

Los anticuerpos contra el péptido3 generan una disminución de núcleos con intensidad 2n comparado con los anticuerpos contra el péptido1.

El uso de anticuerpos contra el péptido3 de HAP2 de *B. bigemina* produce una disminución en la formación de cigotos a las 36 horas postinducción.

IX. PERSPECTIVAS

Profundizar en el estudio de los mecanismo moleculares de la transformación en fases sexuales del parásito.

Profundizar el conocimiento de la estructura molecular de la proteína HAP2 de *B. bigemina* para resolver los problemas de expresión de la proteína de manera recombinante.

Producir anticuerpos contra los diferentes péptidos seleccionados en bovinos y emplearlos en el ensayo de inhibición de la fusión de fases sexuales in vitro para eliminar el efecto observado al utilizar sueros de conejos.

Realizar un ensayo de inhibición de la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina* en un sistema *in vivo*.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaa T. M., Junio S. F., Eko W. P., Xuan H. N., Minoda Y., Aboulaila M., Kawai S., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011. Secretion Of A New Spherical Body Protein Of *Babesia Bovis* Into The Cytoplasm Of Infected Erythrocytes. MOL BIOCHEM PARASIT. 178: 4-45.

Babes M. V. 1888. Physiologie Pathologique: Sur L' Hémoglobinurie Bactérienne Du Boeuf. Des Comptes Rendus Des Séances De L'académie Des Sciences. 700: 692-694.

Barros C. S. L, Figuera R. 2008. Babesiosis. In: Foreign Animal Diseases. 7ma Edición. Boca Raton, FL. United States Animal Health Association :147-158.

Beltrán L. G. 1975. National Anti-Thick Campaign. Ectoparasites Seminar. CIAT.

Blackman M. J., Bannister L. H. 2001. Apical Organelles Of Apicomplexa: Biology And Isolation By Subcellular Fractionation. MOL BIOCHEM PARASIT.117: 11–25.

Blagborough A. M., Sinden R. E. 2009. *Plasmodium Berghei* HAP2 Induces Strong Malaria Transmission-Blocking Immunity In Vivo And In Vitro. VACCINE 27: 5187–5194.

Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. 2004. Babesiosis Of Cattle. PARASITOLOGY, 129. 247-S69.

Brayton K., Lau A., Herndon D., Hannick L., Kappmeyer L., Berens S., Bidwell S., Brown W., Crabtree J., Fadrosch D., Feldblum T., Forberger H., Haas B., Howell J., Khouri H., Koo H., Mann D., Norimine J., Paulsen L., Radune D., Ren Q., Smith R., Suarez C., White O., Wortman J., Nene V., 2007. Genome Sequence Of

Babesia Bovis And Comparative Analysis Of Apicomplexan Hemoprotozoa. PLOS PATHOG. 3(10) :1401- 1413

Callow L. L., Dalglish R. J. Y De Vos A. J. 2007. Development Of Effective Living Vaccines Against Bovine Babesiosis The Longest Field Trial? INT J PARASITOL. 27(7)

Carter R. 2001. Transmission Blocking Malaria Vaccines. VACCINE. 19: 2309-2314

Cárdenas E., Ortega A., Campbell T., García Z., Cantú A., Figueroa J., Deyoung R., And Hewitt D. 2011. Nilgai Antelope In Northern Mexico As A Possible Carrier For Cattle Fever Ticks And *Babesia Bovis* And *Babesia Bigemina*. J WILDLIFE DIS. 47 (3): 777-779.

Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O., Malandrin L. 2009. *Babesia* And Its Hosts: Adaptation To Long-Lasting Interactions As A Way To Achieve Efficient Transmission. VET RES, 40:37.

Crewther P. E., Culvenor J. G., Silva A., Cooper J. A., Anders R. F. 1990. *Plasmodium Falciparum*: Two Antigens Of Similar Size Are Located In Different Compartments Of The Rhoptry. EXP. PARASITOL. 70: 193–206.

Cruz R. A. 2014. Expresión De La Proteína SBP4 De *Babesia Bigemina*. Tesis De Licenciatura En Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Universidad Autónoma De Querétaro.

