



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Identificación y caracterización inmunológica de epítomos de proteínas involucradas en la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

M. C. Mario Hidalgo Ruiz

Dirigida por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Octubre 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE EPÍTOPOS
DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA INVASIÓN DE B. BOVIS A LOS
ERITROCITOS.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

M. C. Mario Hidalgo Ruiz

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

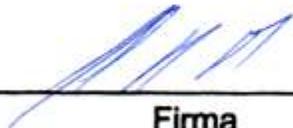
SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente



Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Secretario



Firma

Dra. Bertha Isabel Caryajal Gamez
Vocal



Firma

Dra. Minerva Camacho Nuez
Suplente



Firma

Dra. Silvina Elizabeth Wilkowsky
Suplente



Firma



Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Nombre y Firma
Director de la Facultad



Dra. Ma. Gpe. Flavia Loarca Piña
Nombre y Firma
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
Octubre 2018

RESUMEN

Babesia bovis, es un protozoario del filo Apicomplexa y agente causal de la babesiosis bovina, la enfermedad económicamente más importante transmitida por artrópodos. El proceso de invasión de *B. bovis* a los eritrocitos de bovino se caracteriza por cuatro etapas: 1) Anclaje inicial del parásito a los eritrocitos, 2) Reorientación del merozoíto, 3) Unión estrecha o unión en movimiento y finaliza con la 4) Internalización del parásito dentro del eritrocito; algunas proteínas identificadas y caracterizadas en diferentes parásitos del filo Apicomplexa tienen funciones involucradas en este proceso y son consideradas como antígenos vacunales. Sin embargo, los epítomos B de estas proteínas que generan una inmunidad neutralizante aún no han sido identificados y caracterizados en *B. bovis*. Por lo tanto, en este estudio mediante análisis bioinformático se identificaron péptidos conservados que contienen epítomos B de las proteínas AMA-1, RAP-1, MSA-2c, RON2 y MIC-1. Estos péptidos fueron sintetizados en un sistema peptídico multi-antigénico de ocho brazos (MAPS-8) e inmunizados en cuatro ocasiones en dos bovinos por cada péptido. Se colectaron muestras de suero pre y post-inmunización que se evaluaron mediante ELISA, los péptidos P1-AMA1 y P1-MSA2c no generaron una respuesta inmune mostrando un resultado negativo en el ELISA. Los demás péptidos mostraron títulos de 1:2000 en ambos bovinos inmunizados, excepto los péptidos P2-AMA1, P2-RAP1 y P3-RAP1. Aunque todos estos sueros de bovinos fueron capaces de reconocer fases intraeritrocíticas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), solo 9 de 23 fueron capaces de inhibir el proceso de invasión en ensayos de neutralización in vitro. Algunos de estos péptidos también fueron reconocidos por sueros de animales naturalmente infectados. Estos resultados demuestran que no todos los epítomos B de estas proteínas confieren una inmunidad humoral neutralizante, por lo que esta caracterización inmunológica permitió identificar los péptidos que generan una respuesta inmune en bovinos con presencia de anticuerpos neutralizantes que bloquean el proceso de invasión, haciendo de estos péptidos potenciales candidatos vacunales.

(Palabras clave: Babesiosis bovina, *Babesia bovis*, péptidos, inhibición de la invasión, anticuerpos neutralizantes)

SUMMARY

Babesia bovis is a protozoan parasite from the filo Apicomplexa and is the causative agent of bovine babesiosis, the most important economic disease transmitted by arthropods. The invasion process of *B. bovis* to the bovine erythrocytes consists of four steps: 1) Parasite attachment to the RBCs, 2) Merozoite reorientation, 3) Tight junction or moving junction, and 4) parasite internalization inside the RBCs; some proteins identified and characterized in different apicomplexan parasites have functions involved in this process and have been proposed as vaccine candidates. Although, the B-cell epitopes of these proteins that elicit a neutralizing immunity have not been identified and characterized yet in *B. bovis*. Therefore, in this study the B-cell epitopes inside conserved regions of AMA-1, RAP-1, MSA-2c, RON-2, yMIC-1 proteins were identified with bioinformatics analysis. These regions were synthesized as multi-antigen peptide system of eight branches (MAPS8) and immunized four times in two bovines for each peptide. Pre and post-immunization sera samples were collected and evaluated by ELISA, just the peptides P1-AMA1 and P1-MSA2c did not elicited an immune response with a negative result in the ELISA test, the others shown titers of 1:2000 in both immunized bovines, except the peptides P2-AMA1, P2-RAP1 and P3-RAP1. Even though all these serum samples were able of recognize the blood stage parasites in an Indirect Fluorescence Antibody Test, just 9 of out 23 were able to block the invasion process in the in vitro neutralization assay. Some of these peptides were also recognized by sera from naturally infected cattle. These results are evidence that not all the B-cell epitopes of these proteins elicit a humoral and neutralizing immunity. Therefore, this immunological characterization allowed the identification of peptides that generate an immune response in bovines with the presence of neutralizing antibodies that block the invasion process, making these peptides potential vaccine candidates.

(Key words: Bovine babesiosis, *Babesia bovis*, peptides, invasion inhibition, neutralizing antibodies)

DEDICATORIA

A mis papas: Mario Luis Hidalgo Morales y Macrina de Jesús Ruiz Peña, porque todos mis éxitos también son de ustedes.

A mis angelitos: Mi abuelita Lucy, mis abuelitos José y Roberto, mi tío Migue, mi primo Darío. Porque sé que en donde quiera que estén, están compartiendo mis alegrías.

A mi familia: Desde mi abuelita Ofe, hasta la nueva integrante: Ángela. Porque tal vez me he perdido de tiempo juntos, pero no he perdido el cariño y el amor por todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios por permitirme alcanzar una más de las metas que me he propuesto, y a mis padres por estar conmigo siempre apoyándome de manera constante, incansable e indudable.

Agradezco inmensamente todo el tiempo, consejos y apoyo brindado por los integrantes de mi comité tutorial y colaboradores: Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, Dra. Angelina Rodríguez Torres, Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez, Dr. Carlos E. Suarez, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dra. Silvina Elizabeth Wilkowsky. Por el apoyo técnico proporcionado a Paul Lacy y Jacob Laughery. A Martín Andrés López Padilla y a David Alvarado Hernández por proporcionar todas las facilidades necesarias para el trabajo con los bovinos. A todos mis compañeros y amigos, que estuvieron ahí ayudándome de una u otra manera, haciendo alegre y divertida esta travesía, haciendo ligera la carga y compartiendo muchos momentos durante este tiempo; aunque no los nombraré en una lista todos ustedes son muy importantes.

Finalmente, por el apoyo económico brindado a: CONACyT (Ciencia Básica: 167129), PRODEP-REDES y a la UAQ (FOPER).

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
I. PRÓLOGO	1
II. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Antecedentes	1
Respuesta inmune en la babesiosis	2
Proceso de invasión	3
Antígenos vacunales en apicomplexas.....	4
Proteínas de la familia VMSA	4
Proteína 1 de las micronemas (MIC1)	5
Antígeno de la membrana apical (AMA-1).....	5
AMA-1 y su interacción con la proteína 2 del cuello de las roptrías (RON-2).....	6
Proteína 1 asociada a roptrías (RAP-1).....	7
Justificación.....	7
Hipótesis	8
Objetivo General	8
Objetivos específicos	8
III. CAPÍTULO I: RON2 de <i>Babesia bovis</i> contiene epítomos B conservados que en ganado inmunizado inducen una respuesta inmune humoral que bloquea el proceso de invasión.	9
3.1. Resumen	9
3.2. Antecedentes.....	10
3.3. Resultados.....	11
3.3.1. El genoma de <i>Babesia bovis</i> codifica para un gen ortólogo de <i>ron2</i>	11

3.3.2.	El gen <i>ron2</i> se transcribe en cepas virulentas y atenuadas de <i>Babesia bovis</i>	15
3.3.3.	RON2 es expresado en <i>Babesia bovis</i> y contiene péptidos inmunogénicos.	16
3.3.4.	Reconocimiento de parásitos intraeritrocíticos de <i>Babesia bovis</i> por sueros anti-RON2	17
3.3.5.	Ensayo de Neutralización <i>in vitro</i>	17
3.3.6.	Los péptidos sensibles al efecto neutralizante están implicados en la respuesta inmune natural.....	20
3.4.	Discusión	22
3.5.	Conclusión	25
3.6.	Metodología	25
3.6.1.	Extracción de DNA de aislados de campo de <i>Babesia bovis</i>	25
3.6.2.	Identificación y secuenciación de <i>ron2</i> en <i>Babesia bovis</i>	26
3.6.3.	Evaluación <i>in silico</i> de la transcripción	27
3.6.4.	Análisis de expresión	28
3.6.5.	Generación de anticuerpos anti-RON2	29
3.6.6.	Reconocimiento de parásitos por anticuerpos anti-RON2 en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	30
3.6.7.	Ensayo de Neutralización	30
3.6.8.	Reconocimiento de RON2 de <i>Babesia bovis</i> por sueros de bovino naturalmente infectados.....	31

IV. CAPÍTULO II: Inmunocaracterización de péptidos con epítomos B conservados de las proteínas AMA-1, MSA-2c, RAP-1 y MIC-1 de *Babesia bovis*.32

4.1.	Metodología	32
4.1.1.	Obtención de secuencias y diseño de péptidos	32
4.1.2.	Producción de anticuerpos anti-péptido	32
4.1.3.	Determinación de la inmunogenicidad de los péptidos	32
4.1.4.	Reconocimiento de parásitos por anticuerpos anti-péptido en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	33
4.1.5.	Ensayo de Neutralización <i>in vitro</i>	33
4.2.	Resultados y Discusión.....	33
4.2.1.	Diseño de péptidos y evaluación de la inmunogenicidad	33
4.2.2.	Identificación de parásitos intraeritrocíticos por anticuerpos anti-péptido por IFI	35
4.2.3.	Ensayo de neutralización <i>in vitro</i>	41
4.2.4.	Conclusión	43

V. CONCLUSIÓN GENERAL	43
LITERATURA CITADA.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores diseñados de <i>ron2</i> de <i>Babesia bovis</i>	13
Tabla 2. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de nucleótidos .	13
Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos	14
Tabla 4. Características físico-químicas de RON2	14
Tabla 5. Péptidos diseñados en regiones conservadas con epítomos B lineales predichos.....	16
Tabla 6. Los péptidos de RON2 son inmunodetectados por sueros de bovinos naturalmente infectados	21
Tabla 7. Secuencias de AMA-1 obtenidas del GenBank	36
Tabla 8. Secuencias de MSA-2c obtenidas del GenBank.....	37
Tabla 9. Secuencias de RAP-1 obtenidas del GenBank.....	38
Tabla 10. Secuencias de MIC-1 obtenidas del GenBank.....	38
Tabla 11. Péptidos diseñados y resultados de la prueba de ELISA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de <i>ron2</i> en <i>Babesia bovis</i>	12
Figura 2. Análisis de transcripción y expresión de <i>ron2</i>	15
Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de parásitos intraeritrocíticos de <i>Babesia bovis</i> con anticuerpos anti-RON2.....	18
Figura 4. Microscopía confocal.	19
Figura 5. Ensayo de Neutralización <i>in vitro</i>	20
Figura 6. Representación esquemática de las proteínas y localización de los péptidos diseñados.	34
Figura 7. Evaluación de los anti-sueros por IFI.....	40
Figura 8 Evaluación del efecto biológico de anticuerpos anti-péptidos.....	42

I. PRÓLOGO

La presente tesis contiene información que se contempla será publicada en dos artículos científicos, el primero fue publicado en la revista *Parasite & Vectors*. El segundo aún se encuentra en proceso de elaboración. Debido a esto, la metodología y los resultados serán presentados en capítulos que mantienen en general las normas editoriales de acuerdo a las revistas que fueron seleccionadas para la publicación de los artículos, por lo que el formato de secciones, tablas y figuras puede ser diferente entre capítulos. Todos los procedimientos realizados en bovinos fueron aprobados por el comité de ética del uso animal de la FCN, documento #17FCN2017.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes

En México, uno de los sectores económicos más importantes es el pecuario, por ejemplo, en el 2017 en la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA 2017) el INEGI reportó 31,948,274 de bovinos en el país. La babesiosis bovina es económicamente, la enfermedad transmitida por artrópodos más importante, debido a la pérdida en la producción de carne y leche. Basándose en el impacto económico que genera, las especies de *Babesia* que afectan a los bovinos (*Babesia bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*) son las más estudiadas (Bock et al., 2004; Schnittger et al., 2012). En tanto que, la garrapata *Ixodes ricinus* que transmite *B. divergens* se localiza en el norte de Europa, las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus annulatus* se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales del mundo transmitiendo *B. bovis* y *B. bigemina*. Por lo tanto, *B. bovis* y *B. bigemina* son de particular importancia debido a que tienen el potencial para infectar y causar la enfermedad en una gran proporción de bovinos (Bock et al., 2004; Chauvin et al., 2009; Madder et al., 2011; Zintl et al., 2003). Aunque ambos parásitos protozoarios causan cuadros clínicos en los bovinos infectados, los signos clínicos asociados a una infección con *B. bovis* son más severos que los causados por *B. bigemina*, y si no se trata, es frecuentemente fatal (Gohil et al., 2013).

El diagnóstico y el tratamiento de la babesiosis son importantes herramientas en su control. El cual puede ser mediado por el manejo de las garrapatas, la inmunización, el uso de fármacos anti-babesia o la combinación de estos métodos (Suarez y Noh, 2011). Actualmente no se cuenta con una vacuna segura y eficiente para la prevención de la babesiosis bovina. En algunos países el control de esta enfermedad se basa en la vacunación usando parásitos atenuados, que confirieren una inmunidad protectora restringida a la región geográfica y con el riesgo de que exista una reversión de la virulencia (de Waal y Combrink, 2006; Rodríguez et al., 2014). Lo anterior hace que el uso de estas vacunas sea limitado y que el uso de fármacos sea el principal método de control de la babesiosis; sin embargo, el periodo de retiro en carne y leche de estos fármacos es muy prolongado, por lo que se ha estimulado el interés en el desarrollo de estrategias más efectivas para la prevención (Mosqueda et al., 2012; Salama et al., 2013).

Respuesta inmune en la babesiosis

Para lograr controlar esta enfermedad, es necesario conocer cómo interactúan los merozoítos de *Babesia* con el sistema inmune del bovino y el ciclo de vida de los parásitos dentro del hospedero, el cual es relativamente sencillo, con la invasión de los merozoítos directamente a los eritrocitos sin la necesidad de una etapa fuera de ellos. Por lo cual, la respuesta inmune está dirigida contra los parásitos intraeritrocíticos y contra los merozoítos libres (Chauvin et al., 2009).

