

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Generación de una proteína quimérica con actividad
inmunogénica contra *Babesia bigemina*”**

Tesis

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

Presenta:

M.C. Diego Josimar Hernández Silva

Dirigida por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Minerva Camacho Nuez
Secretaria

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torrez
Suplente

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre 2019
México

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos apicomplexos del género *Babesia*. El ciclo de vida de *Babesia* consta de una fase asexual, la cual se lleva dentro del hospedante y una fase de reproducción sexual, la cual ocurre en el intestino medio de la garrapata.

En México la babesiosis es causada por *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos dos agentes generan pérdidas económicas en el sector ganadero debido a la disminución de la producción de leche y carne, abortos, así como por la muerte del ganado, , aunado a la inversión monetaria que involucra el control del vector, las medidas profilácticas, así como la erradicación del parásito..

Actualmente las vacunas están elaboradas de parásitos vivos atenuados, a pesar de ser altamente efectivas, poseen numerosas desventajas, como corta vida de anaquel, condiciones especializadas de almacenaje y transporte y el potencial riesgo de infección por reversión de la virulencia. En la actualidad varias proteínas de *Babesia* sp. han sido probadas como candidatos vacunales y a pesar de ser inmunogénicas, no han sido capaces de producir una respuesta inmune protectora.

El objetivo del presente proyecto fue generar una proteína quimérica a partir de péptidos antigénicos conservados en diferentes cepas de *Babesia bigemina* que tenga capacidad inmunogénica en bovinos y que induzca el bloqueo de la invasión.

Diversos análisis bioinformáticos fueron llevados a cabo con la finalidad de generar una secuencia de aminoácidos la cual contiene 21 péptidos inmunogénicos de cinco proteínas de *B. bigemina*. Se diseñó un gen quimérico el cual fue clonado en un vector de expresión. El producto del gen quimérico es una proteína de aproximadamente 50 kDa, la cual fue reconocida por 21 diferentes anticuerpos anti-péptidos individuales, con lo cual se confirma que la proteína quimérica designada como ChPV1.9 expresa cada uno de los epítomos incluidos en el diseño *in silico*. Finalmente se produjeron anticuerpos anti-ChPV1.9, estos anticuerpos son capaces de reconocer las proteínas nativas no solo de *Babesia bigemina*, sino también de *Babesia bovis* por medio de Inmunofluorescencia indirecta.

Dedicatorias

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Agradecimientos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice

RESUMEN.....	2
DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
CAPÍTULO I	10
I.I Características generales de <i>Babesia bigemina</i>	10
I.II Descripción del complejo apical.	11
I.III Ciclo de vida	12
I.III.I Proceso de invasión del <i>Babesia bigemina</i> al eritrocito hospedante	13
I.III.II Reproducción sexual de <i>Babesia</i> sp.	15
I.IV Respuesta inmunitaria contra la Babesiosis	16
I.V Epidemiología e impacto económico de la babesiosis bovina	18
I.VI Vacunas y posibles candidatos vacunales contra <i>Babesia bigemina</i>	19
CAPÍTULO II	24
II.I Justificación	24
III.I Hipótesis	25
II.III Objetivos.....	26
CAPÍTULO III	27
III. MATERIAL Y MÉTODOS	27
III.I. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:.....	27
ETAPA 1:.....	27
Ensayos de neutralización de las proteínas que participan en la invasión de <i>B. bigemina</i> al eritrocito bovino.	28
Evaluación de la inhibición de fusión de fases sexuales.	29
ETAPA 2.....	32
Ensamble del gen quimérico	32
Clonación del gen quimérico	33
Ensayo piloto de la expresión de la proteína quimérica.....	37
Purificación de la proteína quimérica.	38
ETAPA 3.....	39
Identificación de los péptidos en la proteína quimérica por medio de inmunoelectrotransferencia.	39
ETAPA 4.....	41
Obtención de anticuerpos de bovino anti-proteína quimérica.....	41
ETAPA 5.....	42
Evaluación de los anticuerpos anti-proteína quimérica para reconocer los antígenos nativos de <i>B. bigemina</i>	42
CAPÍTULO IV	44
RESULTADOS.....	44
Etapas 1:	44

<i>Ensayos de neutralización de la invasión de B. bigemina al eritrocito bovino de la fusión de fases sexuales</i>	44
<i>Etapa 2:</i>	48
<i>Ensamblaje del gen quimérico</i>	48
<i>Clonación del gen quimérico chpv1.9</i>	49
<i>Etapa 3:</i>	57
<i>Identificación de los péptidos de B. bigemina en la proteína quimérica</i>	57
<i>Etapa 4:</i>	58
<i>Determinación del título de anticuerpos de bovinos anti-CHPV1.9</i>	58
<i>Etapa 5</i>	61
<i>Los anticuerpos anti-CHPV1.9 son capaces de reconocer los antígenos en las células de B. bigemina</i>	61
CAPÍTULO V	65
DISCUSIÓN	65
CAPÍTULO VI	70
CONCLUSIONES	70
CAPÍTULO VII	71
MATERIAL PUBLICADO Y PRODUCTOS OBTENIDOS.	71
CAPÍTULO VIII	73
FINANCIAMIENTO	73
CAPÍTULO IX	74
REFERENCIAS	74
APÉNDICES	84
APÉNDICE I. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS	84
<i>Manejo, almacenamiento y disposición final de residuos peligrosos biológicos infecciosos</i>	84
<i>Obtención de muestras biológicas e inmunización de bovinos</i>	84
APÉNDICE II. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL GEN CHPV1.9.	86

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama del proceso de evaluación de la neutralización de la invasión de <i>B. bigemina</i> al eritrocito.....	29
Figura 2. Diagrama del proceso de evaluación de la inhibición de la fusión de las fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	32
Figura 3. Diagrama del proceso de clonación del gen quimérico.....	36
Figura 4. Diagrama del ensayo piloto para la expresión de la proteína quimérica.....	38
Figura 5. Diagrama del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína quimérica.....	39
Figura 6. Diagrama del proceso para la identificación de los péptidos en la proteína quimérica.....	40
Figura 7. Diagrama del proceso para identificación de las proteínas nativas de <i>B. bigemina</i> por medio de inmunofluorescencia indirecta.....	43
Figura 8. Comparación del porcentaje de parasitemia entre cultivos adicionados con suero de conejo antes y después de la inmunización con péptidos de proteínas de <i>B. bigemina</i> . Los datos se analizaron haciendo comparaciones de medias entre los sueros pre-inmunización y post-inmunización, los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa.....	45
Figura 10. Inhibición de formación de cigotos usando anticuerpos anti-HAP2.....	46
Figura 11. Porcentajes de inhibición de los ensayos de neutralización de la invasión al eritrocito bovino y de la fusión de gametos.....	47
Figura 12. Esquematzación de la proteína quimérica CHPV1.9.....	48
Figura 13. Amplificación del gen quimérico <i>chpv1.9</i>	49
Figura 14. Análisis de colonias transformantes con pENTR/D-TOPO por medio de PCR.....	50
Figura 15. Análisis de restricción para confirmar la presencia del gen <i>chpv1.9</i> en el plásmido pENTR/D-TOPO.....	51
Figura 16. Análisis por medio de PCR de colonia de las clonas obtenidas de la transformación con el plásmido pDEST-17.....	52
Figura 17. Análisis de restricción del producto de la recombinación LR, de plásmido pDEST-17.....	53
Figura 18. Prueba piloto de expresión de la proteína quimérica.....	55
Figura 19. Resultados de expresión de CHPV1.9 a diferentes concentraciones de L-Arabinosa.....	56
Figura 20. Resultados de la purificación de la proteína CHPV1.9 por medio de cromatografía de afinidad.....	57
Figura 21. Inmunoelectrotransferencia de la proteína CHPV1.9 con sueros anti-péptidos de <i>B. bigemina</i>	58
Figura 22. Diagnóstico de anticuerpos anti- <i>Babesia bigemina</i> por medio de inmunofluorescencia indirecta.....	59
Figura 23. Gráfica de los títulos de anticuerpos de bovinos anti-CHPV1.9.....	60

Figura 24. Inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-CHPV1.9 con células infectadas de <i>B. bigemina</i>	62
Figura 25. Inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-CHPV1.9 con células infectadas de <i>B. bovis</i>	63

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de cuadros

Cuadro 1. Reacción de clonación en pENTER/D-TOPO según fabricante.	34
Cuadro 2. Reacción de recombinación del vector pENTR/D-TOPO y pDEST-17de acuerdo a las indicaciones del fabricante.....	35

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I.1 Características generales de *Babesia bigemina*

El género *Babesia* fue descrito por primera vez en 1888 por Víctor Babes ¹. *Babesia bigemina* (al igual que *B. bovis*) en México y en otros países, es el causante de la enfermedad conocida como piroplasmosis, babesiosis bovina, fiebre de la garrapata, fiebre del ganado, fiebre del ganado de Texas o fiebre de agua roja ².

El género *Babesia* pertenece al filo Apicomplexa. Los organismos de este filo poseen tres características morfológicas y fisiológicas propiamente únicas; morfológicamente poseen un conjunto de estructuras denominadas como complejo apical, el cual es la herramienta principal de penetración y escape de la célula hospedera ³. En cuanto a sus características fisiológicas, el parasitismo intracelular es necesario en al menos una fase de su reproducción asexual. Finalmente, poseen un ciclo de vida con tres fases características, una de multiplicación asexual, otra fase en la cual se forman gametos, con la formación resultante de un cigoto y una tercera fase esporogónica de la cual, a partir del cigoto, se forman esporozoítos. Los esporozoítos son las formas infectantes, las cuales son capaces de pasar al siguiente hospedante ⁴.

Desde que el género *Babesia* fue descrito por primera vez a la fecha se identificado y clasificado varias especies que infectan al ganado bovino y otras numerosas especies que afectan a otros animales domésticos como el perro, animales de vida silvestre como el venado y al humano, e incluso existen reportes de especies con potencial zoonótico ⁵.

Aunque dentro de la subclase piroplasmida existen otros hemoparásitos, el género *Babesia* se definió por reproducirse únicamente en los eritrocitos de su hospedante (a diferencia de *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* spp., por ejemplo), además de la transmisión transovárica ⁶. Adicionalmente, también el género *Babesia* se encuentra dentro de la clase Aconoidasida, nombrada así por la carencia del conoide, un organelo que se ha demostrado que sirve para la motilidad en *T. gondii* ⁷.

Sin duda una de las características que definen a lo apicomplexos, así como las peculiaridades únicas del ciclo de vida, es el complejo apical. Este complejo es un conjunto de organelos especializados que tienen como objetivo el almacenaje y secreción de proteínas que son necesarias para la invasión del parásito a la célula hospedante ⁸.

A continuación, se presenta una descripción de los organelos que conforman el complejo apical con la finalidad de describir la importancia de los mismos y su papel

en el ciclo de vida de *Babesia* spp., así como su participación en el proceso de invasión al eritrocito bovino

I.II Descripción del complejo apical.

Gracias a los avances microscópicos, ha sido posible llevar a cabo la descripción detallada de cada una de las características morfológicas del complejo apical el cual es indistinguible con el uso del microscopio óptico. Se sabe hoy en día que el complejo apical está formado de una serie de elementos del citoesqueleto que le confieren una estructura semirrígida a la célula y es el punto angular de un sistema de secreción de diversas enzimas que le permiten interactuar con la célula hospedera y llevar a cabo la invasión a la misma ^{9,10}. En seguida se describe cada uno de los componentes que caracterizan este organelo único de este filo.

1. **Anillo polar apical:** Todo el complejo apical se encuentra dispuesto alrededor de esta estructura. Está localizado en la parte anteroposterior de la célula y es de naturaleza proteica. Sirve como un centro de organización para el sistema de microtúbulos que se extienden a través de la célula; estos microtúbulos, en algunos apicomplexos, se encuentran dispuestos desde la mitad hasta tres cuartas partes de manera longitudinal en el cuerpo celular ¹¹.
2. **Conoide:** Esta estructura es ausente dentro de la clase *Aconoidasida* a la cual pertenece el género *Babesia*, se menciona brevemente la descripción del mismo con finalidad de denotar la diferencia entre *Babesia* y otros organismos apicomplexos. Localizado en la terminación apical de la célula, este elemento posee una morfología geométrica similar a la de un cono truncado formado por 12 a 18 subunidades helicoidales de Alfa-tubulina y con un diámetro de 380nm aproximadamente ¹². Durante el tiempo que el parásito se encuentra en el espacio extracelular, el conoide permanece inactivo dentro del citoplasma en la terminación apical de la célula; una vez que el proceso de invasión comienza, éste es proyectado hacia el exterior del cuerpo celular, en un proceso conocido como extrusión del conoide. En *Toxoplasma gondii* (otro apicomplejo), se han identificado ionóforos y calmodulinas que participan en el intercambio de iones calcio para la activación del conoide y otros mecanismos involucrados en la invasión celular ¹³⁻¹⁵.
3. **Roptrias:** Son estructuras secretoras en forma de clava o basto localizadas hacia la porción apical de la célula y las cuales están íntimamente relacionadas con la formación del complejo de unión a membrana y el proceso de formación de la vacuola parasitófora ¹⁶. Se distinguen dos principales porciones de este organelo, una porción basal bulbosa y un ducto estrecho apical o cuello. Cambian de estructura dramáticamente conforme secretan su contenido ¹⁷. Las roptrias se forman por la acumulación de vesículas provenientes del aparato de

Golgi en las cuales están contenidas proteínas que serán secretadas y las cuales tienen participación directa en el proceso de invasión ^{16–18}.

4. **Micronemas:** Son más pequeñas que las roptrias, varían en número y tamaño entre los diferentes parásitos apicomplexos. Son sacos fusiformes de aproximadamente 120nm de longitud y se encuentran unidos al extremo terminal del ducto de las roptrias ⁸. Al igual que las roptrias, los micronemas poseen una gran cantidad de proteínas con características similares a las de las integrinas, proteínas con dominios transmembranales y proteínas unidas por medio de anclas de GPI (Glicosil Fosfatidil Inositol). Estos dos organelos promueven cuatro eventos importantes entre la célula parásita y la hospedante: 1) la adhesión selectiva a la membrana del hospedante, 2) la remodelación de la membrana del hospedante, 3) la transformación de la membrana del hospedante en la membrana de la vacuola parasitófora y 4) la unión del motor de actina-miosina del parásito para propulsar a la célula invasora dentro de la célula hospedera ³.
5. **Cuerpos esféricos:** conocidos en otros apicomplexos como gránulos densos. Son vesículas unidas a la membrana de aproximadamente 80nm de diámetro ³. Una vez que el merozoíto ha entrado en la célula, los cuerpos esféricos se redistribuyen en la periferia de la célula parasitaria para descargar por exocitosis su contenido dentro de la vacuola parasitófora con el fin de provocar la expansión de la vacuola parasitófora, en *T. gondii* se sabe que las proteínas que se encuentran en los cuerpos esféricos remodelan el citoesqueleto para dar estructura y resistencia a la vacuola parasitófora ¹⁹. Específicamente en *B. bovis* ya se han descrito aproximadamente cuatro proteínas provenientes de estos organelos ^{20–23}, tanto en *B. bovis* como en otras especies de *Babesia* existe evidencia de que las proteínas de los cuerpos esféricos se localizan en la membrana del eritrocito tan pronto como el parásito comienza la internalización en la célula hospedante así como en las fases tardías del desarrollo parasitaria antes de la ruptura de la célula infectada, se ha hipotetizado que las proteínas de los cuerpos esféricos tienen un papel en el desarrollo del parásito ya sea para su crecimiento o reproducción ^{20,22,24}

I.III Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Babesia bigemina* se lleva a cabo en dos hospedantes; por una parte, la garrapata *Rhipicephalus spp.* sirve como vector del parásito y en ésta se lleva a cabo la reproducción sexual. Por otra parte, los bovinos son hospedantes mamíferos, en los cuales se presenta la reproducción asexual ⁴.