De Vos A. J. 1992. Recent Developments In The Control Of Anaplasmosis, Babesiosis And Cowdriosis: Proceedings Of A Workshop Held At ILRAD, Nairobi, Kenya. Ed. T.T. Dolan. Nairobi: LRAD

Eckart M., Bussineau C. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. CURR OPIN BIOTECH. 7: 525-530

Florin-Christensen M., Suarez C. E., Hines S. A., Palmer G. H., Brown W. C., McElwain T. F. 2002. The *Babesia Bovis* Merozoite Surface Antigen 2 Locus Contains Four Tandemly Arranged And Expressed Genes Encoding Immunologically Distinct Proteins. INFECT IMMUN. 70:3566–3575.

Florin-Christensen M., Suarez C. E., Rodriguez A. E., Flores D., Schittger L. 2014. Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. PARASITOLOGY.141: 1563-1592

Freeman J., Kappmeyer L., Massaro U., McElwain T., Baszler T., Echaide I., Nene V., Knowles D. 2010. A *Babesia bovis* gene syntenic to *Theileria parva* p67 is expressed in blood and tick stage parasites. VET PARASITOL. 173 : 211-218

Gaffar F. R., Yatsuda A. P., Franssen F. F. J., De Vries E. 2004. Erythrocyte Invasion By *Babesia Bovis* Merozoites Is Inhibited By Polyclonal Antisera Directed Against Peptides Derived From A Homologue Of *Plasmodium Falciparum* Apical Membrane Antigen 1. INFECT IMMUN. 72: 2947–2955.

García M. J. 2012. Identificación Molecular De Las Especies De Piroplasmas En Las Poblaciones De Ixódidos De La Comunidad Autónoma Del País Vasco: Distribución Y Prevalencia De *Babesia* Y *Theileria* En Los Ungulados Domésticos Y Silvestres. 1ra Edición. Universidad De Zaragoza. Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia: 36-37

Hirai M., Arai M., Mori T., Miyagishima S., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T., Terenius O., Matsuoka H. 2008. Male Fertility Of Malaria Parasites Is Determined By GCS A Plant-Type Reproduction Factor. CURR BIOL. 18: 607–613

Hirai M., Mori T. 2009. Fertilization Is A Novel Attacking Site For The Transmission Blocking Of Malaria Parasites. ACTA TROP. 114(3):157-161

Johnson M. A., Von Besser K., Zhou Q. Smith E., Aux G., Patton D., Levin J.Z., Preuss. 2004. Arabidopsis Hapless Mutations Define Essential Gametophytic Functions. GENETICS. 168 (2) : 971-982

Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. VET PARASITOL. 137: 1–10

Kaslow D. C. 1997. Transmission-Blooming Vaccines: Uses And Current Status Of Development. INT J PARASITOL. 27 (2) :183-189.

Kawai-Toyooka H, Mori T, Hamaji T, Suzuki M, Olson BJ, Uemura T, Ueda T, Nakano A, Toyoda A, Fujiyama A, Nozaki H. 2014. Sex-specific posttranslational regulation of the gamete fusogen GCS1 in the isogamous volvocine alga *Gonium pectorale*. EUKARYOT CELL. 13: 648-656

Kuehn A., Pradel G. 2010. The coming-Out of Malaria Gametocytes. J BIOMED BIOTECHNOL. 976827: 1-11

Kuttler K. L. 1988. Babesiosis Of Domestic Animals And Man: Chemotherapy Of Babesiosis. CRC PRESS.: 229

Levine N. D. 1982. Apicomplexa. In Synopsis And Classification Of Living Organisms, Mcgraw-Hil Book Co., :571-587.

Liu Y., Tewari R., Ning J. 2008. The Conserved Plant Sterility Gene HAP2 Functions After Attachment Gametes Of Fusogenic Membranes In *Chlamydomonas* And *Plasmodium*. GENE DEV. 22: 1051-1068

Mackenstedt U., Gauer M., Fuchs P., Zapf F., Schein E., Mehlhorn H. 1995. DNA Measurements Reveal Differences In The Life Cycles Of *Babesia Bigemina* And *B. Canis*, Two Typical Members Of The Genus *Babesia*. PARASITOL RES. 81: 595–604.