El papel de la respuesta celular en la protección contra el parásito es demostrado por la alta susceptibilidad de animales esplenectomizados a la infección por *Babesia*. Durante la infección aguda con *B. bovis*, la respuesta inmune innata parece ser esencial y requiere la producción de interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18). Estas interleucinas estimulan a las células NK (Natural Killer) para producir altos niveles de interferón gama (INF- γ), que induce la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos (García et al., 2004; Goff et al., 2006; Shoda et al., 2000). Durante la infección crónica, la lisis de los eritrocitos infectados es también principalmente mediada por el NO producido por macrófagos del bazo activados por

el INF- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Este mecanismo después es regulado por citocinas tipo 1 y es inhibido por las interleucinas 4 y 10 (IL-4, IL-10) (Goff et al., 2002, 2001).

La evolución de la infección aguda depende del momento, de la localización y de las cantidades producidas de citocinas del tipo Th1 (Chauvin et al., 2009). La respuesta inicial es únicamente protectora si el INF- γ y la IL-12 son producidas antes que la IL-10. Cuando la IL-10, la IL-12 y el INF- γ son producidos al mismo tiempo, la respuesta tipo Th1 y la producción de NO en el bazo es retrasada o disminuida, lo que permite la manifestación de la enfermedad (Goff et al., 2001). Por otro lado, durante la infección crónica, los bajos niveles de parásitos persistentes inducen la activación de la respuesta inmune adaptativa: linfocitos Th1 activan la producción de IgG, particularmente IgG2 opsonizante y los mecanismos de lisis de los eritrocitos infectados es mediada por macrófagos y NO (Brown, 2001).

Proceso de invasión

El proceso de invasión del eritrocito por *Babesia* es similar al de otros parásitos del filo Apicomplexa y se caracteriza por cuatro pasos: 1) Anclaje, este proceso consiste en el anclaje de los parásitos al eritrocito del hospedero. 2) Re-orientación, para colocar los orgánulos cerca de la interface de anclaje. 3) Unión estrecha ó unión en movimiento, en el cual se une la membrana del parásito con la del eritrocito. Finalmente, la 4) invasión, en el cual se propicia la penetración de la membrana del eritrocito a través de varias interacciones moleculares de los ligandos del protozooario con los receptores blanco de la superficie celular del hospedero, concluyendo este proceso con la internalización del parásito en el eritrocito (Dubremetz et al., 1998; Soldati et al., 2001; Yokoyama et al., 2006). Desde el primer anclaje hasta la internalización completa, los parásitos Apicomplexa liberan proteínas de sus orgánulos apicales (roptrías, micronemas y los cuerpos esféricos), localizados en la parte anterior del parásito y formando el complejo apical. Las proteínas contenidas en estos orgánulos son translocadas hacia la membrana del merozoíto, en donde pueden funcionar como factores de reconocimiento del

hospedero. Pueden ser secretadas en el medio fuera del parásito o dirigidas al punto de la invaginación de la membrana, con el fin de hacer uniones estrechas con los eritrocitos del hospedero y lograr su penetración e internalización en el eritrocito (Preiser et al., 2000; Sam-Yellowe, 1996; Yokoyama et al., 2006).

Antígenos vacunales en apicomplexas

En el proceso de invasión, diversas moléculas de la cubierta de superficie del merozoíto pueden estar involucradas en el anclaje inicial al eritrocito. Por esta razón, se ha propuesto que los candidatos vacunales de muchos protozoarios patógenos Apicomplexa pueden ser proteínas de superficie que poseen anclajes glicosilfosfatidilinositol (GPI) ya que pueden jugar un papel importante en la sobrevivencia del parásito (Rodríguez et al., 2014). La protección en contra de *Toxoplasma gondii* se logró por la vacunación en ratones con construcciones en adenovirus que codifican para antígenos primarios de superficie con anclaje GPI (Caetano et al., 2006). En *Plasmodium falciparum*, la principal proteína de superficie con anclaje GPI de los esporozoítos y esquizontes, la proteína del circumsporozoíto (CSP) y la principal proteína de superficie (MSP-1 y 2), respectivamente, han conferido grados variables o hasta completa protección en contra del desafío en modelos roedores (Holder y Freeman, 1981; Plassmeyer et al., 2009; Reece et al., 2004). Adicionalmente, también se ha demostrado que la proteína recombinante Bd37, una proteína de *B. divergens* con anclaje GPI, protegió a jerbos en contra del desafío heterólogo con este parásito (Hadj-Kaddour et al., 2007).

Proteínas de la familia VMSA

En *B. bovis*, un grupo de proteínas pertenecientes a la familia del antígeno variable de la superficie del merozoíto (VMSA) ha sido propuesto como candidato vacunal ya que estas proteínas están involucradas en el anclaje inicial al eritrocito y son expresadas en la superficie del merozoíto y del esporozoíto. Anticuerpos en contra de esta proteína han neutralizado la invasión *in vitro* al eritrocito (Carcy et al., 2006; Florin-Christensen et al., 2002; Hines et al., 1995, 1992; Mosqueda et al., 2002a; Suarez et al., 2000; Wilkowsky et al., 2003; Yokoyama et al., 2006). La

familia VMSA está integrada por las proteínas MSA-1 (42 kDa), MSA-2a₁, MSA-2a₂, MSA-2b y MSA-2c, las cuales se caracterizan por un péptido señal en el extremo amino-terminal, una región central hidrofóbica, y una región carboxilo terminal conservada conteniendo una secuencia señal de anclaje GPI. Sin embargo, los epítomos de las proteínas VMSA expuestos en la superficie no están conservados completamente entre las proteínas que conforman esta familia y entre las cepas de distintas regiones geográficas (Carcy et al., 2006; Lau et al., 2010; Yokoyama et al., 2006).

Proteína 1 de las micronemas (MIC1)

En *B. bovis* fue identificado un gen que codifica para una proteína similar a la proteína 1 de las micronemas (MIC1) de *Toxoplasma gondii*. Este gen está localizado en el cromosoma tres y es altamente conservado entre distintas cepas de *B. bovis*. Su función está involucrada en el proceso de cito-adherencia mediante la unión al ácido siálico e invasión a las células. Anticuerpos en contra de la proteína recombinante y péptidos sintéticos de regiones antigénicas de MIC1 de *B. bovis* inhiben significativamente la invasión *in vitro* de eritrocitos en cultivos de *B. bovis* (Silva et al., 2010). Recientemente se hizo la caracterización de esta proteína en *B. bigemina*, demostrando que péptidos que contienen epítomos B lineales específicos de esta proteína generan la producción de anticuerpos que inhiben la invasión *in vitro* de *B. bigemina* a los eritrocitos (Hernández-Silva et al., 2018).

Antígeno de la membrana apical (AMA-1)

Otra proteína de las micronemas es AMA-1 (por sus siglas en inglés, Apical membrane antigen-1) es una proteína que existe en todos los parásitos apicomplexos y tiene una función indispensable en la invasión a las células del hospedero. Es una proteína integral de la membrana tipo 1, con las siguientes características: 1) un ectodominio rico en cisteínas en el extremo N-terminal, 2) un único dominio transmembranal y 3) un tallo citoplasmático contenido en la región C-terminal. El ectodominio está organizado en 3 dominios para la formación de puentes de disulfuro entre los residuos de cisteína conservados (Narum y Thomas,

1994; Remarque et al., 2008). Inmunizaciones con AMA-1 de *Plasmodium* protegieron a ratones en contra de la fase eritrocítica de malaria y los anticuerpos inhibieron la invasión de los eritrocitos (Remarque et al., 2008). Asimismo, la inmunización de ratones con AMA-1 de *Toxoplasma gondii* confirió un grado significativo de protección en el modelo ratón (Dautu et al., 2007). El análisis bioinformático de AMA-1 de *B. bovis*, reveló la presencia de péptidos altamente conservados entre diferentes cepas de *B. bovis* (99-100%) y con AMA-1 de otras especies de *Babesia* (45-79%) dentro de los dominios 1 y 2. Se demostró que al incubar anticuerpos en contra de la región central de AMA-1 de *B. bovis* (que contiene los ectodominios 1 y 2) con merozoítos libres, los anticuerpos inhibieron la invasión de los parásitos a los eritrocitos en un 61% y 70% a las 3 y 6 horas de incubación respectivamente (Salama et al., 2013).

AMA-1 y su interacción con la proteína 2 del cuello de las roprías (RON-2)

En *Plasmodium falciparum*, se ha demostrado que AMA-1 es translocado a la superficie del merozoíto e interactúa con la proteína 2 del cuello de las roprías (RON2) que es transferida a la membrana del eritrocito durante la invasión, esta interacción entre AMA-1 y RON2 es esencial para la invasión e irreversible y se conoce como unión estrecha o conexión móvil de la expresión en inglés moving junction (MJ). Las moléculas que permiten la inhibición de la interacción entre estas dos proteínas podrían convertirse en nuevas medidas terapéuticas anti-malaria (Srinivasan et al., 2013). Recientemente se ha postulado que la formación del MJ es iniciada cuando RON2 es secretado de las roprías del parásito en un complejo preformado con RON4, 5 y 8 (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2011; Straub et al., 2009), este complejo es descargado en el eritrocito, RON2 se integra en la membrana del eritrocito y sirve como receptor para AMA-1 ubicado en la superficie del parásito (Shen y Sibley, 2012; Silvie et al., 2004). El gen que codifica para la proteína RON2 fue identificado y caracterizado en *B. bigemina* (Calvo-Olvera, 2015), en *B. divergens* y *B. microti* se demostró que anticuerpos en contra de esta proteína tienen un efecto inhibitorio sobre el proceso de invasión (Ord et al., 2016).

Proteína 1 asociada a roptrías (RAP-1)

Otra proteína de las roptrías presente en *B. bovis* es RAP-1 (proteína 1 asociada a roptrías de 60kDa). En *B. bovis*, solo 2 genes idénticos de *rap-1* fueron identificados, mientras que en *B. bigemina* la familia de genes *rap-1* está presente como un complejo en tándem compuesto por tres diferentes tipos de genes: *rap-1a*, *rap-1b*, y *rap-1c* (Suarez et al., 2003). Los miembros de la familia RAP-1 tienen características moleculares bien definidas como son la presencia de un péptido señal, la conservación estricta de 4 residuos de cisteína, un motivo de 14 aminoácidos (aa) y muchos motivos cortos presentes en los primeros 300 aa (Dalrymple et al., 1993; Suarez et al., 1994, 1991a, 1991b). Aunado a esto, RAP-1 contiene diversos epítomos inmunogénicos responsables de la inducción de la inmunidad humoral en el hospedero y su estructura es altamente conservada entre diversos aislados y es expresado en los esporozoítos. Anticuerpos específicos pueden inhibir el anclaje del esporozoíto a los eritrocitos (Brown et al., 1996; Mosqueda et al., 2002b; Suarez et al., 1993).

Justificación

Debido a la necesidad del desarrollo de vacunas más seguras y efectivas, los estudios recientes se basan en la identificación de moléculas que generen una respuesta inmune que bloquee el proceso de invasión del parásito a los eritrocitos (Salama et al., 2013). Con ayuda de herramientas bioinformáticas para el análisis *in silico* de proteínas implicadas con funciones indispensables en el ciclo de vida de *B. bovis* como MSA-2c, MIC-1, AMA-1, RON2 y RAP-1, es posible la identificación de péptidos con epítomos B lineales conservados. La caracterización de la respuesta inmune producida en bovinos por estos péptidos, permitirá la selección de estos como potenciales candidatos vacunales para la elaboración de antígenos multi-epitopicos que bloqueen el proceso de invasión.

Hipótesis

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de investigación:

Proteínas implicadas en la invasión de *B. bovis* al eritrocito tienen epítomos conservados, expuestos e inmunogénicos que generan una respuesta inmune que bloquea la invasión del parásito a los eritrocitos.

Objetivo General

Identificar epítomos conservados, expuestos e inmunogénicos de las proteínas MSA-2c, MIC-1, AMA-1, RON2 y RAP-1, que generan una respuesta inmune que bloquea la invasión del parásito a los eritrocitos.

Objetivos específicos

1. Obtener secuencias de proteínas de diferentes cepas de *B. bovis* implicadas en la invasión del parásito a los eritrocitos.
2. Identificar péptidos con epítomos conservados, expuestos e inmunogénicos.
3. Evaluar la capacidad de los anticuerpos generados de inhibir la invasión del parásito a los eritrocitos.

III. CAPÍTULO I: RON2 de *Babesia bovis* contiene epítomos B conservados que en ganado inmunizado inducen una respuesta inmune humoral que bloquea el proceso de invasión.

3.1. Resumen

Antecedentes: *Babesia bovis* proviene del filo Apicomplexa y es el principal agente causal de la babesiosis bovina, la enfermedad veterinaria transmitida por artrópodos más importante. En parásitos apicomplexas, la interacción entre AMA-1 y RON2 es necesaria para el proceso de invasión y es un objetivo para el desarrollo de vacunas. La existencia de AMA-1 ya ha sido reportada en *B. bovis*; Sin embargo, se desconoce la presencia de un homólogo de RON2.

Resultados: El gen *ron2* de *B. bovis* tiene una sintenia similar con el gen ortólogo en el genoma de *B. bigemina*. El gen *ron2* fue completamente secuenciado de diferentes cepas de *B. bovis* mostrando >99% de similitud a nivel de nucleótidos y de aminoácidos entre todas las secuencias obtenidas, incluyendo el característico dominio CLAG para cito-adherencia en la secuencia de aminoácidos, como se describe en otros apicomplexas. El análisis de transcripción *in silico* mostró niveles similares de transcripción entre cepas atenuadas y virulentas de *B. bovis*, la expresión de RON2 fue confirmada por western blot en la cepa virulenta T3Bo de *B. bovis*. Cuatro péptidos conservados, conteniendo epítomos B predichos en regiones hidrofílicas de la proteína, fueron diseñados y sintetizados químicamente. La respuesta inmune humoral generada por los péptidos sintéticos fue caracterizada en bovinos, mostrando que los anticuerpos anti-RON2 contra los péptidos reconocieron merozoitos intraeritrocíticos de *B. bovis*. Solo los péptidos P2 y P3 generaron anticuerpos parcialmente neutralizantes que tuvieron un efecto inhibitorio del 28.10% y 21.42%, respectivamente, sobre el proceso de invasión de *B. bovis* a los eritrocitos de bovinos. Consistentemente, este efecto es aditivo al incrementarse la inhibición al 42.09% cuando los anticuerpos fueron evaluados juntos. Finalmente, los péptidos P2 y P3 también fueron reconocidos por el 83.33% y 87.77%, respectivamente, de sueros de animales naturalmente infectados provenientes de áreas endémicas.

Conclusiones: Los datos proponen a RON2 como un nuevo antígeno candidato vacunal de *B. bovis* que contiene epítomos B conservados que promueven la generación de anticuerpos parcialmente neutralizantes.

Palabras clave: Babesiosis bovina, *Babesia bovis*, Unión estrecha, Proceso de invasión, Dominio CLAG.