Durante el ciclo de vida del parásito se llevan a cabo tres episodios importantes: 1) la gamogonia, que se refiere a la formación y fusión de gametos en el intestino de la garrapata; 2) la esporogonia, en la cual se lleva a cabo la reproducción asexual

en las glándulas salivales y 3) la merogonia, que se refiere a la reproducción asexual en el hospedante vertebrado ²⁵.

Una vez que la garrapata ha comenzado a alimentarse del bovino, es posible detectar células de *Babesia* dentro del vector, aproximadamente 10 horas después, aunque transcurridas 46 horas todavía es posible encontrar formas parasitarias dentro de los eritrocitos ingeridos por la garrapata. En este periodo se detectan células a las cuales se les ha desarrollado el cuerpo ciliar denominadas como cuerpos radiados (Strahlenkörper). Estas células se aglomeran y se fusionan en pares para dar paso a la formación del cigoto. La célula parasitaria penetra en las células epiteliales del intestino de la garrapata. Del intestino de la garrapata se liberan células móviles denominadas quinetos las cuales migran por medio de la hemolinfa a las glándulas salivales ²⁶⁻²⁸. El desarrollo de los esporozoítos comienza por la formación de un esporoblasto multinucleado y poco diferenciado, posteriormente los organelos especializados de la célula (pertenecientes al complejo apical) comienzan a estructurarse y finalmente los esporozoítos maduros son liberados por medio de la separación del resto de células en proceso de formación, es así que las fases metacíclicas del parásito se acumulan dentro de la cavidad oral de la garrapata con lo cual propicia la inoculación del parásito al hospedante ^{28,29}. Cabe resaltar que *Rhipicephalus microplus* es un ectoparásito de un solo hospedante, por lo que una vez que la hembra se alimentó y fue fecundada sobre el bovino, cae al suelo, ovoposita y muere ³⁰, de tal manera que la progenie de la garrapata es la transmisora de la babesiosis. Esto es posible debido a que, durante el tránsito de los quinetos en la hemolinfa, éstos pueden infectar otros tejidos y llevar a cabo un segundo ciclo de división. Los quinetos secundarios son capaces invadir los ovarios de la garrapata y ser transmitidos de forma transovárica a la siguiente generación ^{31,32}.

I.III.I Proceso de invasión del *Babesia bigemina* al eritrocito hospedante

Una vez que el esporozoíto ha logrado ingresar al bovino hospedante, invade al eritrocito por medio de una invaginación, formando una vacuola parasitófora transitoria. La membrana de la vacuola eventualmente se desintegra, quedando solo la membrana de *Babesia*. Una vez que sucede esto, se produce una diferenciación a trofozoíto el cual se divide por medio de merogonia, dando lugar a dos nuevos merozoítos, los cuales escapan del eritrocito e infectarán una nueva célula. El ciclo se completa cuando nuevamente una garrapata se alimenta de sangre de un bovino infectado ^{4,25}.

Durante la invasión de *Babesia bigemina* al eritrocito del hospedante se pueden distinguir etapas definidas del proceso: el contacto y adhesión del merozoíto al eritrocito, la reorientación del polo apical en contra de la célula que invadirá con el consecuente posicionamiento del complejo apical hacia la superficie celular, la

formación de la vacuola parasitófora junto con la simultánea penetración y la liberación del contenido de las roptrias ³³.

Los merozoítos de *Babesia* poseen sobre su superficie una serie de proteínas las cuales funcionan como moléculas de adhesión para el anclaje a la membrana del eritrocito ³⁴. En *Babesia bovis* las proteínas VMSA (Antígeno variable de la superficie del merozoíto, por sus siglas en inglés) es una familia de proteínas bien caracterizadas de las cuales se ha propuesto su participación directa en las primeras interacciones de unión del parásito y la célula hospedera. Lo anterior debido a su localización en la célula parasitaria. Además de que anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas de esta familia son capaces de inhibir el proceso de invasión ³⁵. La proteína de los micronemas 1 (MIC1) de *Toxoplasma gondii* fue identificada inicialmente en *Babesia bovis* y posteriormente en *Babesia bigemina*. Se ha descrito que esta proteína posee dominios de adhesión al ácido siálico, el cual utiliza como sitio de reconocimiento en la membrana de las células del hospedante. La neutralización con anticuerpos contra esta proteína tanto en *B. bovis* como en *B. bigemina* refuerza la hipótesis de su intervención en el proceso de invasión ³⁶. En *B. bigemina* se conocen dos proteínas de superficie, GP45 y GP55 las cuales a diferencia de los VMSA de *B. bovis*, no están estudiadas detalladamente y se piensa que están relacionadas en las interacciones de las membranas celulares debido a ensayos de neutralización del parásito realizados con anticuerpos específicos contra estas proteínas ³⁷.

Posterior a la adhesión del parásito, ocurre la reorientación del merozoíto, cuya finalidad es direccionar el complejo apical para establecer el contacto con la superficie celular del eritrocito. Se piensa que las proteínas secretadas por las roptrias y los micronemas son las responsables de este proceso ³⁸. El Antígeno Apical del Merozoíto, proteína llamada AMA-1 por sus siglas en inglés ha sido caracterizada en el género *Plasmodium* y de la cual se ha encontrado su homólogo en *Babesia* ³⁹. Se ha comprobado por medio de bloqueos con anticuerpos específicos su papel directo en la formación de la unión apical con la membrana ⁴⁰. Las proteínas de las roptrias son liberadas justo después de que se logrado establecer un contacto estrecho. Las proteínas asociadas a las roptrias 1 (RAP-1), las proteínas de las roptrias (ROP) y las proteínas del cuello de las roptrias (RON), se han evaluado para determinar la importancia del papel que desempeñan en la invasión y en estudios donde se ha inhibido este proceso se ha logrado observar la liberación de estas proteínas las cuales se postuló que funcionan como anclas para la unión estrecha permitiendo que el motor de actina y miosina “empuje” al merozoíto hacia el interior de la célula hospedera ¹⁰. Además de lo anterior existen evidencia de que las proteínas de la familia RON interactúan de forma íntima con el citoesqueleto de la célula hospedera, probablemente en el reordenamiento de la

estructura del mismo para permitir el acceso del parásito, sin embargo, el proceso no se encuentra completamente elucidado ⁴¹. Aunque en el género *Babesia* no se ha descrito el mecanismo de acción de estas proteínas como en *T. gondii*, se ha reportado que el gen *ron2* está presente en el genoma de diferentes especies de *Babesia* incluyendo *B. bovis* y *B. bigemina*; en estas dos últimas, se ha demostrado su expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional y de forma muy importante, se demostró que anticuerpos anti-RON2 son capaces de disminuir el porcentaje de invasión al eritrocito bovino *in vitro* ^{42,43}.

I.III.II Reproducción sexual de *Babesia* sp.

Durante el desarrollo del parásito en el bovino se generan células precursoras sexuales denominadas gamontes, los cuales sobreviven y darán lugar a las fases sexuales ⁴⁴. Factores ambientales tales como la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y otros propios del ambiente intestinal, las células parasitarias inducen su transformación a gametocitos (denominados cuerpos radiados o Strahlenkörper) los cuales se agrupan, se fusionan en pares y forman cigotos ⁴⁵.

Durante el estadio de fase sexual, los parásitos de *Babesia* expresan una proteína denominada HAP2, la cual interviene en la reproducción sexual ^{46,47}. La proteína HAP2 (llamada también GSC1) fue descubierta por primera vez en plantas del género *Lilium*. Mori y colaboradores encontraron esta proteína en los gametos provenientes del polen (gametos macho) de dicha planta. Años más tarde, el equipo de trabajo de Liu describe por primera vez a HAP2 en células de *Plasmodium berghei* y en algas del género *Chlamydomonas* ⁴⁸. Los estudios realizados en *A. thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, y *Plasmodium berghei* evidenciaron que la eliminación de la proteína HAP2 o algunos cambios en ella tienen consecuencias en la reproducción sexual de estos organismos. Los gametos machos son los que expresan esta proteína por lo que las mutaciones del gen que la codifica resulta en infertilidad en este gameto ⁴⁸⁻⁵⁰.

La proteína HAP2 es una proteína transmembranal formada por un dominio conservado extracelular rico en residuos de cisteína, una hélice alfa transmembranal y un fragmento intracelular, el cual presenta una secuencia menos conservada en la cual se pueden observar distintas regiones ricas en histidinas ^{49,51,52}. Liu y colaboradores en el 2015 realizaron un análisis completo de la función de los dominios de la proteína HAP2 usando como modelo de estudio a *Chlamydomonas reinhardtii*. Los análisis de Liu revelaron que cuando se altera el ectodominio de la proteína, esta no se expresa en la superficie de la célula. Por otra parte, mutaciones en residuos en los cuales existe una región de hélice hipotética tuvieron un efecto en la expresión y, por tanto, en la fusión de gametos. Cercanas al dominio transmembranal de HAP2 se encuentran dos cisteínas conservadas; el intercambio de ambas cisteínas por dos serinas impide la fusión de los gametos

debido a que la fusión de membranas se encuentra bloqueada. Los hallazgos de Liu permiten afirmar que el par de cisteínas cercanas al dominio transmembranal y la disrupción de la topología de HAP2 juegan un papel central en la fusión de gametos ⁵¹.

Por su parte Wong y colaboradores describieron que el dominio intracelular de la proteína HAP2 es rico en histidinas. La disrupción de las regiones ricas en histidinas evita la fusión de gametos. Los cambios de los residuos de histidina por aminoácidos no cargados como glicina y alanina provocan la no funcionalidad de HAP2 ⁵².

En *Babesia* se desconoce a detalle el mecanismo por el cual la proteína HAP2 participa en la fusión de gametos. Sin embargo, Camacho-Nuez y colaboradores en el 2017 describieron por primera vez en *B. bigemina* un gen hipotético que posee un dominio HAP2. Se observó que esta proteína solo se expresa en fases sexuales y no en fases asexuales y se demostró el hecho de que anticuerpos contra péptidos conservados de esta proteína son capaces de reducir en aproximadamente un 50% la formación de cigotos *in vitro* ⁴⁶. De forma paralela Hussein y colaboradores en el mismo año demuestran la expresión diferencial de HAP2 en células de *B. bovis* provenientes del intestino de la garrapata y en fases sexuales inducidas *in vitro* ⁴⁷.

A pesar de que en el género *Babesia* no se cuenta con información detallada de la topología, dominios funcionales y mecanismos de acción de la proteína HAP2, si se ha demostrado la presencia del gen, su expresión a nivel transcripcional y traduccional y la inhibición de la fusión de gametos. Todo esto coloca a esta proteína como un importante candidato para la generación de una vacuna bloqueadora de la transmisión.

I.IV Respuesta inmunitaria contra la Babesiosis

Cuando los individuos contraen la babesiosis y sobreviven ya sea por la defensa de su sistema inmune o con ayuda de terapia química, se produce una inmunidad esterilizante, esta inmunidad concomitante se debe principalmente a dos factores: la destrucción de eritrocitos infectados por macrófagos activados del bazo ^{53,54} y la producción de anticuerpos contra antígenos de las células parasitarias ⁵⁵.

Los bovinos jóvenes menores de un año son inmunes a la enfermedad, en estos bovinos los macrófagos residentes del bazo poseen una alta actividad de producción de radicales nítricos, tales como el óxido nítrico, se ha demostrado el aumento de la expresión de la sintetasa inducible de óxido nítrico ⁵⁶. La capacidad de los macrófagos esplénicos en bovinos jóvenes se ve influenciada por la expresión temprana de IL-12 e IFN- γ , que propician la expresión temprana de los radicales nítricos, en adultos esto sucede de forma tardía durante la infección ^{57,58}. La presencia equilibrada de los tres organismos: parásito, vector y hospedante, permiten que se genere la estabilidad enzoótica. Durante el periodo de infección en bovinos juveniles la presencia del vector permite la transmisión constante del parásito sin la presencia de signos clínicos con la consecuente respuesta inmune del hospedante contra *Babesia* sp. La estabilidad se rompe cuando se erradica el

vector (e indirectamente la babesiosis) y nuevos individuos nacen sin ser expuestos al parásito durante el periodo de inmunidad natural antes de llegar al primer año de vida ⁵⁹.

Como se mencionó anteriormente, los bovinos jóvenes que poseen resistencia natural desarrollan una protección inmunológica por un plazo de hasta seis meses después de nacer. Comienza con la transferencia de anticuerpos de forma pasiva por la madre, posteriormente el bazo de estos becerros juega un papel central en la eliminación y control del parásito debido a que las células fagocíticas de este órgano detectan y eliminan los eritrocitos invadidos por *Babesia*. Se presenta así una respuesta Th1 caracterizada por la producción y liberación de IL-12, IFN- γ y la activación de linfocitos NK ^{53,56,58,60}.

Uno de los órganos que desempeñan un papel central en la respuesta inmune contra *Babesia* sp. en bovinos es el bazo, se ha demostrado que bovinos esplenectomizados son más susceptibles a adquirir la babesiosis en comparación con bovinos en los cuales el bazo no ha sido removido, esto incluyendo por supuesto a los bovinos jóvenes ⁶¹. Este órgano juega un papel central en la respuesta inmune tanto específica como inespecífica contra *Babesia* sp., este órgano es el sitio donde se remueven los eritrocitos que han sufrido alteración ya sea porque ha rebasado su media de tiempo de vida o por otros factores y por lo tanto es el lugar donde se lleva a cabo la respuesta contra este hemoparásito ⁶².

Además de la actividad celular del bazo en la respuesta inmune contra *Babesia* sp. la producción de citocinas juega un papel crucial en la respuesta inmune adquirida y en la inmunidad esterilizante característica en la babesiosis. El modelo de inmunidad descrito depende fuertemente de la activación de los macrófagos por medio el IFN- γ . Durante la respuesta inmune adaptativa las células T cooperadoras específicas de antígeno desempeñan un rol central en la producción del IFN- γ , además de la activación de los macrófagos, este interferón desencadena la producción de anticuerpos IgG2 fuertemente opsonizantes ⁶³, así pues la inmunidad adquirida recae en la activación de células T CD4⁺ efectoras secretoras de INF- γ que coadyuvan a la producción de anticuerpos protectores IgG2 ⁶⁴. La producción de óxido nítrico también es influenciada por la producción del interferón gamma, como fue comprobado en estudios *in vitro* en el que en presencia de IFN- γ en cultivos de monocitos y macrófagos de bovino en presencia de merozoitos y fracciones subcelulares estimulaban la producción de NO ⁶⁵.

Otras citocinas son importantes para el desarrollo de la inmunidad concomitante. Por una parte la IL-12 e IL-18 participan sinérgicamente en la producción de INF- γ ⁶⁶. Macrófagos estimulados con eritrocitos infectados con *Babesia* aumentaron la producción de TNF- α ⁶⁷, así mismo líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ secretan IFN- γ y TNF- α al ser estimulados con antígenos de *B. bovis* ⁶⁸, sobrenadantes de

cultivos que contenían estas dos citocinas fueron capaces de estimular macrófagos para la producción de NO en mayores cantidades en comparación con la estimulación de INF- γ solamente ⁶⁹.