Mahdavi M1, Mohabatkar H, Keyhanfar M, Dehkordi AJ, Rabbani M. 2012. Linear and conformational B cell epitope prediction of the HER 2 ECD-subdomain III by in silico methods. ASIAN PAC J CANCER PREV. 13(7): 3053-3059

Mathias D., Plieskatt J., Armistead J., Bethony J., Abdul-Majid A., McMillan A., Angov E., Aryee M., Zhan B., Gillespie P., Keegan B., JarlWala A., Resende W., Bottazzi M., Scorpio D., Hotez P., Dinglasan R., 2012. Expression, immunogenicity, Histopathology, and Potency of a Mosquito-Based Malaria Transmission-Blocking Recombinant Vaccine. INFECT IMMUN. 80: 1606 – 1614.

McCosker P. J. 1981. The Global Importance Of Babesiosis. In Ristic, M. And Kreier, J.P. Babesiosis Academic Press, New York.

Mitchell G. H., Thomas A. W., Margos G., Dluzewski A. R., Bannister L. H. 2003. Apical Membrane Antigen 1, A Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates The Close Attachment Of Invasive Merozoites To Host Red Blood Cells. INFECT IMMUN. 72: 154-158.

Miura K., Takashima E., Deng B., Tullo G., Diouf A, Moretz S., Nikolaeva D., Diakite M., Fairhurst R., Fay M., Long C., Tsuboi T. 2013. Functional Comparison of *Plasmodium falciparum* Transmission-Blocking Vaccine Candidates by the Standard Membrane-Feeding Assay. INFECT IMMUN. 81: 4377-4382.

Mori T., Kuroiwa H., Tetsuya T., Kuroiwa T. 2006. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 Is Essential For Angiosperm Fertilization. NAT CELL BIOL.8: 64-71

Mosqueda J., McElwain T. F., Stiller D., Palmer G. H. 2002. *Babesia Bovis* Merozoite Surface Antigen 1 And Rhoptry-Associated Protein 1 Are Expressed In Sporozoites, And Specific Antibodies Inhibit Sporozoite Attachment To Erythrocytes. *INFECT. IMMUN.* 70 (3): 1599–1603.

Mosqueda G. J., Falcón A., Álvarez J., Ramos A. Oropeza-Hernández F., Figueroa J. V. 2004. *B. Bigemina* Sexual Stages Are Induced In Vitro And Are Specifically Recognized By Antibodies In The Midgut Of Infected *Boophilus Microplus* Ticks. *INT J PARASITOL.* 34: 1229-1236.

Mosqueda J. J., Castro L. A., Falcón A., Ramos A., Benítez D., Alcaráz E., Figueroa J., Alvarez A. 2007. *In Silico* Comparative Analysis Of The Glycoprotein 45 In A Vaccinal Strain And Field Isolates Of *Babesia Bigemina* From México And Argentina. *PARASITOLOGY.* 49: 95

Mosqueda J. J., Figueroa J., Alvarez A., Bautista R., Falcón A., Ramos A., Cantó J. G., Vega C. A. 2007. Advances In The Development Of Molecular Tools For The Control Of Bovine Babesiosis In Mexico. *PARASITOLOGY.* 49:19-22

Pengram R. G., Wilson D. D., Hansen, J. W. 2000, Past And Present National Tick Control Programs: Why They Succeed Or Fail. *ANN NY ACAD SCI*, 916: 546–554.

Petrigh R. S. 2010. Identificación Y Caracterización De Antígenos De *Babesia Bigemina*. Tesis Doctoral. Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales. Universidad De Buenos Aires.

Ray B. K., Bailey C. W., Jensen J. B., Carson C. A. 1992. Chromosomes Of *Babesia Bovis* And *Babesia Bigemina*. *MOL BIOCHEM PARASIT.* 52: 123–126.

Riek R. F. 1964. The Life Cycle Of *Babesia Bigemina* In The Tick Vector *Boophilus Microplus*(Canestrini). *AUST J AGRIC RES.* 15: 802-821.

Rocha M. M., 2010. Identificación Y Caracterización Del Gen *Hap2* En *Babesia Bigemina*. Tesis Programa De Maestría En Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma De La Ciudad De México.