3.2. Antecedentes

El protozoario intraeritrocitario *Babesia bovis* es el principal agente causal de la babesiosis bovina, que es una de las más importantes enfermedades veterinarias transmitidas por artrópodos. *B. bovis* proviene del filo apicomplexa, que incluye a *Plasmodium* spp y ha *Toxoplasma gondii*, dos ejemplos de patógenos dentro de este filo con importancia médica. Los parásitos de este filo se caracterizan por orgánulos apicales como roptrias, micronemas y cuerpos esféricos. Las proteínas relacionadas a estos orgánulos están implicadas en la invasión y egresión de la célula blanco del hospedero (Bock et al., 2004; Schnittger et al., 2012; Yabsley y Shock, 2013). Importantemente, la mayoría de los parásitos apicomplexas comparten cuatro pasos básicos en el proceso de invasión: (i) anclaje a la célula blanco del hospedero; (ii) reorientación del parásito para colocar los orgánulos apicales en estrecho contacto con la superficie de la membrana de la célula blanco; (iii) invaginación de la superficie de la membrana de la célula blanco, involucrando diversas interacciones moleculares entre ligandos del protozoario y receptores del hospedero para formar uniones estrechas; y (iv) la internalización del parásito, un proceso que ocurre continuamente en la sangre de bovinos infectados con *Babesia*. Así, los merozoitos de *B. bovis* invaden eritrocitos, mientras secretan proteínas desde los orgánulos apicales y forman uniones estrechas entre la membrana del parásito y la membrana del eritrocito. Una vez dentro del eritrocito, los parásitos se multiplican por fisión binaria en dos merozoitos, que, después de egresar del eritrocito original, invaden otros eritrocitos para perpetuar este ciclo de replicación asexual (Dubremetz et al., 1998; Soldati et al., 2001; Yokoyama et al., 2006). En *Plasmodium falciparum*, la “unión estrecha” también se conoce como la “unión en movimiento”, y fue descrita como la interacción específica e irreversible entre dos

proteínas: el antígeno apical 1 de la membrana (AMA-1) localizado en la superficie del merozoíto y la proteína 2 del cuello de las roptrias (RON2), que se integra a la membrana del eritrocito después de su secreción desde las roptrias en un complejo formado con otras proteínas RON (Alexander et al., 2005; Besteiro et al., 2011; Shen y Sibley, 2012). La disrupción de la interacción entre AMA-1 y RON2 cesa la invasión del merozoíto, haciendo de estas proteínas candidatos vacunales (Srinivasan et al., 2013). La expresión de la proteína AMA-1 sensible a la neutralización ya está reportada en *B. bovis*; sin embargo, no existen reportes previos describiendo la conservación y funcionalidad de RON2 en este parásito a pesar de haber sido recientemente descrita en *B. divergens* y *B. microti* (Ord et al., 2016). Por lo tanto, el propósito del presente estudio fue identificar un gen homólogo de RON2 en *B. bovis* y definir su patrón de expresión y relevancia funcional.

3.3. Resultados

3.3.1. El genoma de *Babesia bovis* codifica para un gen ortólogo de *ron2*

En la búsqueda tipo BLAST contra el genoma de referencia de *B. bovis* T2Bo usando las secuencias de nucleótidos (KU696964.1) y de aminoácidos (AQU42588.1) como query, se identificó un gen ortólogo (BBOV_I001630) en el cromosoma 1 contig_1104837696198 (NW_001820854.1). El gen *ron2* identificado no contiene intrones y tiene una sintenia muy parecida entre los genomas de *B. bovis* y *B. bigemina* (Figura 1a). La secuencia de nucleótidos tiene una identidad del 70% y la de aminoácidos de 64%. Empleando ocho diferentes pares de iniciadores (ver Tabla 1), que fueron diseñados sobre la secuencia de referencia BBOV_I001630, fue posible obtener la secuencia completa de *ron2* en cuatro aislados de *B. bovis*: Chiapas, Colima, Nayarit y Veracruz. La secuencia de cada aislado fue reportada al GenBank con las siguientes claves de acceso: MG944401, MG944402, MG944403 y MG944404 respectivamente. Todas las secuencias de nucleótidos de *ron2* obtenidas (T2Bo, Chiapas, Colima, Nayarit y Veracruz) tienen una identidad mínima de 99.56% entre ellas; todas las secuencias de aminoácidos de RON2 tienen una identidad mínima de 99.78% y las mismas características

físico-químicas: Una longitud de 1,365 aa, un péptido señal localizado dentro de los primeros 19 aa, un dominio CLAG para citoadherencia entre los aa 176 y 1168, tres dominios transmembranales, un punto isoeléctrico (pI) de 8.9 y un peso molecular (PM) de 150 kDa (Figura 1b y Tablas 2, 3 y 4). Cuando RON2 se comparó con otras especies de *Babesia*, RON2 mostró una identidad del 64% con *B. bigemina* (98% de cobertura); 81% con *Babesia* spp Xinjiang (73% de cobertura), 60% con *B. divergens* (99% de cobertura), 39% con *B. microti* cepa RI (74% de cobertura), 42% con la proteína hipotética BEWA 034640 de *Theileria equi* (89% de cobertura) y finalmente un 26% con el Apicomplexa *P. falciparum* (74% de cobertura).

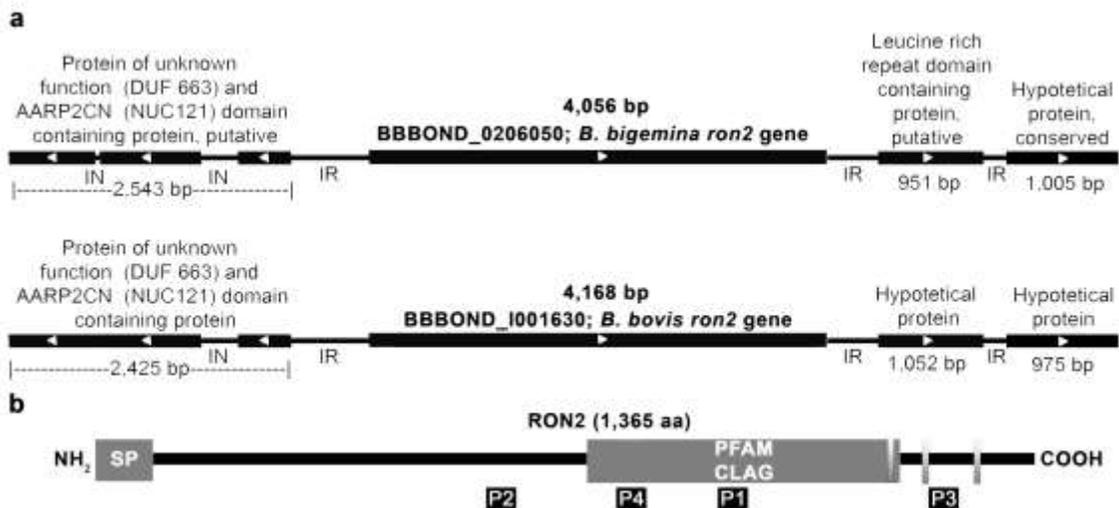


Figura 1. Identificación de *ron2* en *Babesia bovis*.

a se muestra un mapa de sintenia comparativa del gen *ron2* en los genomas de *B. bigemina* y *B. bovis*. **b** se muestra una representación de la proteína RON2 de *B. bovis*, en el que se muestran representados en cajas grises el péptido señal (SP) que se localiza en los primeros 19 aa y el dominio CLAG que se localiza entre los aa 727 al 1168. Las tres cajas sombreadas representan regiones transmembranales y las cajas negras representan las regiones seleccionadas como péptidos.

Tabla 1. Iniciadores diseñados de *ron2* de *Babesia bovis*

Iniciadores	Secuencia: 5' - 3'
Fw0 RON2Bo	5'- CAC CTC ACC GAT ATG CGT AC -3'
RvI0 RON2Bo	5'- GAG TCA CTG ACA CCT TGC C -3'
FwI0 RON2Bo	5'- GTC AGT GAC TCC CCT CTT CAA G -3'
Rv0 RON2Bo	5'- GGA ATC ACC GCC TAG TAG C -3'
Fw1 RON2Bo	5'- GCT ACT AGG CGG TGA TTC C -3'
RvI1 RON2Bo	5'- GCG TCA ATA GAG ATA AGC AGG -3'
FwI1 RON2Bo	5'- CCT GCT TAT CTC TAT TGA CGC -3'
Rv1 RON2Bo	5'- CAA CCC ATT GCT TGA TTC CC -3'
Fw2 RON2Bo	5'- GGG AAT CAA GCA ATG GGT TG -3'
RvI2 RON2Bo	5'- CTT TCT TAG CAA TAG CGT CGG -3'
FwI2 RON2Bo	5'- CTT CGT TGC TGG AGG CTA CAT C -3'
Rv2 RON2Bo	5'- CGT TGG ATA TTC GGT TGA GC -3'
Fw3 RON2Bo	5'- GCT CAA CCG AAT ATC CAA CG -3'
Rv3 RON2Bo	5'- CCG TAC TTG ATT GCT CTG AG -3'
Fw4 RON2Bo	5'- CTC AGA GCA ATC AAG TAC GG -3'
Rv4 RON2Bo	5'- CAC GGA TGG CTA TGA CAA TG -3'

Nota: Ocho pares de iniciadores fueron diseñados para obtener la amplificación y secuenciación de 4169 pb bajo el mismo protocolo de PCR.

Tabla 2. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de nucleótidos

Cepa	Veracruz	T2Bo	Chiapas	Nayarit	Colima
Veracruz	100.00	99.59	99.59	99.59	99.56
T2Bo	99.59	100.00	100.00	100.00	99.98
Chiapas	99.59	100.00	100.00	100.00	99.98
Nayarit	99.59	100.00	100.00	100.00	99.98
Colima	99.56	99.98	99.98	99.98	100.00

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos

Cepa	Veracruz	T2Bo	Chiapas	Nayarit	Colima
Veracruz	100.00	99.85	99.85	99.85	99.78
T2Bo	99.85	100.00	100.00	100.00	99.93
Chiapas	99.85	100.00	100.00	100.00	99.93
Nayarit	99.85	100.00	100.00	100.00	99.93
Colima	99.78	99.93	99.93	99.93	100.00

Tabla 4. Características físico-químicas de RON2

<i>Babesia</i>	Longitud aa	Péptido Señal	Dominio Pfam	P. I. ^a	P. M. kDa ^b
<i>bovis</i> cepa Veracruz	1,365	MFAVTLAVITLVIHNGVYA 1 to 19	CLAG 726 to 1168	8.9	150
<i>bovis</i> cepa T2Bo	1,365	MFAVTLAVITLVIHNGVYA 1 to 19	CLAG 727 to 1168	8.86	150
<i>bovis</i> cepa Chiapas	1,365	MFAVTLAVITLVIHNGVYA 1 to 19	CLAG 727 to 1168	8.86	150
<i>bovis</i> cepa Nayarit	1,365	MFAVTLAVITLVIHNGVYA 1 to 19	CLAG 727 to 1168	8.86	150
<i>bovis</i> cepa Colima	1,365	MFAVTLAVITLVIHNGVYA 1 to 19	CLAG 727 to 1168	8.93	150
<i>bigemina</i> cepa Chiapas	1,351	MTRSMRGCVRLIAAAIYLAIHCDVYA 1 to 26	CLAG 718 to 1162	9.11	149

^a Punto Isoeléctrico, calculado a partir de la secuencia de la proteína madura.

^b Peso Molecular, calculado a partir de la secuencia de la proteína madura.

3.3.2. El gen *ron2* se transcribe en cepas virulentas y atenuadas de *Babesia bovis*

El perfil de transcripción *in silico* se elaboró a partir de datos de microarreglos disponibles en la base de datos del portal PiroplasmaDB, mostrando que los genes *ron2* (BBOV_I001630) y *ama-1* (BBOV_IV011230) de *B. bovis* tienen niveles de transcripción equiparables en cepas atenuadas y virulentas. Curiosamente, a pesar de que estos resultados no sugieren que estos genes tienen un rol en la virulencia de las cepas, los niveles de expresión de *ron2* son similares a los de *ama-1* en ambas cepas (Figura 2a). Para validar los resultados obtenidos en este análisis, se incluyó el gen *sbp-tc9* (Spherical Body Protein truncated copy 9), mostrando una regulación positiva en la cepa atenuada, confirmando el resultado reportado previamente para este gen (Pedroni et al., 2013).

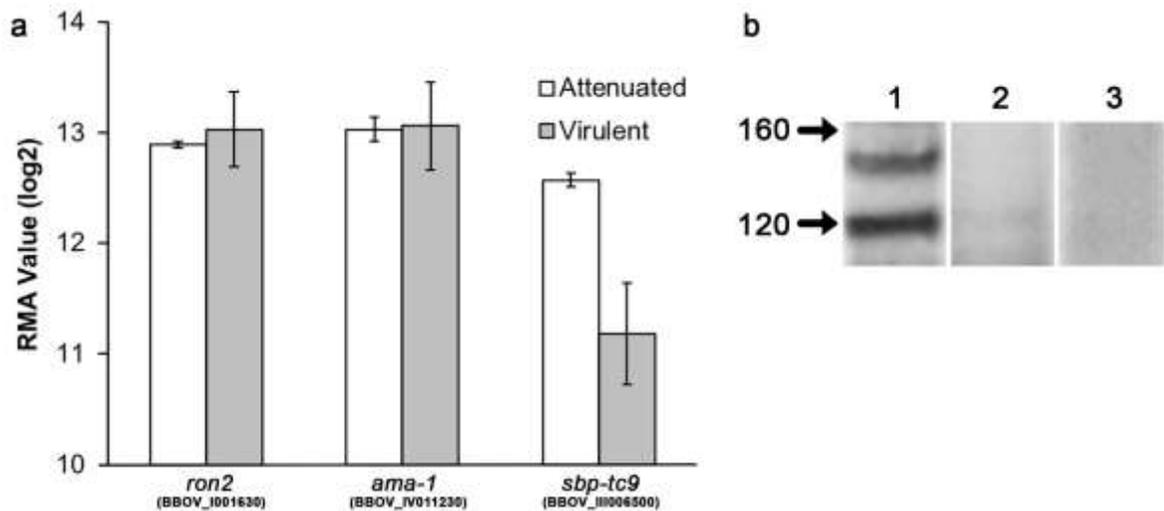


Figura 2. Análisis de transcripción y expresión de *ron2*.

a Análisis bioinformático de transcripción. En el eje de las Y se muestran los valores de los promedios normalizados (log base 2) de los datos del Multi-arreglo Robusto (RMA). La comparación de los niveles de expresión de los genes *ron2*, *ama-1* y *sbp-tc9* (Spherical Body Protein 2 truncated copy 9) entre cepas atenuadas (barras blancas) y virulentas (barras grises) se muestra en el eje de las X. **b** Análisis de expresión de RON2 por Western Blot (WB). Carril 1: Proteínas de eritrocitos infectados (iRBC) con *B. bovis* incubados con suero post-inmunización anti-RON2; Carril 2: Proteínas de eritrocitos infectados (iRBC) con *B. bovis* incubados con sueros pre-inmunización anti-RON2; Carril 3: Proteínas de eritrocitos no infectados (nRBC) incubados con suero post-inmunización anti-RON2. El marcador de peso molecular se muestra en kDa.