Para que se desarrolle una respuesta inmune protectora óptima es necesario tanto la activación de los macrófagos dependientes de interferón gamma como la participación de anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento. Se han realizado experimentos en los cuales clones de células T CD4⁺ específicas contra *B. bovis* han sido capaces de estimular células B para la producción tanto de IgG1 como de IgG2 ⁷⁰. La cinética de producción de anticuerpos anti-*Babesia bigemina* ha sido estudiada anteriormente, la primera detección de anticuerpos IgG se da a los 7 días post-infección y el pico más alto de producción a los 12 días y manteniéndose en meseta por siete semanas ⁷¹. Aunque la respuesta innata contra la babesiosis parece ser independiente de anticuerpos su aparición durante el desarrollo de la infección parece ser crucial para el desarrollo de una inmunidad de larga duración ⁷², sobre todo porque se ha demostrado el papel de anticuerpos opsonizantes del tipo IgG2 como responsables del control de la parasitemia por el aumento de la fagocitosis ⁷³, así como de la protección contra la babesiosis por medio de inmunidad pasiva por la transferencia de anticuerpos IgG1 e IgG2 ⁷⁴. El carácter opsonizante de los anticuerpos anti-babesia se demostró porque eritrocitos infectados expuestos a anticuerpos *in vitro* no tuvieron ningún efecto en la viabilidad del parásito, sin embargo se observó la activación de macrófagos *in vivo* ⁷³.

I.V Epidemiología e impacto económico de la babesiosis bovina

Actualmente la babesiosis no se considera una enfermedad de reporte obligatorio en nuestro país, por lo que se dispone de información limitada acerca de la prevalencia de la babesiosis y otros aspectos como distribución y pérdida económica en las bases de datos de las instituciones de seguridad y control sanitarias en nuestro país (SENASICA, SADER, etc.). Sin embargo, la presencia del vector en zonas geográficas determinadas es un factor de alto riesgo que puede estar relacionado con la incidencia de esta enfermedad. En México, *Rhipicephalus* spp. se encuentra distribuida en más de la mitad del territorio nacional siendo los estados del noroeste del país declarados libres de garrapatas ⁷⁵. Rodríguez-Vivas y colaboradores en el 2017 estimaron el impacto económico en la industria ganadera a causa de las parasitosis, mencionando que la garrapata *R. microplus* causa pérdidas de aproximadamente 573 millones de dólares al año en nuestro país, lo anterior sin tomar en cuenta los gastos secundarios ocasionados por las enfermedades transmitidas por la garrapata y sus respectivas medidas de profilaxis y tratamientos ⁷⁶. Por su parte la fauna silvestre juega un importante papel para la diseminación y transmisión del vector y la babesiosis. Estudios realizados por Ueti y colaboradores, demostraron que en el venado cola blanca se puede perpetuar el

ciclo de *Rhipicephalus microplus*, en sus estudios se observó que en este animal silvestre no se establece la babesiosis, sin embargo por ser transmitida transestadialmente y transováricamente si bien no se completa el ciclo de vida de *Babesia*, si el de la garrapata permitiendo su sobrevivencia y la diseminación de ambos parásitos en los hospedantes adecuados ⁷⁷, así mismo se ha observado que los antílopes conocidos como Nilgós (*Boselaphus tragocamelus*) son también hospedantes *R. microplus* favoreciendo su diseminación a través de la frontera de México y Estados Unidos además de ser también hospedantes de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* ⁷⁸.

I.VI Vacunas y posibles candidatos vacúnales contra *Babesia bigemina*

Desde principios de los ochentas se han utilizado vacunas elaboradas de eritrocitos de bovino infectados con cepas atenuadas de *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma* sp. En la década de los ochentas se comenzaron a desarrollar las bases para la generación de vacunas recombinantes; inicialmente se tomaban extractos de células fraccionadas de *Babesia* y se utilizaban para inmunizar bovinos. Con esto se comenzaron a identificar antígenos con capacidad protectora y con ayuda de técnicas biomoleculares se logró probar dichas moléculas que en combinación, lograron presentar protección casi en el mismo grado que las vacunas comerciales disponibles en ese momento elaboradas a partir de cepas vivas atenuadas ⁷⁹. Proteínas como MSA-1 estaban ya identificadas como antígenos de superficie de las células parasitarias y además se comenzó a describir la variabilidad que presentan estas moléculas entre las cepas geográficamente distantes, como por ejemplo las proteínas VMSA (Variable merozoite Surface Antigen) provenientes de genes polimórficos cuyos productos son inmunogénicos pero poseen una alta variabilidad en secuencia ^{34,80}. Conforme avanzaron las investigaciones y con el surgimiento de nuevas metodologías se comenzaron a proponer nuevas proteínas de *Babesia* que posiblemente estaban relacionadas con la respuesta inmune en el hospedante ⁸¹. Es así que se comenzaron a hacer pruebas de neutralización de la infectividad de *Babesia* con el uso de anticuerpos dirigidos contra proteínas propias del parásito como lo es GP45, por ejemplo ³⁷.

Gracias a que los análisis bioinformáticos han facilitado el mapeo, la localización y manipulación de información genética, y aunado a los avances en estudios proteómicos, se ha determinado la presencia de epítomos en cepas de *Babesia bigemina* de diversas partes del mundo capaces de desencadenar una respuesta inmune. Una serie de péptidos provenientes de proteínas involucradas en el proceso de invasión del eritrocito fueron analizadas con la finalidad de localizar péptidos que generaran anticuerpos contra el parásito. AMA1, MIC1, SBP4, RAP-1 α 1, GP45, fueron las proteínas de las cuales se han identificado péptidos con capacidad

inmunogénica ⁸²⁻⁸⁴. Así mismo, se ha localizado el homólogo de la proteína HAP2, la cual está relacionada en la fusión de las fases sexuales del parásito en la garrapata, obteniendo anticuerpos contra esta proteína y lograron observar que la fusión de los gametocitos es inhibida con el uso de estos anticuerpos ⁴⁶. Además de lo anterior, se ha determinado la presencia de la proteína RON2 en *B. bigemina* y *B. bovis* la cual genera anticuerpos contra la ésta. Es la primera vez que se ha identificado dicha proteína en este género ya que había sido únicamente descrita en otros apicomplexos como *Plasmodium* y *Toxoplasma* ^{42,43}. Con lo cual ahora se conoce una serie de moléculas proteicas que presentan secuencias con actividad inmunológica. Los últimos mencionados a lo largo de este párrafo poseen el potencial como candidatos para la generación de una vacuna efectiva contra *Babesia bigemina* y se describen brevemente a continuación.

• **Antígeno Apical del Merozoíto (AMA-1).** El antígeno apical de merozoíto (AMA-1 por sus siglas en inglés) es una proteína de superficie la cual interactúa con las proteínas del cuello de las roptrias para formar la unión estrecha entre la célula parasitaria y la célula del hospedero. Inicialmente la proteína AMA-1 fue caracterizada en *Plasmodium* y *Toxoplasma gondii* por lo que la información de su estructura y función de esta proteína está basada en su mayoría en el conocimiento generado en estos dos organismos ⁸⁵. Por medio del análisis de 365 secuencias de la proteína AMA-1 en *Plasmodium* se ha determinado que esta proteína posee aproximadamente 64 polimorfismos a lo largo de los diferentes dominios que posee, tanto en la secuencia citosólica como en la transmembranal y la extracelular ⁸⁶. Sin embargo la proteína AMA-1 continua siendo un candidato importante para la generación de vacunas ya que se ha demostrado que el uso de anticuerpos contra esta proteína inhibe la invasión del parásito a la célula del hospedero hasta en un 50% ⁸⁷. En *Plasmodium* a pesar de que cepas de diferentes partes del mundo poseen polimorfismos en las secuencias de AMA-1, se ha demostrado que anticuerpos generados a partir de proteínas recombinantes poseen inhibición cruzada permitiendo bloquear la invasión del eritrocito con el uso de anticuerpos contra la proteína de una cepa distinta, proponiendo como conclusión que esta proteína a pesar de su variabilidad de secuencia posee una diversidad antigénica escasa y que probablemente haya traslapamiento de epítomos ⁸⁸. Parece remarcable señalar que los polimorfismos de esta proteína son altamente variables en número en los diferentes organismos apicomplexos, Moreau y colaboradores estudiaron los polimorfismos de AMA-1 en cepas de *B. divergens* encontrando únicamente dos mutaciones en las secuencias de estas proteínas ⁸⁹, mientras que en 44 cepas de *B. bovis* aisladas en Sri Lanka la secuencia de *ama-1* es conservada por encima de un 95%, mientras que los genes *msa* de estas cepas presentaron alta variabilidad haciendo notar que no se trata del mismo genotipo ⁹⁰, en cepas aisladas en países asiáticos la secuencia de *ama-1* mostró un alto grado de conservación ⁹¹, por su parte Torina y colaboradores demuestran que cepas de *B. bigemina* aisladas en Italia poseen alrededor de 54 mutaciones comparándolas con las cepas australianas de referencia; sin embargo, las comparaciones hechas con cepas de México y Argentina muestran un porcentaje de identidad de 99.98% ⁹² lo

que nos hace concluir que la variabilidad de éste gen no permanece constante, tanto en cepas asiladas de sitios geográficamente cercanos ni entre cepas de localizaciones lejanas, si no que dichos polimorfismos son resultados de procesos de recombinación azarosos.

• **Proteína de los cuerpos esféricos (SBP-4).** Las Proteínas de los Cuerpos Esféricos (denominadas SBPs por sus siglas en inglés) están formadas por cuatro miembros denominados SBP-1, SBP-2, SBP-3 y SBP-4 y han sido identificadas inicialmente en *Babesia bovis*. Se ha propuesto que estas proteínas están involucradas en la disolución de la membrana de la vacuola parasitofora una vez que el parásito se ha internalizado en el eritrocito del hospedero ⁹³. Terkawi y colaboradores caracterizaron a profundidad la proteína SBP-4 de *Babesia bovis*, a partir del uso de DNA genómico de cepas de alrededor del mundo, utilizando herramientas y softwares bioinformáticos demostraron que el gen asilado de cultivos de cepas de Texas posee un alto grado de identidad con cepas de México (100%), Brasil (99.2%), Mongolia (99.1%), Tailandia (99%), Ghana (96%) y Sudáfrica (96.4%) ⁹⁴. De igual forma se ha visto que entre las proteínas de los cuerpos esféricos no se comparten epítomos, además de que los determinantes antigénicos de SBP3 se encuentran conservados entre cepas de *B. bovis* de Texas, México y Australia ⁹⁵. Lo que sugiere fuertemente que estas proteínas no poseen un alto grado de variabilidad en *Babesia bovis*. No es de nuestro conocimiento un análisis a profundidad de los polimorfismos y de las variaciones que pueda presentar esta proteína en *B. bigemina*. Cruz y Mosqueda lograron identificar la proteína SBP4 en *B. bigemina*, la secuencia de dicho gen solo mostró un 99% de identidad con las secuencias reportadas en bases de datos de *B. bovis* ⁹⁶.

• **Proteína del cuello de las Roptrias (RON2).** Las proteínas del cuello de las roptrias denominadas proteínas RON (Rhoptry Neck Proteins), son un conjunto de proteínas excretadas por medio del sistema apical de los apicomplexos. En *Plasmodium* y *Toxoplasma* se ha demostrado que estas proteínas se internalizan en la membrana de la célula hospedera en la cual se está llevando la invasión para posteriormente interactuar con la proteína AMA1 y formar la unión estrecha entre las membranas de la célula parasitaria y la célula hospedadora (Proellocks, Coppel, & Waller, 2010). Lamarque y colaboradores realizaron estudios para caracterizar la proteína RON2 en *T. gondii* y su interacción con AMA1 durante uno de los pasos que se llevan a cabo en el proceso de invasión del eritrocito, uno de los aspectos importantes en su investigación es que demostraron por medio de inmunoprecipitación que la proteína RON2 era incapaz de unirse a anticuerpos generados por medio de inmunización con péptidos provenientes del extremo carboxilo terminal de la proteína cuando se encuentra unida a AMA1, análisis *in silico* de las secuencias de este gen con diversos apicomplexos incluido *B. bovis*, muestran que este fragmento de la proteína esta conservado entre los diferentes apicomplexos, el análisis de los ortólogos en este gen realizado por ellos concluye que el fragmento amino terminal de la proteína posee variaciones importantes ⁹⁷. En *B. bovis* se caracterizó la proteína RON2 y se demostró que posee epítomos B conservados los cuales producen anticuerpos que neutralizan la invasión del parásito al eritrocito ⁹⁸, de igual forma la RON2 fue descrita en *B. bigemina*. En esta

especie RON2 contiene epítomos B inmunodominantes y anticuerpos contra estos epítomos son capaces de bloquear la invasión *in vitro* ⁴³.

• **Proteínas de los Micronemas (MIC-1).** Las proteínas de los micronemas se piensa que poseen un papel importante durante el proceso de invasión al eritrocito del bovino, se ha sugerido que participa en la interacción inicial de la célula parasitaria y de la célula hospedante, se ha propuesto que la liberación de esta proteína por el complejo apical permite la penetración del parásito y que son mediadoras de esta interacción célula-célula, debido a que poseen dominios de adhesión y estos dominios están conservados en diferentes especies de parásitos apicomplexos ^{36,82,99,100}. Silva y colaboradores demostraron anticuerpos anti-MIC-1 bloqueaban la invasión de *B. bovis* al eritrocito³⁶, por su parte Hernández-Silva y colaboradores demostraron de igual forma que anticuerpos anti-péptidos conservados de MIC-1 eran capaces de bloquear también el proceso de invasión *i-vitro* ⁸²

• **Proteína Asociada a las Roptrias (RAP-1).** Las proteínas asociadas a las roptrias son una familia mutagénica de proteínas, en el caso de *B. bigemina* esta familia está compuesta de cinco genes dispuestos en grupo designados como *rap-1a*, entre estos genes se encuentran otros genes denominados *rap-1b* los cuales están presentes en igual número de copias que *rap-1a* y en el mismo locus finalmente se encuentra también un tercer gen de esta familia denominado como *rap-1c*. Los productos de estos genes son expresados simultáneamente y se ha demostrado que son conservados en cepas geográficamente distantes ¹⁰¹. En *Babesia bovis* se ha demostrado que anticuerpos contra esta proteína son capaces de reducir la invasión de parásito al eritrocito ³⁵. Se ha demostrado la capacidad inmunogénica de esta proteína, inmunización con RAP-1 recombinante y fragmentos de esta proteína han sido capaces de desencadenar una respuesta inmune con la producción de interferón gamma e IgG2, típico en una respuesta inmune contra la babesiosis, sin embargo bovinos inmunizados contra esta proteína presentaron signos clínicos a los pocos días post-desafío, se hipotetizó que una objetivo molecular no es suficiente para desencadenar una respuesta protectora ¹⁰².

• **Proteína de fusión de fases sexuales HAP2.** La proteína HAP2/GCS1 fue descubierta por primera vez en plantas, Mori y colaboradores encontraron esta proteína en los gametos provenientes del polen (gametos macho) en plantas del género *Lilium*, los análisis en bases de datos encontraron la presencia de homólogos en algas rojas, en hongos mucilaginosos y en protozoarios como *Plasmodium* y *Leishmania* ^{50,103}, años más tarde el equipo de trabajo de Liu describe por primera vez en células de *Plasmodium berghei* y en algas del género *Chlamydomonas reinhardtii* ⁴⁸. Todos los ortólogos predichos comparten una estructura primaria los análisis de la secuencia de la proteína sugirieron que posee una secuencia hidrofóbica tanto en la porción amino terminal como en el extremo carboxilo terminal, este último es rico en histidinas, un péptido señal y un dominio transmembranal ^{49,51}. Esta proteína ya se encuentra descrita en *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, en ambos casos la proteína se expresa diferencialmente en

fases sexuales pero no en otros estadios asexuales como merozoitos, esporozoitos y quinetos ^{46,47}. Información más detallada del papel de esta proteína se ha descrito previamente en este texto en la sección del ciclo de vida la reproducción sexual de *Babesia* sp.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II.I Justificación

La babesiosis es una enfermedad del ganado bovino que causa pérdidas económicas y representa un obstáculo para la producción ganadera. La presencia del vector, la garrapata *Rhipicephalus microplus*, está íntimamente relacionada con la presencia de la enfermedad. En México la garrapata se encuentra ampliamente distribuida en más del 50% de territorio nacional, lo cual pone en riesgo al 70% del ganado de contraer la babesiosis.