Rudzinska M. A., Spielman A., Lewengrub S., Trager W., Piesman J. 1983. Sexuality In Piroplasmas Revealed By Electron Microscopy In *Babesia Microti*. P NATL ACAD SCI USA, 80: 2966–2970.

Salas J. H., González M. M., Noa M., Pérez N. A., Díaz G., Gutiérrez R., Zazueta H., Osuna, I. 2003. Organophosphorus Monica Florin-Christensen and others 1590pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. J AGR FOOD CHEM. 51: 4468–4471.

Saha S., Raghava G. P. S. 2006. Prediction Of Continuous B-Cell Epitopes In An Antigen Using Recurrent Neural Network. PROTEINS. 65(1): 40-48

SIAP. 2012. Cattle Population In Mexico. www.sagarpa.gob.mx.

Smith T., Kilbourne F. 1893. Investigations Into The Nature, Causation, And Prevention Of Texas Or Southern Cattle Fever, BUR ANIM. IND. BULL. 1: 151-152

Smith R. D. 1978. Ciclo Biológico De *Babesia* En La Garrapata. Ciencia Veterinaria, 2: 233-264.

SENASICA. 2014. Campañas Zoosanitaria: Campaña Nacional Contra La Garrapata Boophilus Spp. Fecha De Última Consulta: 30 De Julio De 2012. Disponible En: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4393>

Steele R. E., Dana C. E. 2009. Evolutionary History Of The HAP2/GCS1 Gene And Sexual Reproduction In Metazoans. PLOS ONE. 4: E7680

Quiroz R. H. 2005. Parasitología Y Enfermedades Parasitarias De Animales Domésticos. Editorial Limusa. México, D.F. :187-199.

Vignau M. 2005. Parasitología Práctica Y Modelos De Enfermedades Parasitarias En Los Animales Domésticos. 1ra Edición. Universidad Nacional De La Plata, Argentina, Buenos Aires,: 33-35

Von Besser K., Frank A. C., Johnson M. A., Preuss D. 2006. Arabidopsis HAP2 (GCS1) Is A Sperm-Specific Gene Required For Pollen Tube Guidance And Fertilization. DEVELOPMENT 133: 4761-4769

Wong J. L., Leydon A. R., Johnson M. A. 2010. HAP2(GCS1)-Dependent Gamete Fusion Requires A Positively Charged Carboxy-Terminal Domain. PLOSGENET 6(3):

Wright I. G. 1990. Immunodiagnosis Of And Immunoprophylaxis Against Haemoparasites *Babesia* Sp And *Anaplasma* Sp In Domestic Animals. REV. SCI. TECH. OFF. INT. EPIZ. 19:345-356

Yokoyama N., Okamura M., Igarashi I. 2006. Erythrocyte Invasion By Babesia Parasites: Current Advances In The Elucidation Of The Molecular Interactions Between The Protozoan Ligands And Host Receptors In The Invasion Stage. VET PARASITOL. 138: 22-32.

Zhou J., Yang J., Zhang G., Nishikawa Y., Fujisaki K, Xuan X. 2006. *Babesia Gibsoni*: An Apical Membrane Antigen-1 Homologue And Its Antibody Response In The Infected Dogs. EXP PARASITOL. 114: 329–333.

XI. APÉNDICE

SOLUCIONES

IDTE pH 8.0

Tris	10 mM
EDTA	0.1 mM

PBS (10X) pH 7.2

NaCl	80,06 g
KCl	2,23 g
Na ₂ HPO ₄	11,35 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Agua destilada	Cbp 1 L

VYM

CaCl ₂ .2H ₂ O	16,0 mg
KCl	400,0 mg
KH ₂ PO ₄	1415,4 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	154,0 mg
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1450 mg
NaCl	7077,0 mg
Dextrosa	20,5 g
Adenina	0,25 mM
Guanosina	0,50 mM
Agua destilada	Cbp 1 L

TBS

Tris (HCl)	50 mM
NaCl	150 mM
Agua destilada	C.b.p 1 L

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 21 de abril de 2015, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la M.V.Z. María Elena Paredes Martínez.

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

M en C. Elba Rodríguez Hernández