3.3.3. RON2 es expresado en *Babesia bovis* y contiene péptidos inmunogénicos

Para identificar regiones conservadas, antigénicas e inmunogénicas en la secuencia de RON2, se empleó una estrategia bioinformática. Se diseñó un total de cuatro péptidos que contienen epítomos B predichos (Figura 1b y Tabla 5). Los cuatro péptidos fueron capaces de generar una respuesta inmune, confirmando la predicción *in silico* de antigenicidad e inmunogenicidad. Los anticuerpos de bovino anti-RON2 reaccionaron en el western blot (WB) con antígenos entre 120 y 160 kDa, los cuales solo se observaron en los lisados de iRBC (Figura 2b, Carril 1). Sin embargo, estos antígenos no fueron reconocidos con el suero pre-inmunización (Figura 2b, Carril 2), no se detectó ninguna reacción con los lisados de nRBC en el WB por los anticuerpos anti-RON2 (Figura 2b, Carril 3). El PM estimado de RON2 de *B. bovis* es de ~150 kDa, el cual es consistente con el peso del antígeno reconocido por los anticuerpos anti-RON2. Adicionalmente, los anticuerpos anti-RON2 reconocieron un antígeno de 120 kDa presente en los lisados de iRBC (Figura 2b, Carril 1). Estos resultados mostraron que los anticuerpos de bovino anti-péptidos fueron capaces de reconocer a la proteína nativa RON2 de *B. bovis* en el WB confirmando la antigenicidad de los epítomos B predichos incluidos en los péptidos sintéticos.

Tabla 5. Péptidos diseñados en regiones conservadas con epítomos B lineales predichos

ID	Secuencia NH2 - - COOH	Longitud (aa)	Localización (aa)
P1	EIVKDSRDNLEQHLDETIFFGRVVNPPEYNNKWKR	35	901 to 935
P2	NLDTEQRTTWMQMISDPKRYTSILEYAIKFDNKMFT	36	553 to 588
P3	HAADVGVGPAESCFIMVKPPALHCVLKPVETL	32	1,206 to 1,237
P4	GGLAQEFRREKAKHTL	16	747 to 762

3.3.4. Reconocimiento de parásitos intraeritrocíticos de *Babesia bovis* por sueros anti-RON2

Después analizamos el patrón de reacción de los anticuerpos de bovino contra los péptidos seleccionados de RON2 con parásitos intraeritrocíticos por IFI. Todos los sueros post-inmunización evaluados mostraron patrones fluorescentes bastante similares, este patrón consiste en puntos fuertemente marcados y definidos (Figura 3a, c). Este patrón observado es comparable a la señal observada cuando las laminillas de eritrocitos infectados con *B. bovis* fueron incubadas con suero de un animal naturalmente infectado, empleado como control positivo (Figura 3e). Esta señal no fue observada cuando se incubaron las laminillas con el suero pre-inmunización o con el suero del bovino inmunizado únicamente con adyuvante (Figura 3b, d, f). Adicionalmente, se corroboró por microscopía confocal, que la señal observada correspondiera a los merozoítos intraeritrocíticos (Figura 4).

3.3.5. Ensayo de Neutralización *in vitro*

Después evaluamos la capacidad de los anticuerpos anti-RON2 de bloquear la invasión de los merozoítos en un ensayo de neutralización *in vitro*. Los resultados, mostrados en Figura 5, demuestran una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de parasitemia entre los cultivos suplementados con suero post-inmunización y los cultivos suplementados con suero pre-inmunización solo para los péptidos P2 y P3 (P2: $t_{(4)}= 19.81$, $P < 0.0001$; P3: $t_{(4)}= 33.64$, $P < 0.0008$). Aunado a esto, al evaluar la combinación de los anticuerpos anti-P2 y anti-P3 en este ensayo, resultó en un incremento significativo ($t_{(4)}= -10.6$, $P < 0.0004$) de la inhibición (42.09%).

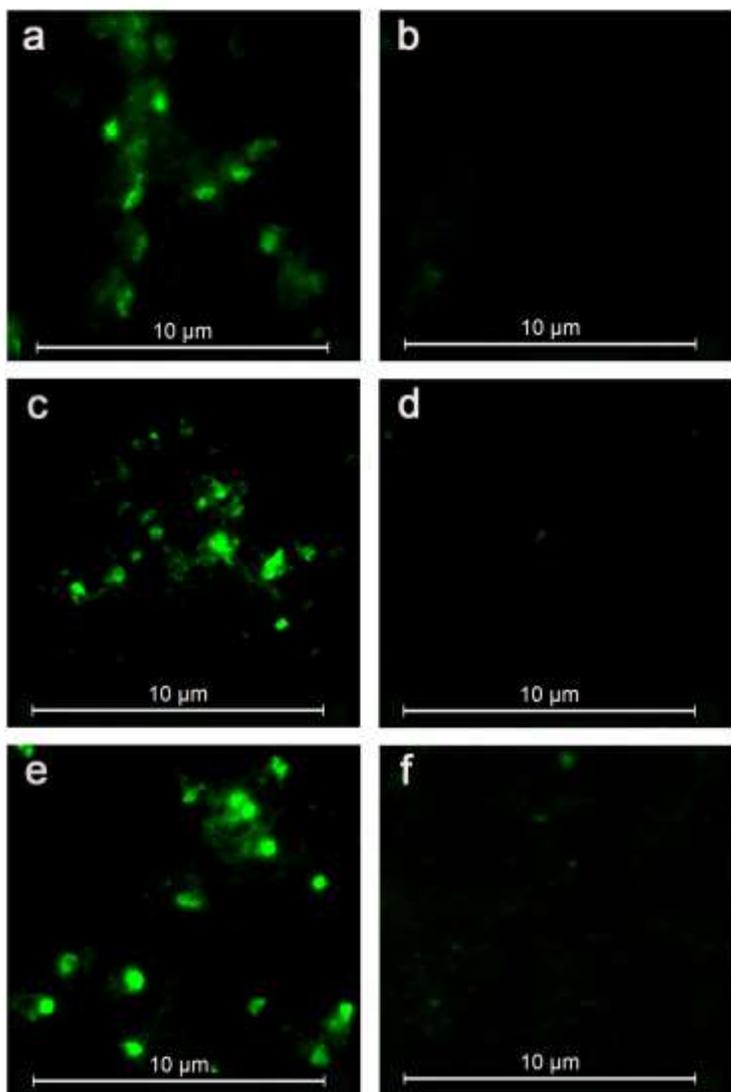


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de parásitos intraeritrocíticos de *Babesia bovis* con anticuerpos anti-RON2.

Laminillas preparadas con eritrocitos infectados con *B. bovis* fueron incubados con anticuerpos anti-P2 (a), anti-P3 (c), o suero de un bovino naturalmente infectado (e). No se observó ninguna señal cuando las laminillas fueron incubadas con los sueros pre-inmunización de los bovinos inmunizados con el P2 (b), con el P3 (d) o con suero post-inmunización del bovino inmunizado únicamente con adyuvante (f) usado como control negativo. En verde se observa la señal emitida por Alexa Fluor-488 acoplado a Proteína G. Barra de escala: 10 µm.

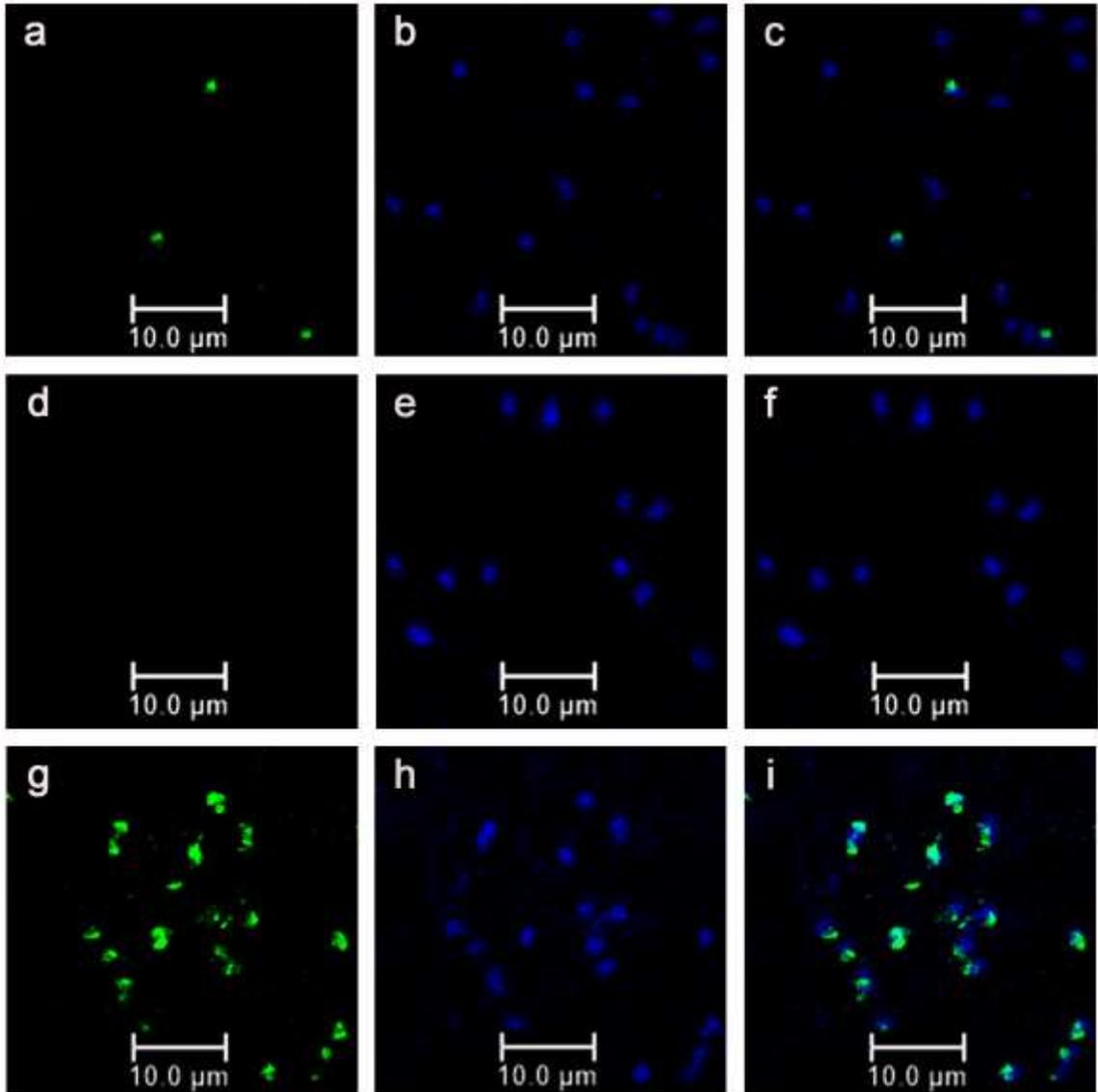


Figura 4. Microscopía confocal.

Merozoítos intraeritrocíticos fueron incubados con: Antisero de bovino anti-RON2 (**a** al **c**), suero de bovino pre-inmunización (**d** al **f**), o suero de un bovino naturalmente infectado con *B. bovis* como control positivo (**g** al **i**). En verde se observa la señal emitida por Alexa Fluor-488 acoplado a Proteína G y en azul se observa la señal emitida por DAPI para la tinción de DNA. Las laminillas fueron analizadas por microscopía confocal usando los siguientes canales: Canal individual para Alexa Fluor-488 (**a**, **d** y **g**), canal individual para DAPI (**b**, **e** y **h**) o los canales fusionados para Alexa Fluor-488 y DAPI (**c**, **f** e **i**). Barra de escala: 10 μm .

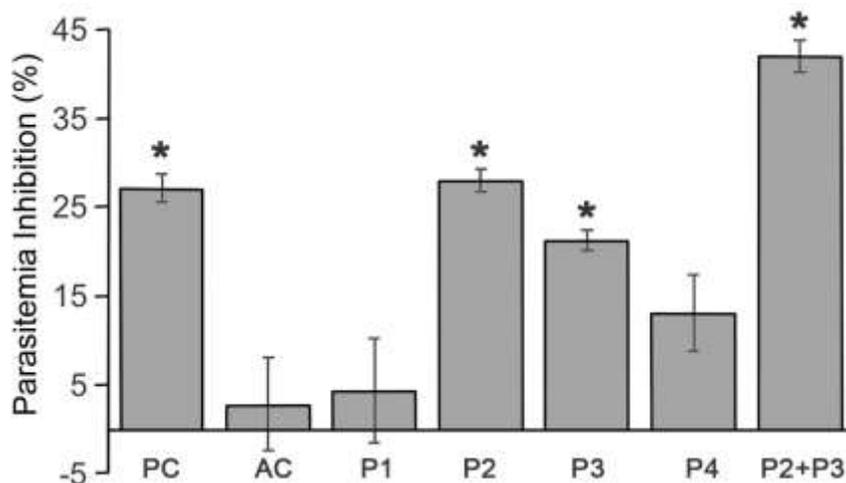


Figura 5. Ensayo de Neutralización *in vitro*.

En el eje de las Y se muestra el porcentaje de inhibición de la parasitemia. La evaluación de la inhibición generada por diferentes anticuerpos se muestra en el eje de las X. PC: Control Positivo; AC: Control Adyuvante (PBS + Adyuvante); P1: anticuerpos anti-P1; P2: anticuerpos anti-P2; P3: anticuerpos anti-P3; P4: anticuerpos anti-P4; P2+P3: Mezcla de anticuerpos anti-P2 y anti-P3. * Indica la diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de eritrocitos parasitados incubados con sueros pre-inmunización y los incubados con sueros post-inmunización ($P < 0.05$).

3.3.6. Los péptidos sensibles al efecto neutralizante están implicados en la respuesta inmune natural

Usamos un ELISA indirecta para evaluar si 90 muestras de suero de bovinos naturalmente infectados con *B. bovis* contienen anticuerpos en contra de los epítopos sensibles a neutralización presentes en los péptidos seleccionados de RON2. Como se muestra en la Tabla 6, el péptido P2 fue reconocido por 75 sueros (83.33%), y el péptido 3 fue reconocido por 79 sueros (87.77%). Consecuentemente, ambos péptidos fueron reconocidos por todos los controles positivos y los 11 sueros empleados como control negativo no reconocieron a ninguno de los péptidos evaluados.