Por otra parte, los tratamientos antiparasitarios son útiles únicamente mientras se encuentran en concentraciones adecuadas en torrente sanguíneo, y su uso está limitado en ganado de consumo. Actualmente, en algunos países se utilizan vacunas de parásitos vivos atenuados, las cuales poseen desventajas que las hacen poco accesibles económicamente y para su aplicación en campo.

El presente trabajo tuvo como objetivo generar una proteína quimérica con capacidad inmunogénica a partir de DNA recombinante utilizando diferentes epítomos de proteínas que intervienen en la invasión de *B. bigemina* al eritrocito bovino y en la reproducción sexual del parásito dentro de la garrapata, generando así una potencial vacuna que confiera protección al bovino bloqueando el ciclo de vida del parásito tanto en el hospedero como en el vector.

III.I Hipótesis

La proteína quimérica genera anticuerpos que bloquean la invasión de *Babesia bigemina* al eritrocito y evitan la fusión de fases sexuales en el vector.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II.III Objetivos

Objetivo General

Generar una proteína quimérica de péptidos conservados de proteínas de *Babesia bigemina* que intervienen en el mecanismo de invasión al eritrocito y en la fusión de fases sexuales.

Objetivos específicos

1. Seleccionar la capacidad de anticuerpos contra péptidos individuales de bloquear la invasión al eritrocito y la fusión de formas sexuales *in vitro*.
2. Generar y producir la proteína quimérica
3. Obtención de anticuerpos bovinos contra la proteína quimérica
4. Evaluar la capacidad de los anticuerpos contra la proteína quimérica de reconocer proteínas nativas de *Babesia bigemina*.

III. Material y métodos

III.I. Estrategia experimental:

Para cumplir cada uno de los objetivos de este estudio, se dividió la estrategia experimental en etapas. A continuación, se describe de forma resumida en que consistieron cada una de las cuatro etapas de este trabajo.

- **Etapas 1:** Se llevó a cabo la evaluación de anticuerpos contra diversos péptidos de las proteínas AMA1, MIC1, SBP4, RAP-1 α 1 y RON2 con la finalidad de elegir los péptidos que generaron anticuerpos con mayor capacidad de bloquear la invasión de *B. bigemina* al eritrocito *in vitro*. De forma paralela se evaluaron anticuerpos de 2 péptidos de la proteína HAP2 para elegir los que tuvieron la mejor capacidad de inhibir la fusión de las fases sexuales *in vitro*.
- **Etapas 2:** Una vez seleccionados los péptidos que generaron anticuerpos con capacidad de neutralización, se procedió a ensamblar un gen quimérico. La secuencia de nucleótidos del gen se sintetizó por medio de una empresa especializada de síntesis de biomoléculas (BIO BASIC Inc). Una vez que se tuvo el gen, se clonó, se expresó y se purificó su producto proteico para ser utilizado como inmunógeno en bovinos.
- **Etapas 3:** Con la finalidad de confirmar si la proteína quimérica posee todos los epítomos que se consideraron para su construcción se evaluó por medio de una inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos contra cada uno de los péptidos que la conforman la proteína.
- **Etapas 4:** La proteína producto del gen quimérico fue administrado bajo un plan de inmunización en bovinos. Una vez concluida la programación de administración de la proteína, se obtuvieron muestras sanguíneas de las cuales se separó el suero con anticuerpos anti-quimera.
- **Etapas 5:** Los anticuerpos anti-proteína quimérica fueron evaluados para determinar si reconocen las proteínas nativas de *Babesia bigemina*.

A continuación, se detalla metodológicamente cada una de las etapas con la finalidad de profundizar e indicar de manera precisa las herramientas específicas utilizadas en cada etapa.

Etapas 1:

Cepas de *Babesia bigemina* y cultivo de parásitos *in vitro*.

Para llevar a cabo los ensayos de neutralización *in vitro* se utilizó la cepa Puerto Rico de *B. bigemina*. El cultivo de merozoítos se realizó en placas de 96 pozos utilizando medio HL-1, el cual fue suplementado con 5% de eritrocitos bovinos resuspendidos en buffer VYM. Adicionalmente el medio de cultivo se suplementó con 40% de suero bovino y se utilizó 0.1M TAPSO como amortiguador. El pH fue ajustado a 7.2.

El medio de cultivo fue inoculado con la cantidad adecuada de células infectadas para comenzar con una parasitemia 1%. El cultivo se incubó a 37°C y 5% de atmosfera de CO₂. Cada 24 horas el 75% del volumen total del medio fue reemplazado con medio fresco tratando de no perturbar las células rojas sedimentadas en el fondo de la placa de cultivo. Cuando la parasitemia alcanzó el 5% se realizaron pases adicionando eritrocitos nuevos y cultivo fresco ajustando nuevamente la parasitemia al 1%. Este procedimiento aseguro tener cultivo fresco disponible para el momento en el que se llevaran a cabo los ensayos de neutralización.

Ensayos de neutralización de las proteínas que participan en la invasión de *B. bigemina* al eritrocito bovino.

Cada uno de los sueros con anticuerpos (antisueros) contra los 21 péptidos de las proteínas AMA1, MIC1, SBP4, RAP-1 α 1 y RON2 fueron evaluados para determinar el porcentaje del bloqueo de la invasión de los merozoítos de *B. bigemina* al eritrocito bovino *in vitro*.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron como controles sueros de conejo pre-inmunización y cultivo a los cuales no se le adicionaron anticuerpos. Cada prueba se realizó por triplicado, se tomó el porcentaje de cada de células infectadas como variable de respuesta. Los resultados se sometieron a una prueba de comparación de medias *t de student* de muestras no pareadas comparando el cultivo adicionado con anticuerpos con sus respectivos controles. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con un nivel de confianza del 95%.

Se realizó un cultivo de *B. bigemina* como se describió anteriormente hasta alcanzar una parasitemia de 6.3%. Una vez que sucedió esto, se preparó una placa de cultivo de 96 pozos con medio el medio de cultivo descrito en el párrafo anterior, al cual además se les adicionó suero de conejo inmunizado que contenía anticuerpos específicos contra cada uno de los 21 péptidos individuales de las proteínas AMA-1, SBP-4, RON2, MIC-1, RAP-1 α 1 en una proporción 1:5 del volumen total de medio de cultivo por pozo (40 μ l de cada suero anti-péptido por pozo).

Los cultivos fueron inoculados con un volumen de 16.4 μ l del cultivo inicial, en este volumen se calculó un aproximado de 1×10^6 merozoítos de *B. bigemina*. Se

homogenizaron todos los componentes del cultivo pipeteando suavemente en repetidas ocasiones. El cultivo se mantuvo en incubación por 48 horas a 37°C y 5% de atmosfera de CO₂. Una vez terminado el tiempo de incubación se resuspendieron los eritrocitos pipeteando repetidamente con suavidad, se tomó una alícuota de la suspensión de células y se utilizó para preparar extendidos en laminillas los cuales fueron teñidos con Giemsa. La parasitemia se calculó contando células rojas infectadas y no infectadas de cinco campos representativos ³⁶.

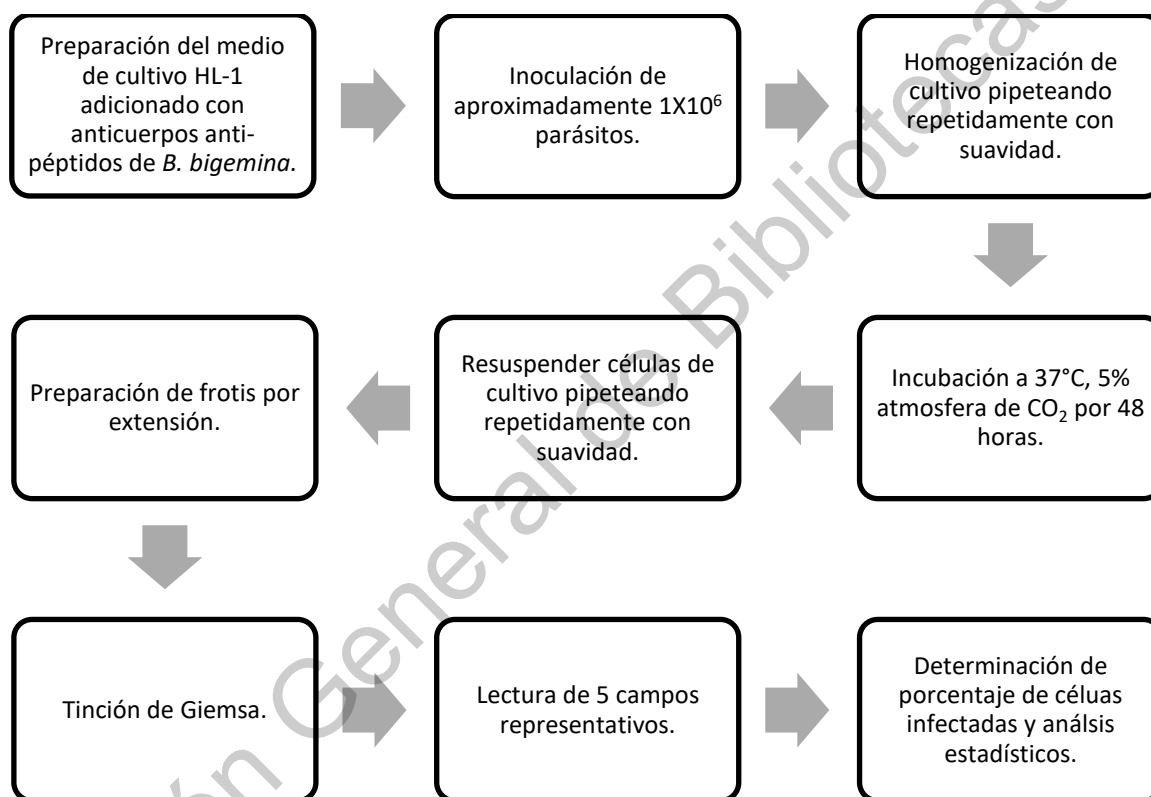


Figura 1. Diagrama del proceso de evaluación de la neutralización de la invasión de *B. bigemina* al eritrocito.

Evaluación de la inhibición de fusión de fases sexuales.

Los sueros con anticuerpos anti-péptidos de la proteína HAP2 fueron evaluados con la finalidad de determinar si evitan la fusión de gametos de *B. bigemina*. Se utilizaron suero pre-inmunización y un cultivo sin suero de conejo como controles negativos. Cada prueba se realizó por triplicado. La variable de respuesta que se evaluó fue el porcentaje de cigotos formados. Los resultados se sometieron a una prueba de comparación de medias *t de student* de muestras no pareadas entre cultivos de inducción de gametos adicionado con anticuerpos anti-péptidos de HAP2 y sus

respectivos controles. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con un nivel de confianza de 95%.

La inducción de fases sexuales se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Mosqueda et. al ¹⁰⁴ con modificaciones. A continuación, se describe brevemente el protocolo con modificaciones.

Se infectó de manera experimental un bovino macho de raza Holstein de 8 meses de edad al cual se le extirpó el bazo. La infección fue transmitida de manera natural por medio de garrapatas infectadas con *B. bigemina*. La infección de la garrapata se confirmó por métodos moleculares (PCR anidada). Se colocaron aproximadamente 10,000 larvas de *R. microplus infectadas* y después de 29 días el bovino presentó signos clínicos y una parasitemia de aproximadamente 3.5%, la cual se calculó contando 2000 células en frotis teñidos con Giemsa. Posteriormente se obtuvo una muestra de sangre completa de la vena yugular a la cual se le eliminó el coágulo de fibrina. La sangre desfibrinada se transfirió a tubos cónicos de 50 ml y se lavó 4 veces con medio VYM para eliminar el suero bovino y la capa flogística, manteniendo en todo momento las muestras en hielo.

El medio de cultivo se preparó hidratando un vial de polvo para 1L de medio de cultivo 199, al cual se le adicionó bicarbonato de sodio de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Sigma-Merk, USA), se complementó con ácido xanturénico a una concentración final de 100µM y con 40% de suero bovino descomplementarizado. A diferencia del medio de cultivo de merozoítos, el pH del medio de cultivo de inducción no fue ajustado. El medio de cultivo se esterilizó por medio de filtración y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Los eritrocitos infectados lavados anteriormente se agregaron al medio de cultivo a una concentración final del 20%. El cultivo se transfirió a botellas de cultivo de 25 cm² y a cada cultivo se le adicionó suero de conejo con anticuerpos anti-péptido 2 y anti-peptido 3 de la proteína HAP2 de *B. bigemina* en una proporción 1:10. Los cultivos se colocaron en incubación a 28°C sin atmósfera de CO₂. La inducción fue monitoreada en intervalos de 3 horas a partir de las primeras 12 horas de cultivo hasta que se confirmó la formación de cigotos en los cultivos (aproximadamente a las 36 horas).

Las células de los cultivos se centrifugaron después de detectarse cigotos en los cultivos de inducción sin anticuerpos, se descartó el sobrenadante y las células se mantuvieron en hielo.

Posteriormente, se llevó a cabo una recuperación de cigotos y fases sexuales por medio de un gradiente de densidad con Percoll (GE Healthcare, Chicago, EUA) (descrito por Mosqueda et. al ¹⁰⁴).

Primeramente, se preparó una solución stock de Percoll isoosmótico mezclando 9 partes (v/v) de Percoll con 1 parte de buffer de fosfatos 10X (V/V). Posteriormente se diluyó la solución de Percoll al 47% con buffer de fosfatos 1X.

Los cultivos de inducción se retiraron de la incubadora y se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml, se centrifugaron a 4,000 rpm para eliminar el medio de cultivo. El paquete celular se lavó tres veces con buffer de fosfatos 1X y al término de lavado se resuspendió en 2ml de buffer de fosfatos 1X. La suspensión celular se depositó en un tubo para centrifuga de fondo redondo el cual contenía 27 ml de la solución de Percoll 47%, la adición de las células al tubo con la solución de Percoll se realizó con suavidad para formar una película sobre el Percoll. Se procedió a centrifugar las células a 20,000 X g durante 20 minutos a 4°C, se observó la formación de un gradiente donde en el fondo del tubo se observaron los eritrocitos y una interfase hacia la superficie donde se encontraron las células de *B. bigemina* (fases sexuales y cigotos) y fantasmas de eritrocitos. Se recuperó la interfase donde esta contenidas las células y se lavó tres veces con buffer de fosfatos 1X y se prepararon frotis que fueron teñidos con Giemsa. Se contaron las fases sexuales y los cigotos formados a lo largo de la preparación. El porcentaje de la formación de cigotos se calculó tomando en cuenta las medias de las repeticiones y tomando como un 100% todas las células contadas incluyendo cigotos y fases sexuales.

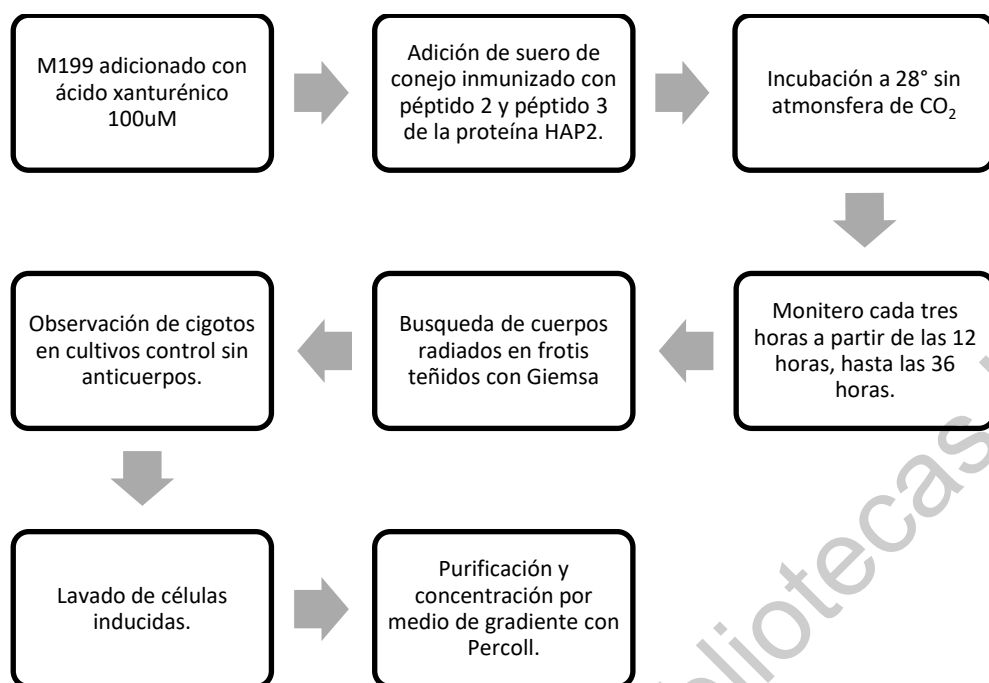


Figura 2. Diagrama del proceso de evaluación de la inhibición de la fusión de las fases sexuales de *B. bigemina*.

Etapas 2.

Ensamble del gen quimérico

Con base en los resultados de la etapa 1 se consideraron los péptidos que generaron anticuerpos con capacidad de inhibir la invasión de *B. bigemina* al eritrocito y la formación de cigotos.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos seleccionados se utilizó para ensamblar *in silico* un gen quimérico. Las secuencias de los péptidos se colocaron de manera continua agrupando los péptidos de acuerdo a la proteína a la cual pertenecen, es decir, todos los péptidos de la proteína "A" por ejemplo, se colocaron adyacentes unos de otros, sin colocar ningún péptido de otra proteína diferente a "A" entre ellos. Lo anterior con la finalidad de evitar la formación de nuevos epítomos yuxtapuestos entre secuencias de péptidos provenientes de dos proteínas distintas.

Diferentes versiones de la proteína quimérica fueron elaboradas y cada una de ellas se sometió a análisis bioinformáticos para predecir péptidos con alta probabilidad de ser epítomos B. Cada versión se sometió a los algoritmos de las herramientas del ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>), Bcepred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) e IEDB (https://www.iedb.org/home_v3.php). Se realizó la selección de la proteína con base en los siguientes criterios:

1. Todos los péptidos originales deben ser predichos en la secuencia de la proteína quimérica por al menos dos de los tres algoritmos.
2. No se deben formar epítomos yuxtapuestos resultado de la posición de dos péptidos de proteínas diferentes, (por ejemplo, péptidos contiguos como xxxxxxxyyyy; entiéndase que la letra “x” se refiere a un péptido de una proteína y la letra “y” a otro de una proteína distinta, la formación del epítomo yuxtapuesto se denota en negritas).
3. Los epítomos de una misma proteína se colocaron en orden consecutivo siguiendo el orden de aparición en la secuencia de la proteína original (por ejemplo: péptido A, péptido B y péptido C, en la secuencia original de la proteína el péptido B se encuentra primero hacia el amino terminal, hacia el carboxilo terminal le sigue el péptido C y al último el péptido A, por lo que el orden en la proteína quimérica fue, péptido B- péptido C- péptido A).
4. Los epítomos que presentan traslapamiento en la secuencia de la proteína original se colocaron de forma adyacente sin repetir los aminoácidos traslapados (por ejemplo, secuencia de péptido A: MTLMNRTKH**GFDEACD**, secuencia de péptido B: **GFDEACD**MPTREFDAACMKIL, en negritas se muestran los aminoácidos que se traslapan, por lo que estos péptidos de la misma proteína se ensamblarían de la siguiente manera: MTLMNRTKH**GFDEACD**MPTREFDAACMKIL).

Con ayuda del software Gentle (Magnus Manske, Cologne, Alemania) se buscó la secuencia de nucleótidos que codifica cada péptido incluido en la proteína quimérica. Las secuencias de nucleótidos se colocaron de acuerdo al orden de la versión de la proteína que cumplió con los criterios de selección mencionados anteriormente. La secuencia de ADN se sometió a un análisis de uso de codones preferenciales con la finalidad de obtener una secuencia del gen quimérico con codones que *E. coli* utiliza en alto porcentaje. La optimización de la secuencia se realizó utilizando el programa COOL (Codon Optimization On-Line ¹⁰⁵, disponible en: <https://cool.syncti.org/index.php>). Asimismo, la secuencia de ADN se analizó para eliminar en la medida de lo posible los sitios de restricción que pudieran interferir con la estrategia de clonación.

EL gen quimérico fue sintetizado por la empresa BioBasic Inc (Ontario, Canadá), el cual se remitió al Laboratorio de Inmunología y Vacunas clonado en el plásmido pUC57 flanqueado con las secuencias de restricción de la enzima *EcoRV*.

Clonación del gen quimérico

Se diseñó un juego de oligonucleótidos para amplificar el gen quimérico. Se colocó en el extremo 5' del oligonucleótido sentido la secuencia accesoria CCAC, que

permitirá la clonación direccional del gen, la secuencia de los oligonucleótidos corresponde a los primeros 23 nucleótidos del gen quimérico (5'-**CACCTCGTCCCACGGTGACTATCATCA**-3'), mientras que en el oligonucleótido antisentido se colocó el codón de paro UAA, la secuencia de este oligonucleótido corresponde a los dos últimos nucleótidos del gen hacia el extremo 3' (5'-**AATACCCAGGGTATCGATGTGGCAC**-3').

El gen fue amplificado por medio de PCR utilizando la enzima de alta fidelidad Accuzyme DNA Polymerase (Bioline Meridian Bioscience, Reino Unido), utilizando el siguiente programa de termociclado: un solo paso a 95°C durante tres minutos, treinta y cinco ciclos con un paso a 95°C durante 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 65°C durante 30 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto, se realizó un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos.

Para poder clonar, los amplicones fueron purificados del gel de agarosa con ayuda del kit QIAquick Gel Extraction Kit de la compañía Qiagen (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN de los amplicones purificados fueron cuantificados y se procedió inmediatamente a realizar la clonación. En tubo de 0.2 ml se realizó la mezcla de reacción considerando la relación molar inserto: vector 3:1.

Reactivos	Volumen
Producto fresco de PCR	0.5 a 4 µl
Solución de sales	1 µl
Agua estéril	Añadir a volumen final de 5 µl
Vector TOPO	1 µl
Volumen final	6 µl

Cuadro 1. Reacción de clonación en pENTER/D-TOPO según fabricante.

El gen quimérico fue clonado primeramente en el vector pENTER/D-TOPO (Invitrogen-Thermo Scientific, Carlsbad EUA), este último posee en uno de sus extremos la secuencia accesoria complementaria que se añadió al oligonucleótido forward por lo que permite la clonación direccional. El inserto quedo flanqueado por dos secuencias de recombinación sitio específico **attbR** y **attL** utilizada en la clonación por medio de la tecnología Gateway. Esta primera clonación permitió generar lo que se denomina un “clon de entrada” (entry clone).

Posteriormente el producto de la clonación se utilizó para transformar células calcio competentes de *E. coli* OneShot TOP10. Las células transformantes se incubaron durante la noche. Con la finalidad de confirmar la correcta clonación del plásmido se procedió a realizar en paralelo dos reacciones de PCR de colonia utilizando en

una de ellas oligonucleótidos específicos y en los otros oligonucleótidos universales M13. Los productos de PCR se observaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Una vez confirmado por PCR la presencia del gen se procedió a realizar el cultivo de las clonas en caldo LB adicionado con 100 µg/ml de Kanamicina, el cultivo permaneció en incubación durante la noche y al día siguiente se procedió a realizar una extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina con ayuda de columnas de purificación con el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA (Promega, Madison, EUA). El ADN plasmídico purificado se utilizó para realizar un análisis de restricción como segundo método para confirmar la inserción del gen y consecuentemente la obtención del “clon de entrada”. La digestión del plásmido se llevó a cabo con la enzima *EcoRI* y los resultados se confirmaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Una vez confirmado la clonación del gen en el “clon de entrada” se procedió a realizar una subclonación en el plásmido de expresión pDEST-17. Este plásmido de expresión posee las secuencias de recombinación sitio específicas **attL** y **attR** al igual que el “clon de entrada”. Se colocaron en un tubo de 0.2 ml los componentes de la reacción de recombinación como se muestra a continuación:

Componente	Muestra
Entry clone (pENTR/D-TOPO más inserto 150ng/reacción)	1-7 µl
Vector de destino (150ng/ µl)	1 µl
TE buffer pH 8.0	c.b.p. 8 µl

Cuadro 2. Reacción de recombinación del vector pENTR/D-TOPO y pDEST-17 de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La recombinación se llevó a un cabo en iguales concentraciones de plásmido destino y del plásmido “clon de entrada”, la mezcla de reacción se colocó a incubar en el termociclador sin calentar la placa superior de la tapa por 4 horas. Posteriormente se procedió a transformar la cepa DH5α de alta eficiencia para librería (invitrogen, California). El vector pDEST-17 poseen un doble mecanismo de selección, uno de ellos es el gen de resistencia a ampicilina por lo que las células transformadas se cultivaron en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina, además posee el gen *ccdB* el cual es letal para las cepas de *E. coli* utilizadas en la transformación. Solo las clonas que posean plásmidos que con el inserto de interés podrán sobrevivir. Los cultivos se incubaron a 37°C durante la noche y al día siguiente se analizaron las clonas por medio de PCR de colonia utilizando oligonucleótidos específicos, utilizando el oligonucleótido sentido del promotor T7 y el antisentido específico. Así mismo se realizó un análisis de restricción utilizando

la enzima *EcoRI*. Los productos de PCR y restricción se analizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Una vez confirmado los resultados de la recombinación, se seleccionaron 4 clonas y se colocaron en caldo LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina, se incubaron durante la noche (no más de 16 horas). La biomasa se utilizó para extraer DNA plasmídico utilizando el procedimiento mencionado anteriormente. El DNA plasmídico se remitió para secuenciación capilar por método Sanger al Laboratorio de Genética para la Biodiversidad LANGEBIO, CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato), utilizando oligonucleótidos específicos. Los electroferogramas resultantes de la secuenciación se analizaron, se editaron y se ensamblaron por medio del software Gentle (Cologne, Alemania). La confirmación del marco de lectura abierto y de la correcta clonación y recombinación se realizaron comparando la secuencia del gen quimérico y la secuencia del gen quimérico clonado *in silico* en el plásmido pDEST-17.

Posteriormente, se seleccionó solo uno de los plásmidos secuenciados y se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* BL-21-AI la cual posee la transcriptasa del bacteriófago T7 lo que permite la transcripción del gen de interés. Las células se incubaron bajo las condiciones mencionadas anteriormente y al día siguiente se seleccionaron 4 clonas para realizar un ensayo piloto de expresión.

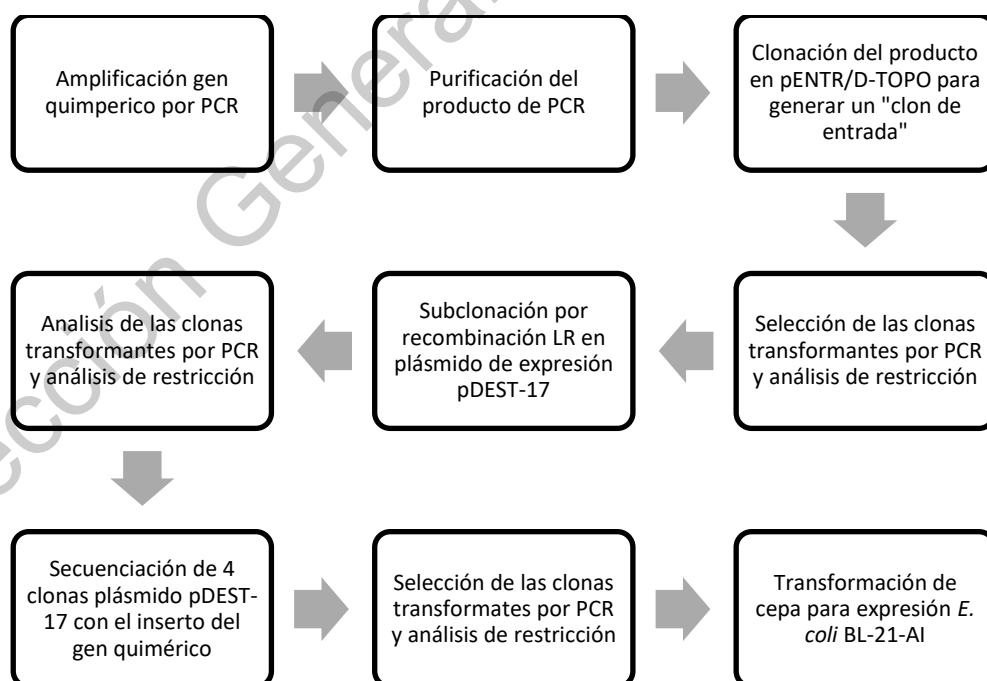


Figura 3. Diagrama del proceso de clonación del gen quimérico.

Ensayo piloto de la expresión de la proteína quimérica

Se colocaron 4 clonas a crecer en caldo LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina durante la noche, después de aproximadamente 16 horas de cultivo se midió la densidad óptica a 600nm de longitud de onda. Se calculó un inóculo con la D.O.₆₀₀ para comenzar un nuevo cultivo de 5 ml de caldo LB con ampicilina con una D.O.₆₀₀ a 0.05. Los tubos se colocaron en incubación a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.4 (mitad de la fase exponencial), se procedió a inducir la expresión del gen quimérico añadiendo L-arabinosa a una concentración final del 0.2%. Se tomaron muestras justo al inicio de la inducción (tiempo 0), y cada hora durante cuatro horas. En paralelo se colocó un cultivo de la misma cepa de *E. coli* transformada con pUC19 como control negativo, a este cultivo se le realizaron los mismos procedimientos (inducción, muestreo e incubación) mencionados anteriormente. Las muestras tomadas durante la expresión de la proteína se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y se almacenaron en congelación. Una vez terminada la inducción se le añadió a las células buffer de lisis (50mM de fosfato de potasio pH 7.8, 400mM cloruro de sodio, 100mM cloruro de potasio, 10% glicerol, 0.5% triton X-100, 10mM imidazol) y se sometieron los tubos a 4 ciclos de congelación con nitrógeno y calentamiento a 42°C, el lisado se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a 4°C y se separó el sobrenadante del sedimento. Con la finalidad de determinar si la proteína quimérica expresada se encuentra en la fase soluble (sobrenadante del lisado celular) o en la fase insoluble o cuerpos de inclusión (sedimento celular) se analizaron ambas fracciones por medio de un gel de electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 12%.

Una vez confirmada la expresión de la proteína quimérica se procedió a realizar la expresión de la proteína en un volumen de medio litro para proceder a su purificación.