Tabla 6. Los péptidos de RON2 son inmunodetectados por sueros de bovinos naturalmente infectados

Estado	Rancho	Péptido 2			Péptido 3		
		Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Jalisco	A	6	1		6	1	
	B	2	0	12	2	0	12
	C	3	0		2	1	
Veracruz	A	20	3		18	5	
	B	10	2	36	11	1	36
	C	1	0		1	0	
Querétaro	A	1	1		2	0	
	B	1	0		1	0	
	C	2	1	12	3	0	12
	D	1	0		1	0	
	E	3	1		4	0	
	F	1	0		1	0	
Guanajuato	A	2	0	2	2	0	2
Chiapas	A	1	0	7	1	0	7
	B	6	0		5	1	
Chihuahua	A	1	2		3	0	
	B	1	0		1	0	
	C	2	1	16	3	0	16
	D	1	0		1	0	
	E	6	2		7	1	
Sinaloa	A	1	0		1	0	
	B	0	1	5	1	0	5
	C	3	0		2	1	
Total positivo/negativo		75	15		79	11	

3.4. Discusión

En este estudio demostramos la conservación del gen unicopia que codifica para RON2 en el genoma de *B. bovis*, que es altamente conservado entre cuatro distintas cepas aisladas en México y la cepa de referencia T2Bo. La sintenia de *ron2* entre *B. bovis* y *B. bigemina*, así como la alta identidad de este gen entre todas las especies comparadas, sugiere la implicación de RON2 en una función conservada, posiblemente esencial, en parásitos del género *Babesia*. Esta función es mantenida en otros parásitos Apicomplexa mediante la presencia del dominio CLAG, de manera que, la implicación de este dominio en la citoadherencia durante el proceso de invasión a los eritrocitos ha sido demostrado previamente en *P. falciparum* (Cao et al., 2009; Holt et al., 1999). Aunado a esto, el análisis de transcripción mostró un nivel de transcripción similar en cepas atenuadas y virulentas, implicando que los niveles de expresión de este gen no son críticos en la modulación de fenotipos virulentos de *B. bovis*, como fue demostrado previamente para el gen *sbp2t-11* (Gallego-Lopez et al., 2018). Además, el nivel de transcripción de *ron2* fue similar al de *ama-1*, un gen involucrado en el mismo paso del proceso de invasión, como se describió en otros parásitos Apicomplexa (Proellocks et al., 2010). En conjunto, los datos que muestran una similitud en el nivel de expresión de estas proteínas entre cepas virulentas y atenuadas pueden respaldar la idea de que el mecanismo de invasión es altamente conservado, ya que es requerido para el mantenimiento del parásito dentro del hospedero. Además, niveles similares de expresión de los genes *ama-1* y *ron2* sugieren una función concertada entre estas dos proteínas en los parásitos de *Babesia*, como ya fue descrito en *Plasmodium*. Dado que AMA-1 también demostró ser sensible a la neutralización (Gaffar et al., 2004), enfatiza el estudio de estas dos proteínas en conjunto en una sola formulación vacunal. Anticuerpos de bovino específicos contra RON2 fueron producidos y usados para la detección de RON2 en extractos proteicos de *B. bovis*, mostrando una banda de aproximadamente 150 kDa en el WB, que correlaciona con el peso esperado de la proteína. Adicionalmente, una banda de menor PM fue observada en el mismo extracto proteico, pero no se observó en los extractos proteicos de los eritrocitos no infectados. Los péptidos usados para generar los anticuerpos anti-RON2 fueron

diseñados analizando el genoma de *B. bovis* con una estrategia bioinformática que asegura que estos péptidos son específicos para RON2, el análisis *in silico* respalda el hecho de que esta banda no es generada por otra proteína del parásito, sugiriendo que la banda de menor PM puede ser generada debido a un proceso de proteólisis. Este evento de proteólisis en RON2 ha sido observado en otras especies de *Babesia* (Ord et al., 2016).

Aunque el diseño de péptidos es un desafío debido a los resultados paradójicamente inconsistentes que se obtienen con las herramientas bioinformáticas (Flower, 2003), en este estudio, diseñamos exitosamente cuatro péptidos inmunogénicos que estimularon la generación de anticuerpos en bovinos inmunizados y que reconocieron a parásitos intraeritrocíticos. Los anticuerpos anti-RON2 también fueron capaces de identificar la proteína nativa en eritrocitos infectados por IFI y microscopía confocal. Esto es de particular relevancia ya que los epítomos B seleccionados y usados para la generación de los anticuerpos fueron predichos sobre la secuencia lineal de RON2, sugiriendo que esta parte de la secuencia es accesible a los anticuerpos en la proteína nativa. Se ha demostrado que RON2 se localiza específicamente en la región del cuello de las roptrias, que posee un repertorio proteico conservado en el filo e involucrado en la formación de la unión estrecha de las membranas (Proellocks et al., 2010). Sin embargo, es necesario realizar estudios de colocalización para determinar la localización subcelular exacta de RON2 en *B. bovis*.

Curiosamente, solo los anticuerpos producidos contra los péptidos P2 y P3 fueron capaces de bloquear el proceso de invasión, como se demuestra en el ensayo de neutralización. Una inhibición mayor fue observada cuando los anticuerpos contra ambos péptidos fueron mezclados, sugiriendo un efecto de sinergia. Este tipo de sinergia puede ser usado para mejorar el efecto inhibitorio, por ejemplo, al usar en la mezcla anticuerpos en contra de otras proteínas, pero esto también demuestra que los anticuerpos pueden actuar de forma independiente en su actividad inhibitoria y no de forma alostérica. En *P. yoelli*, por ejemplo, fue

descrito que la mezcla de anticuerpos en contra de un complejo de AMA-1 y RON2L inhibe por completo el proceso de invasión mediante la interrupción de la interacción específica entre estos dos péptidos, y este complejo generó una respuesta inmune protectora en monos *Aotus* en contra de una cepa virulenta de *P. falciparum* (Srinivasan et al., 2017, 2014). RON2L, es un péptido localizado entre la segunda y tercera región transmembranal predicha de RON2 de *P. falciparum*. Esta localización es la misma para el péptido P3 diseñado en este estudio, remarcando la importancia de este péptido como candidato vacunal bloqueante. Estos datos demuestran que eligiendo como blanco de anticuerpos específicos a epítomos en RON2 se perjudica significativamente la habilidad del parásito para invadir eritrocitos. Importantemente, este efecto es aditivo, sugiriendo que los epítomos reconocidos por anticuerpos reactivos contra dos epítomos B predichos trabajan de manera independiente y son capaces de interactuar con el antígeno. Los datos también sugieren fuertemente un posible papel de RON2 en la invasión a los eritrocitos.

Finalmente, demostramos que RON2 genera anticuerpos en bovinos naturalmente infectados con *B. bovis*. Estos hallazgos indican que los epítomos B predichos y contenidos en los péptidos tienen un papel en la respuesta inmune humoral bajo condiciones naturales de infección y que estos epítomos B están conservados entre cepas de diferentes localizaciones geográficas, que han sido reportadas con una gran variación antigénica (Borgonio et al., 2008; Genis et al., 2008), demostrando que los péptidos de RON2 sensibles a neutralización que fueron seleccionados están implicados en la respuesta inmune de bovinos naturalmente infectados con *B. bovis*. Otra importante implicación que emerge de estos resultados, es que anticuerpos anti-epítomos de RON2 pueden ayudar a animales crónicamente infectados a prevenir la manifestación de signos clínicos al combatir la persistencia del parásito en el hospedero, sugiriendo directamente la implicación de RON2 en el desarrollo de una inmunidad protectora, y soportando el uso de estos antígenos como potenciales candidatos vacunales. Aunque presentamos evidencia de la conservación de RON2 en diferentes aislados

mexicanos de *B. bovis* y demostramos el efecto biológico de anticuerpos anti-RON2 en contra de una cepa americana (T3Bo), y la identidad entre las secuencias de aminoácidos es muy alta (99.78%). El hecho de que 15 sueros para el péptido 2 y 11 sueros para el péptido 3 no reconocieran el péptido respectivo (de un total de 90), sugiere que un grado de variación puede ocurrir entre cepas. Por lo tanto, es necesario evaluar una conservación mundial de RON2 mediante la obtención de secuencias o la evaluación de muestras de suero provenientes de otros países. El hecho de que anticuerpos contra dos péptidos de RON2 no fueran capaces de bloquear completamente el crecimiento *in vitro* del parásito, sugiere que anticuerpos en contra de péptidos de antígenos adicionales son necesarios para el desarrollo de vacunas contra este patógeno.

3.5. Conclusión

En conclusión, *ron2* es un gen funcional en *B. bovis* que codifica para una proteína con un dominio CLAG característico. RON2 tiene epítomos B altamente conservados que promueven la generación de anticuerpos neutralizantes en bovinos y que son reconocidos por anticuerpos protectores en ganado naturalmente infectado. Todo esto en conjunto enfatiza la importancia de RON2 como candidato vacunal para prevenir la babesiosis bovina.

3.6. Metodología

3.6.1. Extracción de DNA de aislados de campo de *Babesia bovis*

Se colectaron manualmente garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en cuatro diferentes estados de México: Chiapas, Colima, Nayarit y Veracruz. Las garrapatas fueron incubadas individualmente para que ovopositaran y después se evaluó si estaban infectadas con *Babesia spp* mediante examinación microscópica de la hemolinfa en busca de kinetos (Riek, 1964). Se extrajo el ADN de las garrapatas infectadas (Mosqueda, 2010) y se usó para el diagnóstico específico de *B. bovis* con una reacción en cadena de la polimerasa variante anidada (Figueroa et al., 1993). Sólo las larvas de las garrapatas infectadas únicamente con *B. bovis* fueron usadas para infectar un bovino esplenectomizado por cada aislado de

campo. Adicionalmente, los bovinos infestados fueron tratados con un acaricida cinco días después de la infestación para evitar la posible transmisión de *B. bigemina* por ninfas infectadas y la parasitemia fue monitoreada diariamente mediante la examinación de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa bajo el protocolo descrito por la OIE (“Terrestrial Manual,” 2017). Cuando la parasitemia excedió el 1%, por punción de la vena yugular se colectó la sangre infectada en bolsas con solución anticoagulante ACD (375 Blorecep, Industrias Plásticas Médicas, Ayala, Morelos, México). De la sangre infectada se extrajo ADN genómico usando el kit Illustra blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) y el ADN fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

3.6.2. Identificación y secuenciación de *ron2* en *Babesia bovis*

Las secuencias de nucleótidos (KU696964.1) y de aminoácidos (AQU42588.1) de *ron2* de *B. bigemina* fueron usados como consulta en una búsqueda tipo BLAST en la base de datos del instituto SANGER en contra del genoma de referencia de *B. bovis* T2Bo. La sintenia de la región cromosomal donde se ubica el gen *ron2* fue determinada y comparada entre *B. bovis* y *B. bigemina* en la base de datos PiroplasmaDB en el portal EuPathDB (Aurrecoechea et al., 2010; Chen et al., 2006). A partir de la secuencia del gen *ron2* de *B. bovis* T2Bo, se diseñaron ocho pares de iniciadores (Tabla 1) usando el programa Oligoanalyzer 3.1 (Owczarzy et al., 2008). Estos iniciadores fueron diseñados para amplificar la secuencia completa de *ron2* usando el mismo protocolo de PCR: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 45 s, seguido por una extensión final a 72 °C por 7 min. El ADN obtenido de los cuatro aislados de campo de *B. bovis*, cada uno de un estado diferente en México (Chiapas, Colima, Nayarit y Veracruz), fueron usados para la amplificación y secuenciación de 4169 pb del gen *ron2* de *B. bovis*. Todas las amplificaciones fueron clonadas en el vector pCRTM4-TOPO[®] usando el kit TOPO[®] TA Cloning[®] (Invitrogen TM, Carlsbad, California, USA), y células la cepa TOP10 de *Escherichia coli* fueron transformadas con el vector siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen TM, Carlsbad, California, USA). Por cada

amplificación, se seleccionaron dos colonias positivas por PCR para ser secuenciadas con el método Sanger por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Cuernavaca, México). El ensamble y la obtención de la secuencia consenso se realizó usando los programas BioEdit 7.2.6 y CLC Genomics Workbench 7.5.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra *B. bigemina* (AQU42588.1), *Babesia sp. Xinjiang* (ORM40446.1), *B. divergens* (ADM34975.2), *B. microti* cepa RI (XP_021338832.1), *Theileria equi* (XP_004830272.1), *P. falciparum* (BAH22613.1). Luego, las secuencias fueron analizadas con herramientas bioinformáticas para: (i) Identificar marcos de lectura abiertos con el programa ORF finder (Rombel et al., 2002); (ii) Determinar el péptido señal con los programas SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011) y SMART (Schultz et al., 1998); (iii) Encontrar los dominios conservados y su localización con el programa SMART (Schultz et al., 1998); (iv) Identificar las regiones transmembranales con el programa TMHMM (Krogh et al., 2001); y (v) Determinar el PI y el PM usando el programa CLC Genomics Workbench 7.5.

3.6.3. Evaluación *in silico* de la transcripción

Los valores de la media robusta de los micro-arreglos (RMA) de los análisis de transcriptómica de muestras pareadas de replicados biológicos (BR) fueron obtenidos de datos previamente publicados y depositados en la base de datos PiroplasmaDB DB en el portal EuPathDB (Aurrecochea et al., 2010). La transcripción del gen *ron2* (BBOV_I001630) se evaluó entre cepas atenuadas y virulentas, también se evaluó el nivel de transcripción del gen *ama-1* (BBOV_IV011230). Estos resultados fueron validados con el análisis del nivel de expresión de *sbp2-tc9* (Spherical Body Protein 2-truncated copy 9, BBOV_III006500). Este análisis se realizó en el portal PiroplasmaDB (Aurrecochea et al., 2010; Pedroni et al., 2013).

3.6.4. Análisis de expresión

Para producir anticuerpos anti-RON2, se identificaron epítomos B lineales conservados entre todos los aislados usando diferentes programas: ABCpred (Saha y Raghava, 2006), BCEpred (Saha y Raghava, 2004) y el programa IEDB-AR (Zhang et al., 2008). Las regiones conservadas fueron localizadas con un alineamiento múltiple de secuencias usando el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). El péptido fue sintetizado en un sistema peptídico multi-antigénico de 8 brazos (MAPS-8) por la empresa GL Biochem (Shanghái, China). El péptido sintético (ver Tabla 5) fue solubilizado en PBS (pH 7.4) y emulsificado volumen a volumen (v/v) con el adyuvante Montanide ISA 71 VG (Seppic, Puteaux, Paris Francia) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Finalmente, dos bovinos nacidos en un área libre de garrapatas y sin anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* por IFI fueron inmunizados cuatro veces con intervalos de 21 días con la emulsión descrita anteriormente. Adicionalmente, dos bovinos control fueron inmunizados bajo las mismas condiciones con el mismo adyuvante emulsificado con PBS (1:1). Las inmunizaciones se realizaron vía subcutánea en la región escapular con 1 ml de la emulsión correspondiente para cada bovino. Muestras de suero fueron colectadas de cada animal antes de la primera inmunización y 15 días después de la última inmunización.