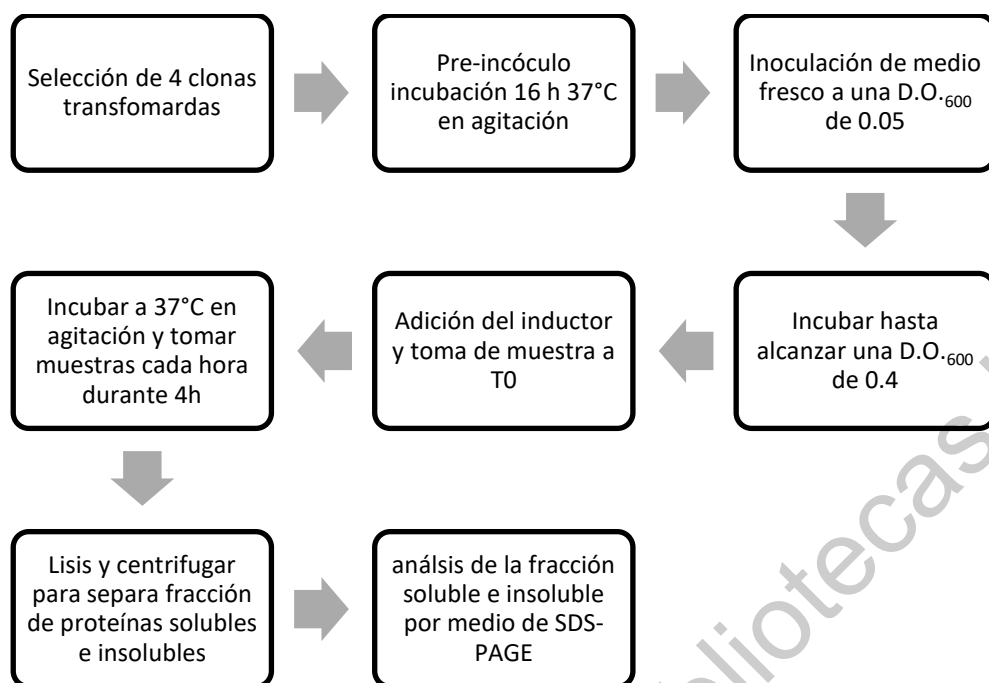


Figura 4. Diagrama del ensayo piloto para la expresión de la proteína quimérica.

Purificación de la proteína quimérica.

Se colocó un cultivo de 500 ml siguiendo el mismo procedimiento de inoculación, inducción mencionado en la sección anterior. Una vez terminado el tiempo de incubación el cultivo se centrifugó para recuperar la biomasa y eliminar el medio de cultivo. Las células se lavaron con buffer de fosfatos pH 7.4, se guardaron a -20 secas para propiciar la lisis celular. Las células se descongelaron y se resuspendieron en 5 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 y se sometieron a lisis por medio de sonicación a 80% de amplitud por 5 minutos en pulsos de 10 segundos cada uno, los tubos se mantuvieron en todo momento en baño de hielo. El lisado se centrifugó y el sedimento se lavó 3 veces con 10 ml de buffer de fosfatos pH7.4, para eliminar proteínas solubles propias de la bacteria. Se procedió a la purificación de la proteína utilizando condiciones desnaturalizantes utilizando columnas con perlas de níquel del kit NiNTA de Qiagen (Hilden, Alemania).

Al sedimento celular se le añadieron 5 ml de buffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Tris-Cl, 8 M urea, pH 8.0) y se dejó incubar en agitación suave hasta que se solubilizó todo el sedimento (aproximadamente 1 h), posteriormente se transfirió la suspensión a la columna que contiene las perlas de níquel y se dejó incubar por 2 horas a 4°C en un agitador de 360°C tipo rostizador, pasado este tiempo se procedió a eliminar por gravedad el líquido y se continuó con los lavados añadiendo buffer C (buffer B a pH 6.3 y 15 mM de imidazol), se realizaron tres recambios de buffer c y se dejó incubando 15 minutos cada uno, un cuarto recambio se realizó y se dejó

incubando toda la noche, un último recambio de buffer C se realizó al día siguiente. Se procedió a eluir la proteína quimérica utilizando el buffer D (buffer B pH 5.9 con 15 mM de imidazol), una vez que se eliminó por completo el buffer de lavado se le añadió 1 ml de buffer D y se dejó incubando 5 minutos en agitación, y se procedió a recuperar la fracción número 1, siguiendo este procedimiento se recuperaron 20 fracciones las cuales se analizaron por medio de un gel de electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. La diálisis de la proteína se llevó a cabo por medio de un buffer de replegamiento (500 mM NaCl, 20 mM Tri-Cl, 20% glicerol) el cual contenía urea 2M, cada recambio durante la diálisis se realizó sin urea recambiando solamente 500 ml del buffer de esta manera la concentración de urea disminuyó al 50% de su concentración aproximadamente, se realizaron 6 recambios y se mantuvo el pH de los buffers siempre a pH 5.5 para evitar la precipitación de la proteína quimérica. La proteína dializada se cuantificó por medio del método de Bradford y se utilizó para procedimientos posteriores.

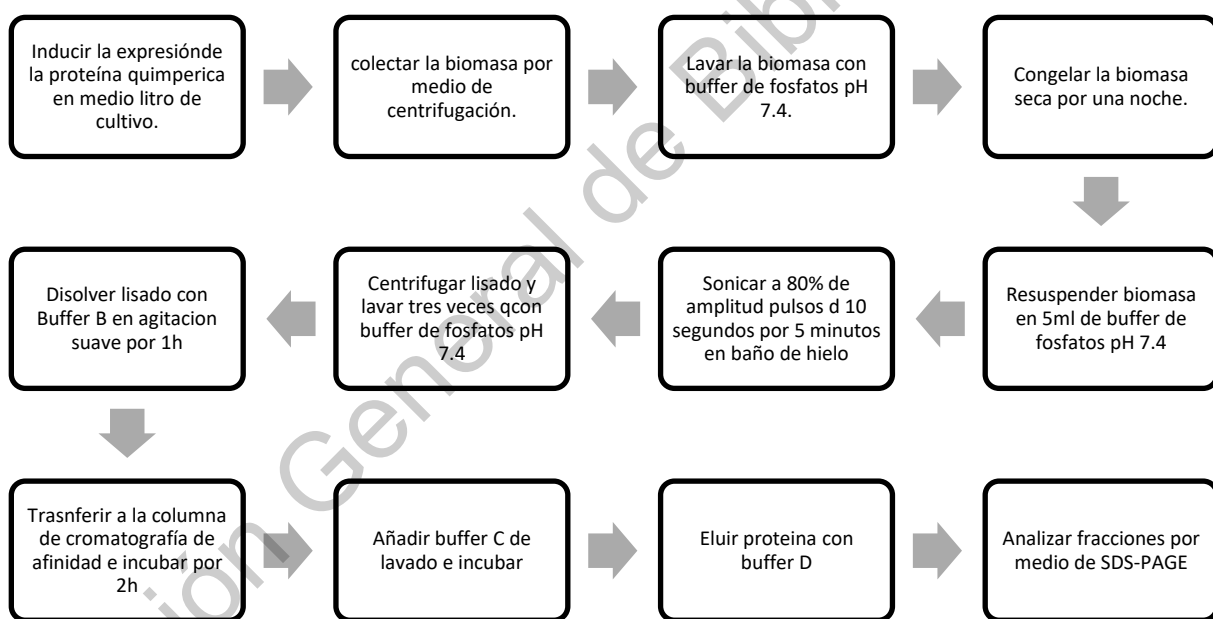


Figura 5. Diagrama del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína quimérica.

Etapas 3

Identificación de los péptidos en la proteína quimérica por medio de inmunoelectrotransferencia.

Con la finalidad de confirmar si los 21 péptidos se encuentran en la proteína quimérica se llevó a cabo una inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos

específicos contra cada uno de los péptidos individuales. Se llevó a cabo inicialmente una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12% con un peine preparativo en donde se cargaron 100 µg de proteína, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se confirmó la correcta transferencia tiñendo la membrana con rojo Ponceau al 0.2%. Posteriormente se cortaron tiras de la membrana de 0.5 cm y se colocó cada una en solución de bloqueo elaborada con buffer TBS-T (20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) con leche baja en grasa al 5%. Se dejó incubar durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se eliminó el buffer de bloqueo y se colocó a incubar durante una hora con el anticuerpo primario. Los sueros de conejos que contenían los anticuerpos primarios específicos contra cada péptido se diluyeron en TBS-T con leche al 2%, se colocaron en incubación a temperatura ambiente en agitación. Pasado el tiempo de incubación, las tiras se lavaron tres veces con TBS-T 20 minutos con agitación fuerte. Se realizó un segundo bloqueo durante una hora en agitación con TBS-T con leche al 5% después de eliminar los anticuerpos primarios, se descartó la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo de bovino secundario anti-IgG de conejo en una dilución 1:5000 en TBS-T con leche al 2%. Las tiras se incubaron durante 1 hora y se lavaron siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Se eliminó el buffer del último lavado y se revelaron con utilizando luminol ECL Amersham (GE healthcare, Chicago, EUA), las membranas fueron reveladas en un cuarto oscuro usando placas radiográficas exponiéndolas por intervalos de 15 segundos, 1 minuto y 5 minutos.

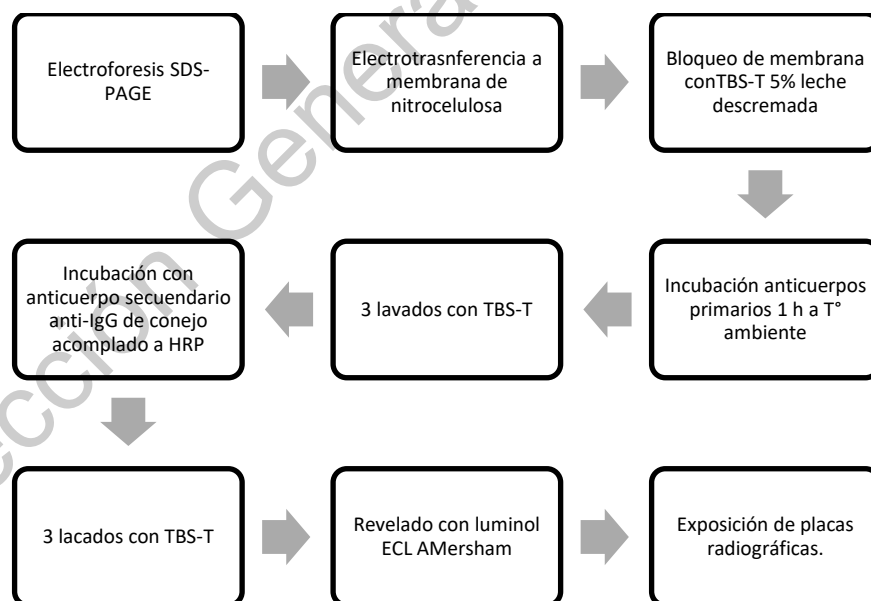


Figura 6. Diagrama del proceso para la identificación de los péptidos en la proteína quimérica.

Etapas 4

Obtención de anticuerpos de bovino anti-proteína quimérica

Antes de iniciar con esta etapa experimental fue necesario realizar el diagnóstico inmunológico a diferentes bovinos con la finalidad de seleccionar los individuos que no hayan sido expuestos previamente a la babesiosis. Se muestrearon alrededor de 18 bovinos de diferentes ranchos del estado de Querétaro, se tomaron muestras de la vena coccígea en tubos vacutainer sin aditivos (tapón rojo) una vez coagulada la muestra se procedió a la separación del paquete celular y el coagulo por medio de centrifugación. El suero fue evaluado por medio de inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia de anticuerpos anti-*B. bigemina* en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales UAQ y para anticuerpos anti-*B. bovis* en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, (Cuernavaca, Morelos). El procedimiento para llevar a cabo el diagnóstico fue llevado a cabo de acuerdo a la metodología que describe más adelante en esta sección.

Para la obtención de anticuerpos de bovino anti-proteína quimérica se prepararon vacunas con 100 µg/ml del antígeno de acuerdo a la siguiente metodología. Una vez cuantificada la proteína se ajustaron los volúmenes para agregar a un tubo cónico de 50 ml lo suficiente para preparar todas las dosis necesarias para tres inmunizaciones para dos bovinos. La dosis de la vacuna se preparó en una proporción 50% de proteína resuspendida en buffer de replegamiento pH 5.5 y 50% de adyuvante Montanide ISA 61VG, se utilizó un homogeneizador para emulsificar la mezcla agregando paulatinamente gota a gota la suspensión de proteínas al adyuvante, se dejó emulsificando a máxima velocidad por intervalos de cinco minutos, en cada intervalo se tomó una muestra para observarla al microscopio, una vez que las partículas de la fase dispersa tuvieron un tamaño uniforme menor a una micrómetro se procedió a alícuotar las dosis y almacenarlas a 4°C hasta su aplicación.

Se utilizaron dos bovinos de raza charoláis y dos beef master de aproximadamente 16 meses de edad, dos fueron inmunizados con la proteína quimérica mientras que los otros dos fueron inmunizados únicamente con buffer de replegamiento y adyuvante. La inmunización se realizó por vía subcutánea en la tabla del cuello cerca del ganglio pre-escapular, la vacuna se administró en intervalos de 21 días tomando muestra de sangre sin anticoagulante previo a cada inmunización, la última muestra se tomó 10 días después de la tercera inmunización. El suero se separó del paquete globular por medio de centrifugación, se filtró con una membrana con poro de 0.22 µm de diámetro, se realizaron alícuotas y se almacenaron en

congelación a -20°C hasta su utilización. Los procedimientos de estabulación, sujeción y manejo general de los animales se encuentran descritos en la sección de Apéndices en el Apéndice I, el uso de animales en este proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Autónoma de Querétaro (número 27FCN2016).

La producción de anticuerpos se evaluó por medio de ELISA. Se utilizaron microplacas de 96 pozos de poliestireno de alta unión las cuales fueron forradas con 5 µg de la proteína quimérica resuspendida en buffer de carbonatos 0.2 M a pH 9.2 en un volumen total de 100 µl. Las placas se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C y al día siguiente se retiró el antígeno realizando tres lavados con Buffer de fosfatos pH 7.2 con 0.5% de Tween 20 (PBS-T). Las placas se bloquearon con una solución de PBS-T y leche al 5% durante una hora a 37°C y se les realizaron tres lavados con PBS-T. Los anticuerpos primarios fueron evaluados haciendo diluciones seriadas de los sueros de los bovinos inmunizados con la finalidad de titular los anticuerpos. Los anticuerpos primarios se incubaron por una hora a 37°C y se retiraron de la placa lavando tres veces con PBS-T. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de bovino hecho en conejo conjugado a peroxidasa de rábano, el cual se usó en una dilución 1: 2,500, se incubó por una hora a 37 °C y se retiró con tres lavados con PBS-T. La placa se reveló utilizando ortofenilendiamina y peróxido de hidrógeno, se incubó en oscuridad hasta la primera lectura a los 15 minutos y se tomaron lecturas a los 20 y a los 30 minutos después de la adición del sustrato. Las placas se leyeron en un lector de microplacas a 450 nm de longitud de onda (Bio-Rad, Hercules, EUA).

Etapas 5

Evaluación de los anticuerpos anti-proteína quimérica para reconocer los antígenos nativos de *B. bigemina*.