El suero de los bovinos con anticuerpos específicos anti-RON2 y el suero control fueron diluidos a 1:20 en PBS conteniendo lisados de eritrocitos no infectados (nRBC) y 5% de leche descremada para evaluar la expresión de RON2 en un WB. Para ello, eritrocitos infectados con *B. bovis* (iRBC) fueron obtenidos de un cultivo *in vitro* con un 42% de parasitemia, los lisados fueron realizados lavando las células con PBS 1X con inhibidor de proteasas (Roche-Applied Science) frío hasta que el sobrenadante fuera de color claro. Después, el pellet fue congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongelado en hielo y lavado tres veces. Todas las centrifugaciones se realizaron a $2500\times\text{g}$ por 10 min. Después de los lavados, el pellet fue suspendido en un volumen apropiado de buffer de lisis 2X (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2% NP-40) conteniendo inhibidor de proteasas (Roche-Applied Science). El pellet suspendido fue mantenido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Finalmente, cuando el pellet fue descongelado

se mantuvo en hielo; se agregó buffer de carga para proteínas, se sonicó y se centrifugó brevemente. El sobrenadante se usó en un SDS-PAGE (4-20%) a 100 V durante una hora usando geles precast Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 100 V durante una hora. La membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con PBS con 5% de leche descremada (PBS-M). La membrana fue incubada por una hora a temperatura ambiente (TA) con cada suero diluido y fue lavada cinco veces en agitación a temperatura ambiente con PBS con 0.1% de Tween (PBS-T). Posteriormente, la membrana fue incubada bajo las mismas condiciones con un anticuerpo de burro anti-IgG de conejo acoplado a HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluido 1:500 en PBS-T (0.1%), y seguido por un lavado final. Finalmente. La reacción fue observada por quimioluminiscencia empleando el spray LumiFlash Prime (Visual Protein, Taiwan, China).

3.6.5. Generación de anticuerpos anti-RON2

Se diseñaron cuatro péptidos, cada péptido fue emulsificado e inmunizado en dos bovinos usando la metodología descrita anteriormente. Los sueros Pre- y Post-inmunización fueron colectados y analizados para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra los péptidos de RON2 diseñados en una prueba de ELISA como se describió en estudios anteriores (Hernández-Silva et al., 2018). Cada muestra de suero fue agregada a una dilución de 1:3000 en PBS, y se agregaron 100 μ l/pozo del anticuerpo secundario, un anticuerpo de burro anti-IgG de Bovino conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido a 1:500 en PBS. La reacción fue detectada en un lector iMark™ Microplate Absorbance (Bio-Rad Laboratories) a una absorbancia de 450 nm, empleando el software Microplate Manager 6 (Bio-Rad Laboratories). Todas las muestras fueron evaluadas por triplicados, y el punto de corte fue determinado para cada bovino como el promedio de la densidad óptica (OD) del suero Pre-inmunización más tres desviaciones estándar.

3.6.6. Reconocimiento de parásitos por anticuerpos anti-RON2 en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para determinar si los anticuerpos anti-péptido de RON2 reconocen la proteína nativa en el parásito, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue realizada ("Terrestrial Manual," 2017). Laminillas preparadas con sangre de bovino infectada con *B. bovis* (aislado de Chiapas) fueron permeadas a 4 °C durante 15 min con acetona (90%) diluida en etanol. Los anticuerpos de bovino anti-RON2 fueron evaluados a una dilución de 1:100 y detectados con proteína G conjugada con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA). Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C en una cámara húmeda durante 1 h. Entre cada incubación se realizaron tres lavados con PBS-T (0.1% de Tween20); cada lavado se realizó durante 5 min en agitación, el ultimo lavado se realizó con agua destilada ("Terrestrial Manual," 2017). Como control positivo se usó suero de un bovino naturalmente infectado con *B. bovis*, como control negativo se empleó suero post-inmunización del bovino inmunizado con PBS y adyuvante.

3.6.7. Ensayo de Neutralización

Para determinar si el proceso de invasión puede ser bloqueado por los anticuerpos anti-RON2, se realizó un ensayo de neutralización como se describió en estudios previos (Hines et al., 1995; Suarez et al., 2000), usando un cultivo *in vitro* de *B. bovis*. La cepa de *B. bovis* T3Bo (Proporcionada por el laboratorio de la ADRU-USDA de la Universidad del Estado de Washington) fue cultivada en placas de 96 pozos usando un volumen final de 200 μ l por pozo con un volume globular eritrocitario de 5%. Se realizó un paso de incubación en una atmosfera con 5% de CO₂ durante 30 min a 37 °C con una mezcla con 60% de medio HL-1 (pH7.2), 40% de suero y 1% de iRBC con 1% de parasitemia. Posteriormente, se agregó medio con 4% de nRBC y, después de mezclar gentilmente, 200 μ l de la muestra fueron colocados en cada uno de los tres pozos. El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmosfera con 5% de CO₂ durante 72 h con cambios de medio (120 μ l de medio más 130 μ l de suero) cada 24 h. Suero de un bovino no infectado (c1537) nacido en un área libre de garrapatas fue usado como control negativo (NC) y el suero de

un bovino (C168) inoculado con *B. bovis* T2Bo y desafiado con *B. bovis* T3Bo fue usado como control positivo (PC). Como control para evaluar el efecto del adyuvante (AC), se empleó el suero pre- y post-inmunización del bovino inmunizado solo con PBS más adyuvante. Al final de la incubación, el porcentaje de los eritrocitos parasitados (PPE) fue determinado por cartometría de flujo (Wyatt et al., 1991). Para el análisis estadístico, se usó una prueba T-student, donde los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significantes. Los porcentajes de la inhibición de la parasitemia (% pi) para los anticuerpos anti-RON2 y del AC fueron calculados con la siguiente fórmula: $\% \text{ pi} = 100 - [(PPE \text{ Post}) / (PPE \text{ Pre})] * 100$. La fórmula para el PC fue: $\% \text{ pi} = 100 - [(PPE \text{ PC}) / (PPE \text{ NC})] * 100$.

3.6.8. Reconocimiento de RON2 de *Babesia bovis* por sueros de bovino naturalmente infectados

Un total de 112 sueros de bovinos fueron evaluados contra los péptidos P2 y P3 usando el protocolo de ELISA descrito anteriormente: Las 90 muestras de sueros colectadas de bovinos mantenidos en regiones de México, en donde la babesiosis es una enfermedad endémica, fueron determinadas como positivas a *B. bovis* por IFI; 11 muestras de suero previamente confirmadas como positivas a *B. bovis*, fueron empleadas como control positivo. 11 muestras de suero colectadas de bovinos nacidos y mantenidos en un área libre de garrapatas fueron usadas como control negativo. Todas las muestras de suero fueron evaluadas por triplicado a una dilución de 1:50 en PBS y fueron incubadas durante una hora a 37 °C. Como anticuerpo secundario, se empleó un anticuerpo de cabra anti-IgG de bovino (H+L) conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:1500 en PBS. Las placas de ELISA fueron incubadas durante 1 h a 37 °C. El punto de corte se determinó sumando al promedio de los valores de las OD de los controles negativos tres desviaciones estándar.

IV. CAPÍTULO II: Inmunocaracterización de péptidos con epítomos B conservados de las proteínas AMA-1, MSA-2c, RAP-1 y MIC-1 de *Babesia bovis*.

4.1. Metodología

4.1.1. Obtención de secuencias y diseño de péptidos

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las proteínas AMA-1, MSA-2c, RAP-1 y MIC-1 de diferentes cepas de *B. bovis* disponibles en la base de datos del GenBank al momento de la búsqueda. Con las secuencias de aminoácidos obtenidas se generó una base de datos con el cual se evaluó la diversidad geográfica y se realizaron análisis bioinformáticos posteriores para el diseño de péptidos específicos para cada proteína. Los péptidos fueron diseñados en regiones conservadas, antigénicas y que contienen epítomos B lineales bajo la estrategia bioinformática descrita en el Capítulo III, Sección 3.1.4. Se excluyeron las regiones transmembranales predichas con el programa TMHMM (Krogh et al., 2001) y la región del péptido señal que fue determinada con los programas SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011) y SMART (Schultz et al., 1998). Finalmente, los péptidos fueron sintetizados en un sistema peptídico multiantigénico de 8 brazos (MAP-8) por la empresa GL Biochem (Shanghai, China).

4.1.2. Producción de anticuerpos anti-péptido

Cada péptido fue solubilizado en PBS (pH 7.4) a una concentración de 1 mg/ml y fue emulsificado v/v con el adyuvante Montanide ISA 71 VG (Seppic) a una concentración final de 100 μ g/ml. Las inmunizaciones fueron realizadas como se describe en el capítulo anterior y los péptidos insolubles fueron descartados del estudio. Como control para evaluar el efecto del adyuvante, se inmunizaron dos bovinos bajo las mismas condiciones con una emulsión preparada 1:1 con PBS y adyuvante, a los cuales nos referiremos a lo largo de texto como AC.

4.1.3. Determinación de la inmunogenicidad de los péptidos

Con la finalidad de conocer si los péptidos solubles estimulan la producción de anticuerpos en los bovinos inmunizados, se realizó un ELISA indirecta en placas

como se describe en la sección 3.1.5. Los sueros pre y post-inmunización fueron diluidos a 1:500, 1:1000 y 1:2000 en PBS y evaluados por triplicado. El punto de corte se determinó para cada bovino sumando tres desviaciones estándar al promedio de los valores de OD del suero pre-inmunización. Los péptidos no antigénicos fueron descartados del estudio.

4.1.4. Reconocimiento de parásitos por anticuerpos anti-péptido en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La habilidad de los anticuerpos anti-péptido generados de reconocer a parásitos intraeritrocíticos fue evaluado por IFI como se describe en la sección 3.1.6. Como control positivo se usó suero de un bovino naturalmente infectado y como control negativo se usó suero post-inmunización de un bovino inmunizado AC.

4.1.5. Ensayo de Neutralización in vitro

Para determinar si los anticuerpos anti-péptido capaces de reconocer a parásitos intraeritrocíticos pueden bloquear el proceso de invasión, en placas de 96 pozos se realizó un ensayo de neutralización como se describe en la sección 3.1.7. Este ensayo fue interpretado mediante la prueba T de Student, los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Finalmente, los porcentajes de la inhibición de la parasitemia (% pi) para los anticuerpos anti-péptido y del AC fueron calculados con la siguiente fórmula: $\% \text{ pi} = 100 - \left(\frac{[(\text{PPE Post}) / (\text{PPE Pre})]}{100} \right) * 100$. La fórmula para el PC fue: $\% \text{ pi} = 100 - \left(\frac{[(\text{PPE PC}) / (\text{PPE NC})]}{100} \right) * 100$.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1. Diseño de péptidos y evaluación de la inmunogenicidad

En este estudio, herramientas de genómica y bioinformática fueron usadas para diseñar péptidos en regiones conservadas, expuestas e inmunogénicas de las secuencias obtenidas del GenBank. Se obtuvieron 13 secuencias de AMA-1, 26 secuencias de MSA-2c, 12 secuencias de RAP-1 y 10 secuencias de MIC-1 (Tablas 7, 8, 9 y 10). De las secuencias obtenidas, se diseñaron y sintetizaron 19 péptidos en total: cuatro péptidos de AMA-1 y cinco péptidos de MSA-2c, RAP-1 y MIC-1

(Tabla 11 y Figura 6). Exceptuando los péptidos P4AMA, P5MSA, P1MIC y P4MIC que fueron insolubles y descartados del estudio, todos los péptidos sintetizados fueron emulsificados con adyuvante e inmunizados en dos bovinos por cada péptido. Se colectaron las muestras de suero y al evaluarlos por ELISA se obtuvieron títulos de 1:2000 en ambos bovinos inmunizados para casi todos los péptidos, excepto para los péptidos P2AMA1, P2RAP1 y P3RAP1 que tuvieron títulos de 1:500, negativo y de 1:1000 respectivamente en uno de los bovinos inmunizados y de 1:2000 en el otro bovino (Tabla 11). Por lo tanto, en este estudio diseñamos de manera exitosa péptidos inmunogénicos, pese a que se sabe que el diseño de péptidos con herramientas bioinformáticas continua siendo desafiante debido a los resultados inconsistentes que pueden obtenerse de este tipo de análisis que hace contraste con las diferencias en la respuesta inmune entre individuos (Ardia Daniel R. et al., 2010; Flower, 2003).

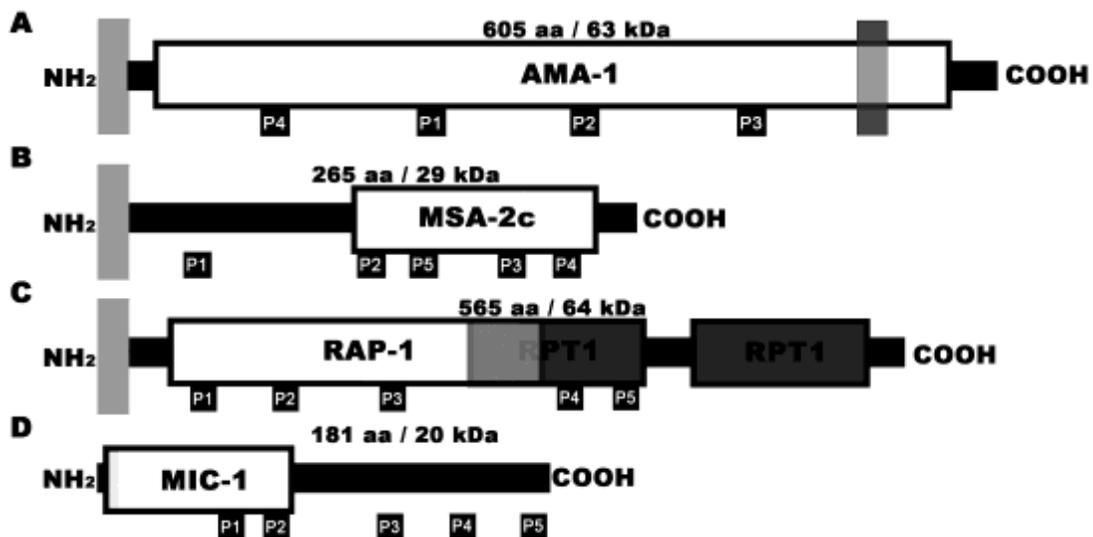


Figura 6. Representación esquemática de las proteínas y localización de los péptidos diseñados.

Panel A: Representación de AMA-1; Panel B: Representación de MSA-2c; Panel C: Representación de RAP-1; Panel D: Representación de MIC-1. La barra gris claro en la región NH₂ indica la presencia de péptido señal, la barra gris oscuro indica una región transmembranal, las cajas blancas representan los dominios funcionales, las cajas de color gris oscuro representan las regiones con repeticiones internas (RPT-1) y las cajas negras debajo de cada esquema representan la localización de los péptidos diseñados. Este esquema fue elaborado con base en las predicciones del programa SMART.