Con la finalidad de confirmar si los anticuerpos que fueron generados por las inmunizaciones con la proteína quimérica son capaces de reconocer los antígenos nativos de *B. bigemina* se llevaron a cabo inmunofluorescencias indirectas utilizando como antígeno sangre infectada con *B. bigemina* cepa Puerto Rico proveniente de cultivo. Las laminillas se fijaron con acetona fría por 20 minutos y se dejaron secar al aire, para el ensayo se utilizaron sueros pre-inmunización y sueros post-inmunización de los bovinos vacunados con la proteína quimérica, los sueros se diluyeron a una proporción 1:250 y se incubaron en cámara húmeda por 1 h, posteriormente se lavaron los frotis con PBS-T y se dejaron secar al aire. Se utilizó un anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de bovino acoplado a Alexa 488 en una dilución 1:1,500, a la dilución del anticuerpo secundario se le añadió DAPI para

teñir los núcleos a una concentración de 1 µg/ml, las laminillas se incubaron durante 1 h en una cámara húmeda y se retiró el anticuerpo secundario por medio de tres lavados con PBS-T y nuevamente se dejaron secar al aire. Las laminillas se leyeron con un microscopio de plataforma invertida modelo DMi8 de la marca Leica (Wetzlar, Alemania).

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-proteína quimérica para reducir la formación de cigotos *in vitro*, se realizaron ensayos de inducción de fases sexuales, los cultivos se adicionaron con sueros de bovinos vacunados con la proteína quimérica. Las concentraciones y características de cultivo, así como las condiciones de incubación, purificación y lectura de los resultados se llevaron a cabo siguiendo el protocolo que se describió anteriormente.

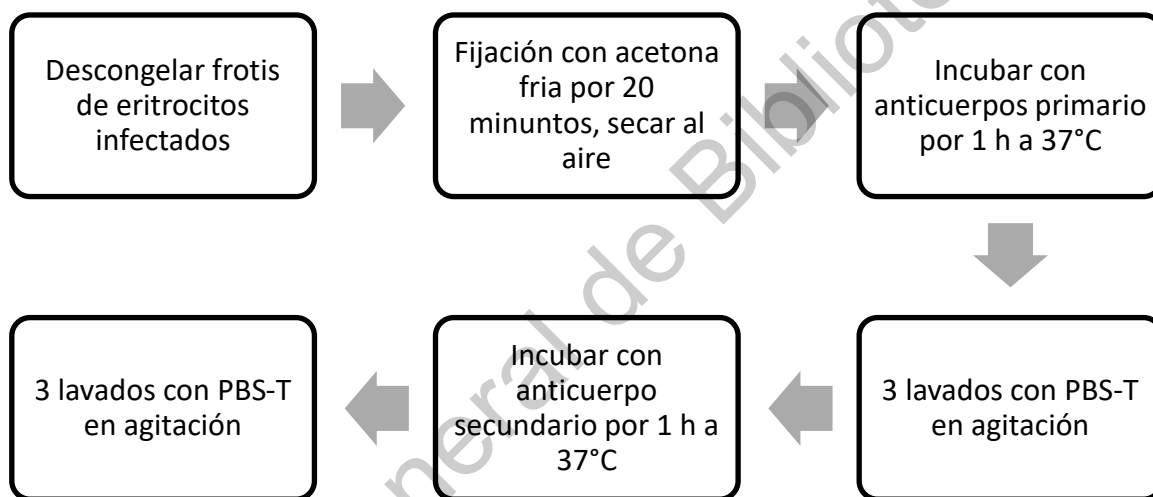


Figura 7. Diagrama del proceso para identificación de las proteínas nativas de *B. bigemina* por medio de inmunofluorescencia indirecta.

Resultados

Etapa 1:

Ensayos de neutralización de la invasión de *B. bigemina* al eritrocito bovino de la fusión de fases sexuales.

Se utilizó la Puerto Rico de *B. bigemina* para esta etapa experimental. Los anticuerpos anti-*B. bigemina* utilizados en este proyecto fueron capaces de reconocer las proteínas nativas del parásito por medio de inmunofluorescencia indirecta en eritrocitos infectados con una cepa mexicana de *B. bigemina*. Aunque los péptidos se diseñaron diseñados en regiones conservadas en cepas de México y el mundo se decidió amplificar los genes de cada proteína y llevar a cabo una secuenciación para asegurarnos que las secuencias de los péptidos estuviesen presentes en la cepa utilizada para este ensayo. Como se esperaba los péptidos se encuentran conservados también en esta cepa en la cepa Puerto Rico de *B. bigemina*.

Se llevaron a cabo ensayos de neutralización con la finalidad de saber si los anticuerpos generados previamente contra los epítomos B predichos de las proteínas AMA-1, MIC-1, SBP-4, RAP-1 α 1 y RON2 son capaces de bloquear la invasión de *B. bigemina* al eritrocito bovino.

Los resultados de los porcentajes de parasitemia de los cultivos adicionados con sueros inmunes mostraron una diferencia significativa en comparación con los cultivos adicionados con sus respectivos sueros pre-inmunización, a excepción de los péptidos AMA-1C y RAP-T1 en los cuales no hubo una diferencia estadísticamente significativa. Los anticuerpos específicos contra los péptidos de las proteínas de *B. bigemina* lograron inhibir en diferentes porcentajes la invasión del parásito a la célula hospedera en cultivo. Los anticuerpos que presentaron una disminución mayor del porcentaje de parasitemia fueron los anticuerpos contra el péptido B de la proteína RAP-1 α 1 con un porcentaje de células infectadas de 1.04%, seguido por el péptido A de la proteína MIC-1 el cual mostro un porcentaje de células infectadas de 1.18%, ambos en comparación con los cultivos con suero pre-inmunización donde los porcentajes de células infectadas fueron de 4.22% y 3.9% respectivamente. Los porcentajes de parasitemia más altos, es decir, los anticuerpos que bloquearon en menor medida el proceso de invasión fueron el péptido B de la proteína MIC-1 y el péptido D de la proteína AMA-1. Los resultados de los porcentajes de células infectadas se muestran en la Figura 8. Los anticuerpos contra los péptidos AMA-1C y RAP-1 α 14 no presentaron diferencia estadísticamente significativa, quizá se deba al hecho de que presentan una

desviación estándar muy amplia, en el caso de los anticuerpos anti-RAP-1 α 1T1 el cultivo adicionado con suero pre-inmunización presentó menor parasitemia que el contenía anticuerpos, por lo que no se consideró para evaluaciones posteriores.

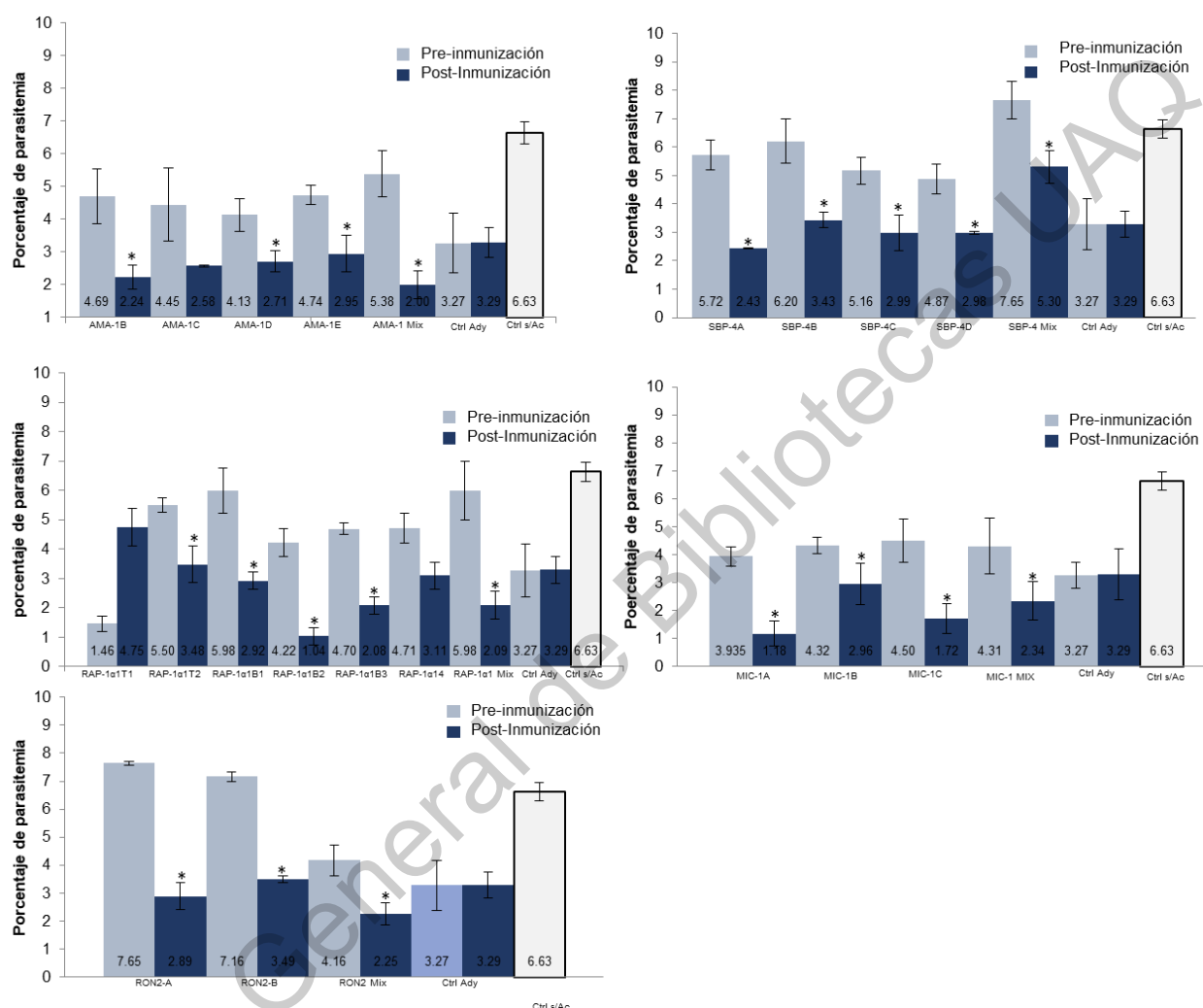


Figura 8. Comparación del porcentaje de parasitemia entre cultivos adicionados con suero de conejo antes y después de la inmunización con péptidos de proteínas de *B. bigemina*. Los datos se analizaron haciendo comparaciones de medias entre los sueros pre-inmunización y post-inmunización, los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa.

Adicionalmente se evaluó si los anticuerpos contra dos péptidos que forman parte de la proteína HAP2 son capaces de inhibir la formación de cigotos *in vitro*. Se evaluaron sueros de conejo inmunizados con los péptidos 2 y péptido 3 de la proteína HAP2. En este ensayo se observó la formación de cigotos en los cultivos controles sin anticuerpos alrededor de las 36 horas de cultivo. Acto seguido se separaron tanto las fases sexuales como los cigotos de *B. bigemina* por medio de

un gradiente de densidad con Percoll, se determinó el número de células, tanto cigotos como fases sexuales a lo largo de los frotis teñidos y con estos se calculó el porcentaje de inhibición de cigotos. De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa en la formación de cigotos en los cultivos adicionados con anticuerpos anti-HAP2 en comparación con el cultivo adicionado con el suero control. Los cigotos formados en los cultivos adicionados con anticuerpos solo alcanzaron 26.34% y 26.70% para el péptido 2 y el péptido 3 respectivamente (Figura 9A), tomando como el 100% el total de cigotos formados en el cultivo control.

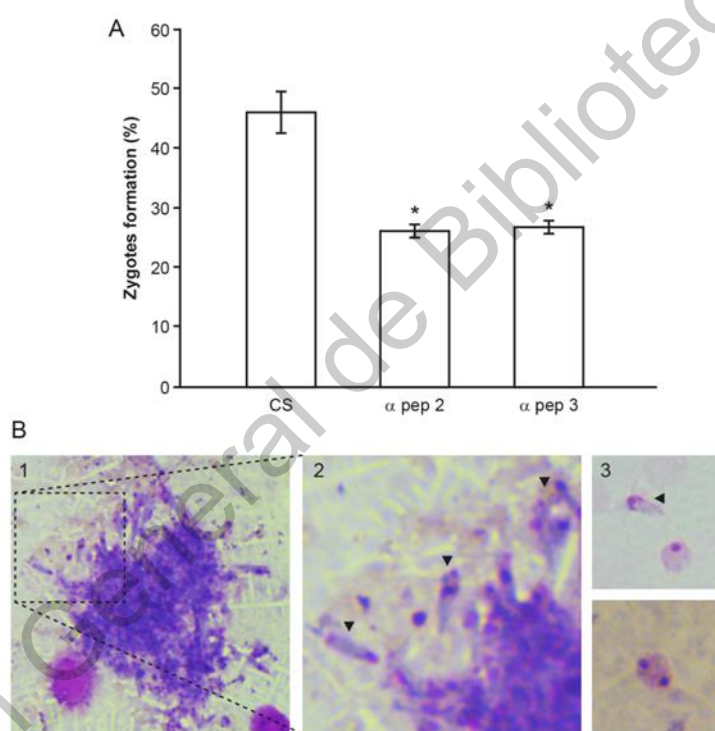


Figura 9. Inhibición de formación de cigotos usando anticuerpos anti-HAP2.

A. Porcentaje de cigotos en cultivos con anticuerpos contra péptidos inmunogénicos de HAP-2, B. Agregados de estadios sexuales en frotis teñido con Giemsa preparado a partir del cultivo adicionado con anticuerpos anti-péptido 2 HAP2, C. Magnificación de la imagen B, se pueden observar gametos no apilados (puntas de flechas). D. Cigotos observados en frotis teñidos con Giemsa a partir de cultivos adicionados con suero de conejo inmunizado con adyuvante.

Con los valores que se obtuvieron de los porcentajes de formación de cigotos y de neutralización, se procedió a calcular los porcentajes de inhibición de cada muestra de suero con anticuerpos anti-*B. bigemina*. La figura 10 muestra los porcentajes de inhibición que se calcularon. Como se puede observar los porcentajes de inhibición muy variados, siendo los anticuerpos anti-MIC-1B el menor con 31.78% de inhibición y el máximo los anticuerpos anti-RAP-B2 con 74.86% de inhibición. Debido a que todos los péptidos presentaron porcentajes de inhibición se decidió incluirlos en el diseño de la proteína quimérica con la justificación de que en la mayoría de los casos la mezcla de los anticuerpos tuvo un efecto aditivo. De la misma manera se decidió incluir al péptido AMA-1C en el diseño aunque los ensayo de neutralización no haya presentado diferencias estadísticas. El péptido RAP-T1 no fue considerado debido a los resultados obtenidos donde el cultivo adicionado con suero pre-inmunización mostró un menor número de eritrocitos infectados que el cultivo con anticuerpos anti-RAP-1 α 1, aunque estos resultados podrían atribuirse al efecto del suero de ese individuo *per se*, en ese momento no logramos determinar si los anticuerpos contra el péptido en cuestión son capaces de neutralizar la invasión del parásito.

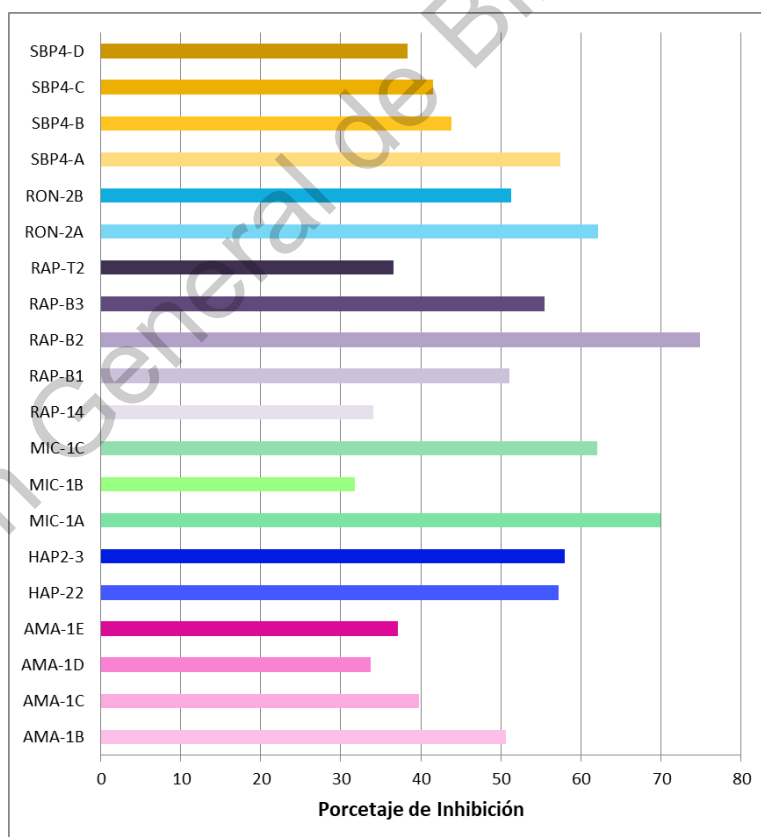


Figura 10. Porcentajes de inhibición de los ensayos de neutralización de la invasión al eritrocito bovino y de la fusión de gametos.