4.2.2. Identificación de parásitos intraeritrocíticos por anticuerpos anti-péptido por IFI

Una vez obtenidos los anticuerpos anti-péptido, con el objetivo de conocer si estos pueden reconocer merozoítos de *B. bovis* en sangre, evaluamos todos los sueros positivos en la prueba de ELISA por IFI. Los anticuerpos anti-AMA-1, anti-MSA-2c, anti-RAP-1, y anti-MIC-1 de los sueros post-inmunización mostraron patrones similares de fluorescencia entre los anticuerpos anti-péptido de cada proteína (Figura 7, Paneles A, C, E y G). Este patrón fluorescencia consistió en puntos fuertemente marcados similares a la fluorescencia observada cuando los parásitos fueron expuestos a anticuerpos de un bovino naturalmente infectado como control positivo (Figura 7, Panel I), excepto para la señal observada por los anticuerpos anti-MIC-1 (Figura 7, Panel G) que consistió en puntos definidos de menor tamaño en comparación al control positivo. No se observó ninguna señal cuando los parásitos fueron incubados con los sueros pre-inmunización, ni con el suero post-inmunización del bovino AC (Figura 7, Paneles B, D, F, H y J). Estos resultados prueban la interacción entre las proteínas nativas en el parásito con los anticuerpos anti-péptido producidos en bovinos y confirman la presencia de los epítomos B lineales en regiones de las proteínas accesibles a los anticuerpos. Debido a la estrategia de análisis *in silico* empleada, que muestra que cada péptido diseñado es específico para cada proteína correspondiente en *B. bovis*, consideramos que no es necesario realizar un estudio de colocalización o WB. Sin embargo, es necesario saber si los anticuerpos generados tienen la capacidad de bloquear el proceso de invasión, lo cual fue evaluado con un ensayo de neutralización.

Tabla 7. Secuencias de AMA-1 obtenidas del GenBank

Proteína	Origen	Cepa	No. de Acceso	Secuencias
AMA1	E. U.	T2Bo	XP_001611043.1	1
	México	Tecomán		1
		Sur	ACM44021.1	
		Sureste	ACM44020.1	
	Brasil	Norte	ACM44019.1	5
		Noreste	ACM44018.1	
		Medio Oeste	ACM44017.1	
	Israel	C61411	AAS58045.1	1
		Polonnaruwa P32	BAN78782.1	
		Ampara AT9	BAN78784.1	
	Sri Lanka	Jaffna J6	BAN78787.1	6
		Ampara AK29	BAN78786.1	
		Ampara AM13	BAN78785.1	
Polonnaruwa P58		BAN78783.1		
TOTAL				13

Tabla 8. Secuencias de MSA-2c obtenidas del GenBank

Proteína	Origen	Cepa	No. de Acceso	Secuencias
MSA-2c	México	México	ABR28466.1	12
		Pullman	ACK57417.1	
		RAD	ACK57419.1	
		Veracruz	ACK57420.1	
		Chiapas 2	ABR28468.1	
		Chiapas 1	ABR28467.1	
		Tamaulipas 2	ABR28471.1	
		Nayarit	ABR28475.1	
		Quintana Roo	ABR28469.1	
		Veracruz 2	ABR28473.1	
		Jalisco	ABR28476.1	
		Guerrero	ABR28477.1	
	Brasil	Brasileña/CO	ADN85312.1	3
		Brasileña/SE	ADN85315.1	
		Brasileña/Sul	ADN85316.1	
	Israel	MN	AHW82950.1	2
		HB	AHW82953.1	
	Sri Lanka	AM24	BAN78747.1	2
		P75	BAN78738.1	
	Filipinas	P235	BAO04540.1	2
		P393	BAO04547.1	
	Argentina	M3P	ACK57414.1	2
		R1A	AAL15428.1	
	Turquía	4107	ACX71853.1	2
		Aydin	ADI58373.1	
	TOTAL			

Tabla 9. Secuencias de RAP-1 obtenidas del GenBank

Proteína	Origen	Cepa	No. de Acceso	Secuencias
RAP1	E. U.	T2B	AAB84264.1	2
		T2Bo	XP_001610908.1	
	Argentina	S2P	AAB84263.1	3
		R1A	AAB84272.1	
	México	S2P	AAB84266.1	1
		Mo7	AAA62695.1	
	Medio oeste		ACM44002.1	5
		Campo Grande	AAB84268.1	
	Brasil	Sureste	ACM44005.1	5
		Noreste	ACM44003.1	
	CG-P		AAB84267.1	1
		Uruguay	Ur	
TOTAL				12

Tabla 10. Secuencias de MIC-1 obtenidas del GenBank

Proteína	Origen	Cepa	No. de Acceso	Secuencias	
MIC-1	E. U.	T2Bo	ACU52706.1	1	
		Chiapas Colima			
	México	Mo7	ACU52705.1	5	
		Nayarit Veracruz			
	Argentina	R1A	ACU52704.1	1	
		Santarem 1	ACU52703.1		
	Portugal	Santarem 2	ACU52701.1	3	
		Setubal	ACU52702.1		
	TOTAL				10

Tabla 11. Péptidos diseñados y resultados de la prueba de ELISA

Proteína	Péptido diseñado	Secuencia del péptido	aa	Solubilidad	ELISA B1 / B2
AMA-1	P1AMA	TKYRYPFVFDSDNQMCYILYSAIQYNQG	28	Soluble	- / -
	P2AMA	QEYANSTEDCAAILFDNSATDL	22	Soluble	+* / +
	P3AMA	TAIGSPLEYDAVNYPCHIDTNGYVEPRAK	30	Soluble	+ / +
	P4AMA	YESVGSKSYRMPVGKCPVVGKIID	24	Insoluble	Descartado
MSA-2c	P1MSA	VPTKQVNGS	9	Soluble	- / -
	P2MSA	HDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDT	24	Soluble	+ / +
	P3MSA	FINPSST	7	Soluble	+ / +
	P4MSA	GENTAAQPPQPAE	13	Soluble	+ / +
	P5MSA	EELLKLLIEAIYGMEIIIIEKT	21	Insoluble	Descartado
RAP-1	P1RAP	QIVNDVCSNAPEDSNCREVV	20	Soluble	+ / +
	P2RAP	NVKYPLYQEYQPLSLPNPYQL	21	Soluble	- / +
	P3RAP	VVHEEGTTDVEYLV	14	Soluble	+** / +
	P4RAP	VTQPTKKFIEDTNEVTKNYLK	21	Soluble	+ / +
	P5RAP	TKKFMQDTHEKTKGYLKENVAEP	23	Soluble	+ / +
MIC-1	P1MIC	YNIFQHDYTSNDGGCINNCGQIIPC VG	27	Insoluble	Descartado
	P2MIC	VVQKEYIHEIKAATLNSLIRKN	22	Soluble	+ / +
	P3MIC	SGEYGCYRDDEVSYDIYS	18	Soluble	+ / +
	P4MIC	CGINVPCMGYKNGLNP	16	Insoluble	Descartado
	P5MIC	VDWDRYNRNCGKCLKFLHLH	19	Soluble	+ / +

B1 = Bovino 1
 B2 = Bovino 2
 - = Negativo
 + = 1:2000
 +* = 1:500
 +** = 1:1000

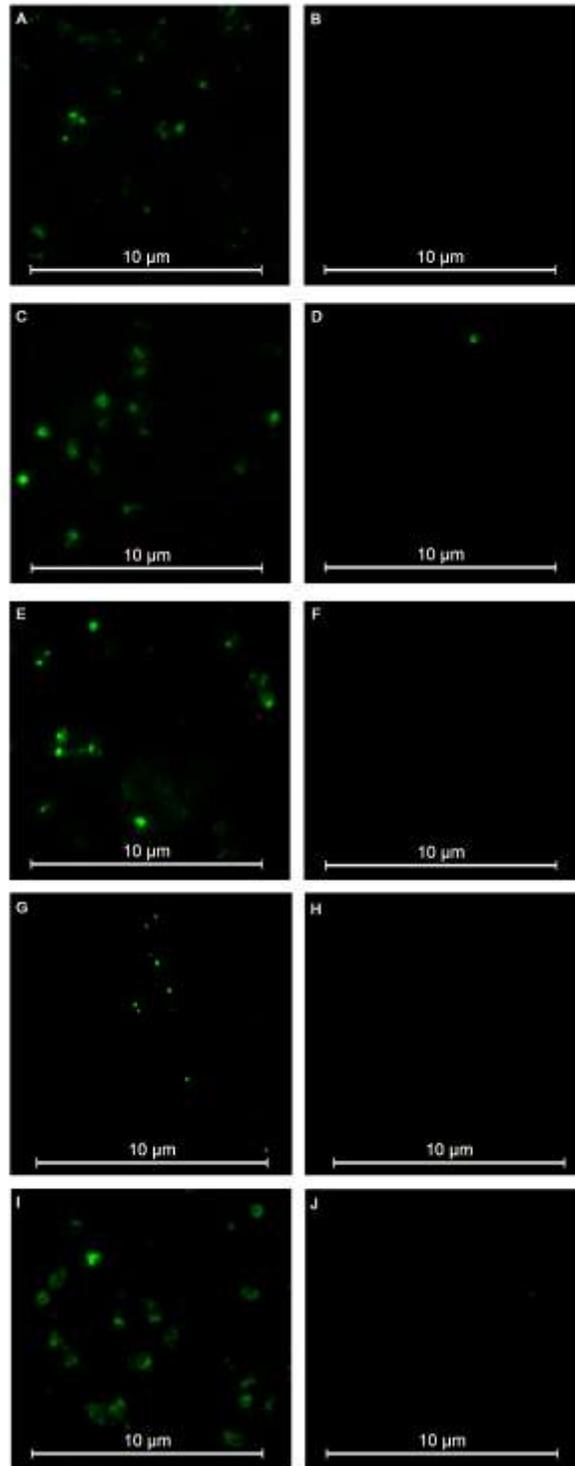


Figura 7. Evaluación de los anti-sueros por IFI

Laminillas preparadas con eritrocitos infectados con *B. bovis* fueron incubados con los siguientes sueros: Panel A = AMA-1 POST; Panel B = AMA-1 PRE; Panel C = MSA-2c POS; Panel D = MSA-2c PRE; Panel E = RAP-1 POS; Panel F = RAP-1 PRE; Panel G = MIC-1 POST; Panel H = MIC-1 PRE; Panel I = Bovino naturalmente infectado; Panel J = PBS + Adyuvante POST como control negativo. La barra de escala representa 10 µm.

4.2.3. Ensayo de neutralización *in vitro*

Finalmente, se evaluó el efecto biológico de los anticuerpos generados en un ensayo de neutralización *in vitro*. Aunque todos los anticuerpos anti-péptido generados fueron capaces de reconocer a los parásitos intraeritrocíticos por IFI, en este ensayo de neutralización (Figura 8), solo algunos mostraron diferencia estadística significativa entre los porcentajes de parasitemia de los cultivos suplementados con los sueros post-inmunización y los suplementados con los sueros pre-inmunización ($p < 0.05$), obteniendo los siguientes porcentajes de inhibición de la parasitemia (% pi) = TC: 27.23%, AC: 2.98%, aP2-AMA: 6.28%, aP3-MSA: 10.27%, aP4-MSA: 10.42%, aP1-RAP: 32.45%, aP4-RAP: 36.98%, aP2MIC: 8.91%, aP3MIC: 3.87%. Es preciso destacar que los anticuerpos anti-péptido producidos en este estudio fueron generados en bovinos e incubados con eritrocitos infectados. Aunque los anticuerpos en contra de los péptidos de AMA-1 mostraron porcentajes de inhibición bajos en comparación a los reportados por Gaffar, es probable que esta diferencia se deba a que en ese estudio se incubaron merozoítos libres con una mezcla de sueros de conejo producidos contra tres péptidos, obteniendo un porcentaje de inhibición del 65% (Gaffar et al., 2004). Ese porcentaje podría deberse a un efecto aditivo como el descrito en el capítulo anterior y a una interacción facilitada entre los anticuerpos y AMA-1 que es una proteína integral de la membrana (Narum y Thomas, 1994; Remarque et al., 2008). Por otra parte, el péptido P2AMA diseñado en este estudio se encuentra 100% conservado entre diferentes cepas de *B. bovis* y se encuentra localizado entre los aa 327 a 348 dentro de la región central de AMA-1, la cual ha sido reportada previamente como inhibitoria (Salama et al., 2013). Anticuerpos generados en ratones contra MSA-2c mostraron una inhibición >30% (Gimenez et al., 2016; Mosqueda et al., 2002a), el cual es un porcentaje mayor al que nosotros obtuvimos en este estudio, sin embargo, esta proteína no es 100% conservada entre todas las cepas de *B. bovis* y no todas las regiones de esta proteína son inmunogénicas, como se determinó para el péptido P1MSA. Los péptidos P1RAP Y P4RAP generaron anticuerpos con la capacidad inhibitoria más alta obtenida en este estudio, incluso más que la generada por el bovino control que cuenta con anticuerpos generados con cepas

virulentas de *B. bovis*. En otros estudios se ha reportado el efecto inhibitorio de RAP-1 sobre merozoítos y esporozoítos (Mosqueda et al., 2002b) y que la región amino-terminal genera la estimulación de una respuesta inmune de memoria con un perfil Th1 (Norimine et al., 2003, 2002). Mejía, determinó que los péptidos P2AMA, P3MSA y P3RAP generaron una respuesta inmune de memoria con un perfil Th1, aunque el péptido P4RAP no estimuló una respuesta inmune de memoria, estimuló una respuesta inmune con un perfil Th1 (Mejía-López, 2017). Finalmente, los porcentajes de inhibición obtenidos al evaluar el efecto individual de anticuerpos contra los péptidos de MIC-1 en este estudio son menores a los reportados por Silva al analizar el efecto de una mezcla de sueros producidos en conejos en contra de dos péptidos de esta proteína incubados con merozoítos libres (Silva et al., 2010).

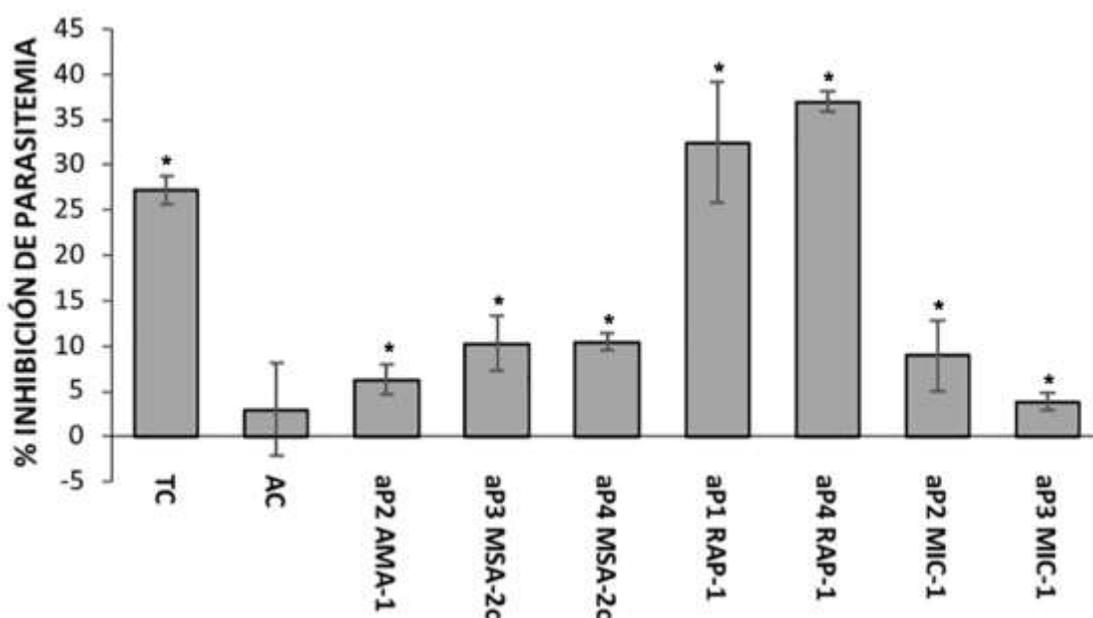


Figura 8 Evaluación del efecto biológico de anticuerpos anti-péptidos.

En el eje de las Y se muestra el porcentaje de inhibición de la parasitemia. La evaluación de la inhibición generada por diferentes anticuerpos se muestra en el eje de las X. TC: Control Positivo de la prueba; AC: Control Adyuvante (PBS + Adyuvante); aP2AMA-1: anticuerpo anti-P2AMA; aP3MSA-2c: anticuerpo anti-P3MSA; aP4MSA-2c: anticuerpo anti-P4MSA; aP1RAP-1: anticuerpo anti-P1RAP; aP4RAP-1: anticuerpo anti-P4RAP; aP2MIC-1: anticuerpo anti-P2MIC; aP3MIC-1: anticuerpo anti-P3MIC. * Indica la diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de eritrocitos parasitados incubados con sueros pre-inmunización y los incubados con sueros post-inmunización ($P < 0.05$).

Estudios anteriores han determinado que la inmunización de bovinos con un solo antígeno no es suficiente para conferir una inmunidad protectora en contra de la babesiosis bovina, aun cuando esta respuesta posea un perfil Th1 (Hines et al., 1995; Norimine et al., 2003). Aunque en este estudio se identificaron las regiones específicas de cada proteína que confieren una respuesta inmune neutralizante, es necesario evaluar los anticuerpos generados en una mezcla para determinar si se incrementa el efecto biológico de estos, también debe de considerarse el análisis de estas regiones en conjunto como un antígeno multi-epitópico o quimérico como potencial candidato vacunal en contra de la babesiosis bovina.

4.2.4. Conclusión

La caracterización inmunológica de los péptidos diseñados de las proteínas AMA-1, MSA-2c, RAP-1 y MIC-1, permitió la identificación de péptidos específicos de cada proteína, con epítomos B conservados entre diferentes cepas de *B. bovis* y que estimulan una respuesta inmune con efecto neutralizante en bovinos. Al mismo tiempo, los resultados obtenidos indican que diferentes regiones de una misma proteína estimulan diferentes tipos de respuesta inmune, de las cuales solo algunas correlacionan con protección. Por lo anterior, este tipo de estudios permiten la identificación de epítomos B conservados, específicos y sensibles al efecto neutralizante de los anticuerpos.

V. CONCLUSIÓN GENERAL

Las proteínas AMA-1, MSA-2c, RAP-1, RON2 y MIC-1 de *B. bovis*, poseen epítomos B conservados entre diferentes cepas con distribución mundial que son sensibles al efecto neutralizante de los anticuerpos de bovinos.

LITERATURA CITADA

Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>

Ardia Daniel R., Parmentier Henk K., Vogel Laura A., 2010. The role of constraints ylimitation in driving individual variation in immune response. *Funct. Ecol.* 25, 61–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01759.x>

Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* 13, 797–805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>

Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129 Suppl, S247–269.

Borgonio, V., Mosqueda, J., Genis, A.D., Falcon, A., Alvarez, J.A., Camacho, M., Figueroa, J.V., 2008. *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 145–148. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.035>

Brown, W.C., 2001. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 101, 233–248.

Brown, W.C., McElwain, T.F., Ruef, B.J., Suarez, C.E., Shkap, V., Chitko-McKown, C.G., Tuo, W., Rice-Ficht, A.C., Palmer, G.H., 1996. *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect. Immun.* 64, 3341–3350.

Caetano, B.C., Bruña-Romero, O., Fux, B., Mendes, E.A., Penido, M.L.O., Gazzinelli, R.T., 2006. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum. Gene Ther.* 17, 415–426. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.415>

Calvo-Olvera, D.A., 2015. Identificación y caracterización inmunomolecular del gen ron2 de *Babesia bigemina*. Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro, México.

Cao, J., Kaneko, O., Thongkuiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., Torii, M., 2009. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites. Parasitol. Int. 58, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.09.005>

Carcy, B., Précigout, E., Schetters, T., Gorenflot, A., 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. Vet. Parasitol. 138, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.038>

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. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>

Dalrymple, B.P., Peters, J.M., Goodger, B.V., Bushell, G.R., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G., 1993. Cloning and characterisation of cDNA clones encoding two *Babesia bovis* proteins with homologous amino- and carboxy-terminal domains. Mol. Biochem. Parasitol. 59, 181–189.

Dautu, G., Munyaka, B., Carmen, G., Zhang, G., Omata, Y., Xuenan, X., Igarashi, M., 2007. Toxoplasma gondii: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 yBAG1 and evaluation of their immunogenic potential. Exp. Parasitol. 116, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.017>

de Waal, D.T., Combrink, M.P., 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. Vet. Parasitol., Babesiosis1st International Forum on Babesiosis 138, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.042>

Dubremetz, J.F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. Int. J. Parasitol. 28, 1007–1013.

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.

Flower, D.R., 2003. Towards *in silico* prediction of immunogenic epitopes. Trends Immunol. 24, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.006>

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.

Gallego-Lopez, G.M., Lau, A.O.T., Brown, W.C., Johnson, W.C., Ueti, M.W., Suarez, C.E., 2018. Spherical Body Protein 2 truncated copy 11 as a specific *Babesia bovis* attenuation marker. Parasit. Vectors 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2782-z>

García, T.D., Figueroa, M.J.V., Ramos, A.J.A., Rojas, M.C., Cantó, A.G.J., Falcón, N.A., Alvarez, M.J.A., 2004. Immune response to *Babesia bigemina* infection in pregnant cows. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1026, 298–301. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.055>

Genis, A.D., Mosqueda, J.J., Borgonio, V.M., Falcón, A., Alvarez, A., Camacho, M., de Lourdes Muñoz, M., Figueroa, J.V., 2008. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using msa and ssrRNA gene sequences. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 121–125. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.070>

Gimenez, A.M., Françoso, K.S., Ersching, J., Icimoto, M.Y., Oliveira, V., Rodriguez, A.E., Schnittger, L., Florin-Christensen, M., Rodrigues, M.M., Soares, I.S., 2016. A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN- γ producing cells. Parasit. Vectors 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1862-1>

Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Elsasser, T.H., Davis, W.C., Valdez, R.A., 2002. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gamma- and TNF-alpha-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. Vet. Immunol. Immunopathol. 84, 237–251.

Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W., Valdez, R.A., 2001. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA

expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 23, 463–471.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00402.x>

Goff, W.L., Storset, A.K., Johnson, W.C., Brown, W.C., 2006. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol.* 28, 221–228.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00830.x>

Gohil, S., Kats, L.M., Seemann, T., Fernandez, K.M., Siddiqui, G., Cooke, B.M., 2013. Bioinformatic prediction of the exportome of *Babesia bovis* and identification of novel proteins in parasite-infected red blood cells. *Int. J. Parasitol.* 43, 409–416.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.01.002>

Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Precigout, E., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology* 134, 187–196.
<https://doi.org/10.1017/S0031182006001399>

Hernández-Silva, D.J., Valdez-Espinoza, U.M., Mercado-Uriostegui, M.A., Aguilar-Tipacamú, G., Ramos-Aragón, J.A., Hernández-Ortiz, R., Ueti, M., Mosqueda, J., 2018. Immunomolecular Characterization of MIC-1, a Novel Antigen in *Babesia bigemina*, Which Contains Conserved and Immunodominant B-cell epitopes that Induce Neutralizing Antibodies. *Vet. Sci.* 5, 32.
<https://doi.org/10.3390/vetsci5020032>

Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., McElwain, T.F., 1995. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect. Immun.* 63, 349–352.

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

Holder, A.A., Freeman, R.R., 1981. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature* 294, 361–364.

Holt, D.C., Gardiner, D.L., Thomas, E.A., Mayo, M., Bourke, P.F., Sutherland, C.J., Carter, R., Myers, G., Kemp, D.J., Trenholme, K.R., 1999. The cytoadherence

linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence? *Int. J. Parasitol.* 29, 939–944.

Lau, A.O.T., Cereceres, K., Palmer, G.H., Fretwell, D.L., Pedroni, M.J., Mosqueda, J., McElwain, T.F., 2010. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. *Mol. Biochem. Parasitol.* 172, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.017>

Madder, M., Thys, E., Achi, L., Touré, A., Deken, R.D., 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 53, 139–145. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9390-8>

Mejía-López, A.S., 2017. Evaluación in vitro de la respuesta inmune celular de bovinos inducida por péptidos de *Babesia bovis*. Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Querétaro, México.

Mosqueda, J., Hernández-Silva, D.J., Hidalgo-Ruiz, M., 2018. Genome-Based Vaccinology Applied to Bovine Babesiosis. *Farm Anim. Dis. Recent Omic Trends New Strateg. Treat.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.72636>

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

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

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

Narum, D.L., Thomas, A.W., 1994. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 59–68.

Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Mbassa, G., Brown, W.C., 2003. Stimulation of T-helper cell gamma interferon and

immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect. Immun.* 71, 5021–5032.

Norimine, J., Suarez, C.E., McElwain, T.F., Florin-Christensen, M., Brown, W.C., 2002. Immunodominant Epitopes in *Babesia bovis* Rhoptry-Associated Protein 1 That Elicit Memory CD4⁺-T-Lymphocyte Responses in *B. bovis*-Immune Individuals Are Located in the Amino-Terminal Domain. *Infect. Immun.* 70, 2039–2048. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2039-2048.2002>

Ord, R.L., Rodriguez, M., Cursino-Santos, J.R., Hong, H., Singh, M., Gray, J., Lobo, C.A., 2016. Identification and Characterization of the Rhoptry Neck Protein 2 in *Babesia divergens* and *B. microti*. *Infect. Immun.* 84, 1574–1584. <https://doi.org/10.1128/IAI.00107-16>

Pedroni, M.J., Sondgeroth, K.S., Gallego-Lopez, G.M., Echaide, I., Lau, A.O., 2013. Comparative transcriptome analysis of geographically distinct virulent and attenuated *Babesia bovis* strains reveals similar gene expression changes through attenuation. *BMC Genomics* 14, 763. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-763>

Plassmeyer, M.L., Reiter, K., Shimp, R.L., Kotova, S., Smith, P.D., Hurt, D.E., House, B., Zou, X., Zhang, Y., Hickman, M., Uchime, O., Herrera, R., Nguyen, V., Glen, J., Lebowitz, J., Jin, A.J., Miller, L.H., MacDonald, N.J., Wu, Y., Narum, D.L., 2009. Structure of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. *J. Biol. Chem.* 284, 26951–26963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013706>

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

Proellocks, N.I., Coppel, R.L., Waller, K.L., 2010. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. *Trends Parasitol.* 26, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.02.012>

Reece, W.H.H., Pinder, M., Gothard, P.K., Milligan, P., Bojang, K., Doherty, T., Plebanski, M., Akinwunmi, P., Everaere, S., Watkins, K.R., Voss, G., Tornieporth,

N., Allouche, A., Greenwood, B.M., Kester, K.E., McAdam, K.P.W.J., Cohen, J., Hill, A.V.S., 2004. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat. Med.* 10, 406–410. <https://doi.org/10.1038/nm1009>

Remarque, E.J., Faber, B.W., Kocken, C.H.M., Thomas, A.W., 2008. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol.* 24, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002>

Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Flores, D.A., Echaide, I., Suarez, C.E., Schnittger, L., 2014. The glycosylphosphatidylinositol-anchored protein repertoire of *Babesia bovis* and its significance for erythrocyte invasion. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.12.011>

Salama, A.A., Terkawi, M.A., Kawai, S., AbouLaila, M., Nayel, M., Mousa, A., Zaghawa, A., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2013. Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp. Parasitol.* 135, 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.017>

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

Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. *Babesia*: a world emerging. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 12, 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>

Shen, B., Sibley, L.D., 2012. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.02.007>

Shoda, L.K.M., Palmer, G.H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D.L., Brown, W.C., 2000. *Babesia bovis*-Stimulated Macrophages Express Interleukin-1 β , Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide and Inhibit Parasite Replication In Vitro. *Infect. Immun.* 68, 5139–5145.

Silva, M.G., Ueti, M.W., Norimine, J., Florin-Christensen, M., Bastos, R.G., Goff, W.L., Brown, W.C., Oliva, A., Suarez, C.E., 2010. *Babesia bovis* expresses a

neutralization-sensitive antigen that contains a microneme adhesive repeat (MAR) domain. *Parasitol. Int.* 59, 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.004>

Silvie, O., Franetich, J.-F., Charrin, S., Mueller, M.S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C.H., Thomas, A.W., Van Gemert, G.-J., Sauerwein, R.W., Blackman, M.J., Anders, R.F., Pluschke, G., Mazier, D., 2004. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Biol. Chem.* 279, 9490–9496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200>

Soldati, D., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1293–1302.

Srinivasan, P., Baldeviano, G.C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J.A., Leiva, K.P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., Orr-Gonzalez, S., Zhu, D., Villasante, E., Soisson, L., Narum, D.L., Pierce, S.K., Long, C.A., Diggs, C., Duffy, P.E., Lescano, A.G., Miller, L.H., 2017. A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *NPJ Vaccines* 2. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0015-7>

Srinivasan, P., Ekanem, E., Diouf, A., Tonkin, M.L., Miura, K., Boulanger, M.J., Long, C.A., Narum, D.L., Miller, L.H., 2014. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10311–10316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409928111>

Srinivasan, P., Yasgar, A., Luci, D.K., Beatty, W.L., Hu, X., Andersen, J., Narum, D.L., Moch, J.K., Sun, H., Haynes, J.D., Maloney, D.J., Jadhav, A., Simeonov, A., Miller, L.H., 2013. Disrupting malaria parasite AMA1-RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion. *Nat. Commun.* 4, 2261. <https://doi.org/10.1038/ncomms3261>

Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., Bradley, P.J., 2009. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell. Microbiol.* 11, 590–603. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01276.x>

Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis*

merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infect. Immun.* 68, 6865–6870.

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

Suarez, C.E., McElwain, T.F., Stephens, E.B., Mishra, V.S., Palmer, G.H., 1991a. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 329–332.

Suarez, C.E., Noh, S., 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet. Parasitol.*, Special Issue: Towards good management practises in parasite control Plenary lectures and a selection of Keynote Lectures presented at the 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, 21-25 August 2011 180, 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>

Suarez, C.E., Palmer, G.H., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Hötzel, I., McElwain, T.F., 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 127, 101–112.

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

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

Terrestrial Manual: OIE - World Organisation for Animal Health (<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>), 2017.

Wilkowsky, S.E., Farber, M., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Zamorano, P.I., Dominguez, M., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., 2003. *Babesia bovis*

merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 127, 133–141.

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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>

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