Etapa 2:

Ensamblaje del gen quimérico

Una vez determinado el porcentaje de inhibición de los anticuerpos contra cada péptido inmunogénico se comenzó el diseño y ensamblaje del gen quimérico. Se analizaron más de 20 versiones de proteínas quiméricas. Las causas más comunes de rechazo de las diferentes versiones fueron la generación de nuevos epítomos yuxtapuestos, los cuales presentaban puntajes de selección generados por los algoritmos muy altos, incluso mayores que los que presentaban los péptidos originales de los cuales se formaron esos nuevos epítomos. Para omitir la formación de esos epítomos se decidió utilizar entre péptidos con esta tendencia incluir residuos de glicina por ser el aminoácido con cadena lateral más sencilla y evitar que aminoácidos con cadenas laterales más complejas contribuyeran a la formación de estos nuevos epítomos.

Los análisis de predicción de epítomos B determinaron la permanencia de los epítomos previamente predichos. La versión 19 de la proteína quimérica fue la que presento menor número de epítomos yuxtapuestos siendo dos solamente entre los péptidos B y A de la proteína RON2 y los cuales se eliminaron *in silico* con la adición de glicinas entre estos péptidos (anillos en color rojo, Figura 11). De ahora en adelante a través del texto nos referiremos a la proteína como CHPV1.9 y al gen que la codifica como *chpv1.9* (**Ch**imeric **P**rotein **V**ersion 19).

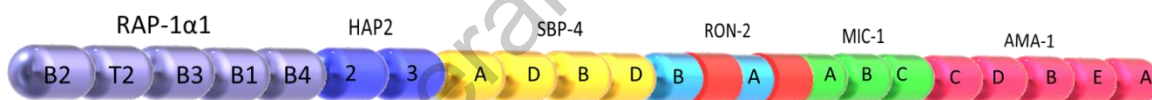


Figura 11. Esquematización de la proteína quimérica CHPV1.9.

En morado se representan los péptidos de la proteína RAP-1α1 (cinco péptidos), en azul la proteína HAP2 (dos péptidos), en amarillo la proteína SBP-4 (cuatro péptidos), en turquesa la proteína RON-2 (dos péptidos), en verde la proteína MIC-1 (tres péptidos) y en rosa la proteína AMA-1 (cinco péptidos). Los anillos de color rojo representan residuos de glicinas adicionados para eliminar la formación de epítomos yuxtapuestos.

Se realizó la búsqueda de los péptidos en las secuencias de aminoácidos predichas a partir de los resultados experimentales de la secuenciación de la etapa 1 (confirmación de la presencia de péptidos en cepa Puerto Rico de *B. bigemina*). Una vez con la secuencia de nucleótidos se comenzó a ensamblar en el orden adecuado, obteniendo una secuencia de nucleótidos de 1107 pb.

La secuencia de nucleótidos fue sometida a análisis bioinformáticos para optimizar el uso codones preferenciales debido a que esta proteína fue expresada en *E. coli*.

La secuencia de nucleótidos del gen quimérico se mandó a sintetizar y se obtuvo clonada en el plásmido pUC57 por medio de extremos de restricción de *EcoRV*, este ADN fue utilizado como molde para las posteriores amplificaciones en los experimentos de clonación.

Clonación del gen quimérico *chpv1.9*

Se realizó la amplificación del gen *chpv1.9* por medio de PCR utilizando una enzima de alta fidelidad utilizando los oligonucleótidos descritos en la sección de metodología. Se logró observar un fragmento del tamaño esperado (1107 pb) el cual se muestra en la Figura 12. Una vez purificado el producto de PCR y se procedió con la clonación en el plásmido pENTR/D-TOPO. Para este procedimiento se cuantificó el producto de PCR y se procedió a calcular la relación molar inserto: vector utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{kb \text{ de inserto}}{kb \text{ de vector}} \times ng \text{ de vector} = ng \text{ de inserto}$$

El resultado obtenido para dicha fórmula es la cantidad de ADN del inserto necesario para la clonación en una relación molar 1:1, por lo que el resultado se multiplicó por 3.

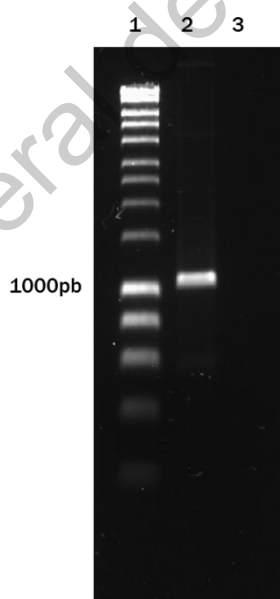


Figura 12. Amplificación del gen quimérico *chpv1.9*.

Carril 1: Marcador de talla molecular 1Kb (Bioline, Núm. Cat. Bio-33025); Carril 2: amplificación del gen *chpv1.9*; Carril 3: control negativo.

Una vez llevada a cabo la reacción de clonación, se tomó el producto de la reacción y se adicionó a células competentes y se procedió a transformarlas. Dieciséis de las

clonas obtenidas de la transformación con el “clon de entrada” (pENTR/D-TOPO) se analizaron para determinar si contenían el gen *chpv1.9*. Lo anterior se llevó en primer lugar por medio de una PCR de colonia usando los oligonucleótidos descritos anteriormente. Se observó una banda cercana a las 1000 pb en trece de las quince colonias analizadas (Figura 13).

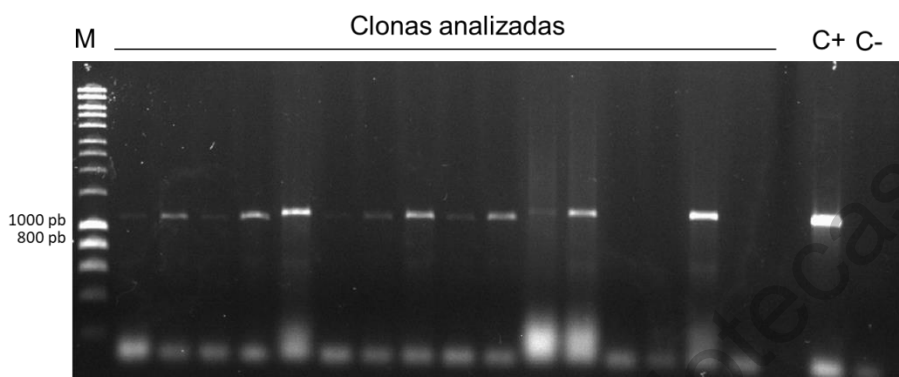


Figura 13. Análisis de colonias transformantes con pENTR/D-TOPO por medio de PCR.

Se realizó una reacción de colonia. Se analizaron las colonias transformantes por medio de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para Chpv19. M: Marcador de Talla molecular 1Kb, C+: Control positivo, C-: Control Negativo.

Antes de proceder en la metodología se realizó un análisis de restricción del “clon de entrada” con la finalidad de confirmar por un segundo método la presencia del gen de interés. Se extrajo ADN plasmídico de cinco clonas y se realizó una digestión del plásmido con la enzima *EcoRI*, los resultados se analizaron en un gel de electroforesis de agarosa al 1%. Se escogió esta enzima ya que en la secuencia del gen de interés existen dos sitios de restricción para esta enzima, confirmando la presencia de *chpv1.9* en el clon de entrada. El resultado *in silico* de la digestión mostró tres fragmentos de ADN, uno de 111 pb correspondiente a los dos cortes dentro del gen y uno más de 2,756 pb del cual el sitio de corte se encuentra en la secuencia del vector (Figura 14). Adicionalmente se realizó una digestión con las enzimas *Ascl* y *NotI* como lo sugieren los procedimientos del fabricante, la digestión con estas dos enzimas permite la liberación del inserto, por lo que debería observarse en el caso de “clon de entrada” de *chpv1.9* un fragmento de aproximadamente 1,107 pb y un fragmento de 2,600 pb correspondientes al inserto y al vector respectivamente. Sin embargo, en los resultados obtenidos de este procedimiento se observó solamente un fragmento cercano a las 3,500 pb lo que corresponde a la suma del inserto y el vector juntos. Se asumió que alguna de las dos enzimas utilizadas en este procedimiento no se encontraba en condiciones óptimas de funcionalidad, no se realizaron pruebas adicionales para confirmar lo

anterior. Los resultados experimentales de la digestión con la enzima *EcoRI* confirman la presencia del gen *chpv1.9* en el clon de entrada.

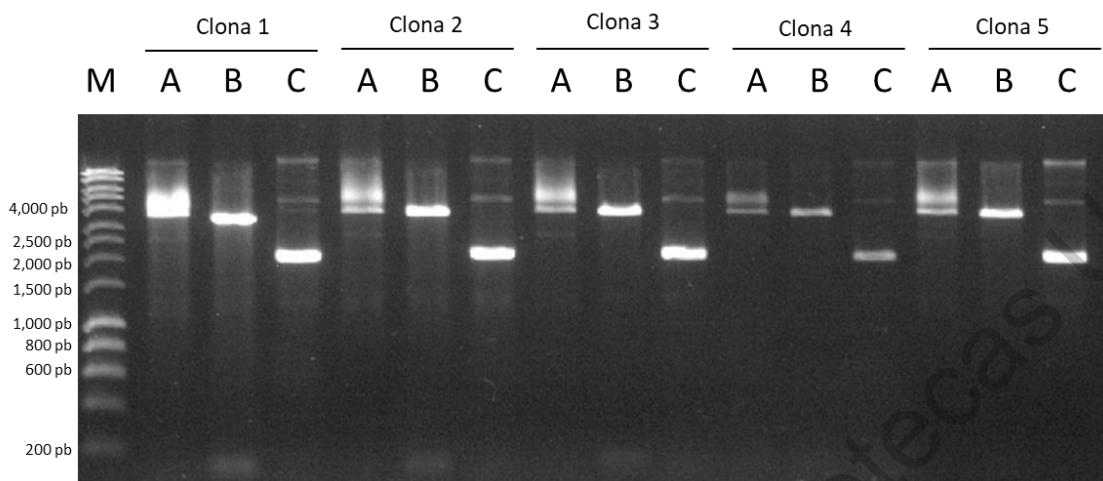


Figura 14. Análisis de restricción para confirmar la presencia del gen *chpv1.9* en el plásmido pENTR/D-TOPO.

1: Marcador de talla molecular 1Kb (Núm. Cat. Bio-33025); A: Digestión plásmido con *Ascl* y *NotI*; B: Digestión plásmido con *EcoRI*; C: Plásmido sin cortar.

El plásmido de la clona 3 fue seleccionado para proceder con la recombinación LR y subclonar el gen en el plásmido de expresión. El plásmido del “clon de entrada” se resuspendió en buffer TE pH 8.0, se utilizaron mismas concentraciones de ambos plásmidos para la subclonación y se incubaron por 4 horas a 23°C una vez que se añadió la LR recombinasa. El producto de recombinación se usó para transformar la cepa DH5α Library High Efficiency con 2µl del producto de recombinación y se cultivaron en agar LB con 100µg/ml de ampicilina. Se obtuvieron cerca de 50 clones de las cuales 9 fueron analizadas por medio de dos reacciones de PCR de colonia utilizando por una parte oligonucleótidos específicos del gen *chpv1.9* y por otra parte el oligonucleótido forward del promotor 7 (secuencia que es parte del plásmido pDEST17) y el reverse específico del gen *chpv1.9*, (Figura 12). Se logró observar una banda de aproximadamente 1,000 pb de que corresponde al tamaño del amplicón esperado, en el caso del amplicón en el cual se utilizó cebador del promotor T7 se observa un amplicón ligeramente más grande debido a que el promotor se encuentra cerca de 100 pb río arriba del sitio de donde comienza el gen.

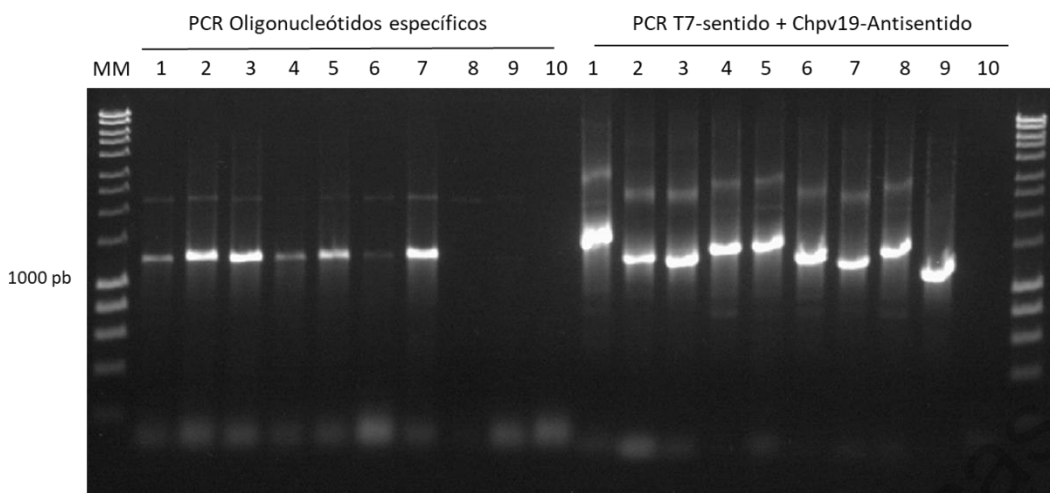


Figura 15. Análisis por medio de PCR de colonia de las clonas obtenidas de la transformación con el plásmido pDEST-17.

MM: Marcador de talla molecular 1KB (Núm. Cat. Bio-33025), 1-9 clonas analizadas, 10: Control negativo.

Nuevamente como estrategia para confirmar por un segundo método que el plásmido de expresión contiene el gen *chpv1.9* se realizó una digestión enzimática utilizando *EcoRI*. De acuerdo al análisis de restricción realizado *in silico* se esperaban fragmentos de 4, 717 pb, 2015 pb y 111 pb. En la figura 16 podemos observar el ADN plasmídico obtenido de cinco clonas transformadas, los carriles señalados con la letra A muestran el ADN plasmídico digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, mientras que los carriles señalados con la letra B muestra el ADN plasmídico integro (no digerido) de cada clona. Se observa tres fragmentos de tamaños esperados, el peso del fragmento de menor tamaño corresponde con la doble digestión que ocurre dentro de la secuencia del gen como se describió anteriormente, por lo que esto confirma el éxito de la recombinación y la presencia del gen *chpv1.9* en el plásmido de expresión.

Antes de proceder a la expresión de la proteína fue necesario remitir a secuenciación el ADN plasmídico de las clonas analizadas en los párrafos anteriores con la finalidad de confirmar que el marco de lectura abierto del gen estuviera en la correcta posición. El servicio de secuenciación fue llevado a cabo por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato) por medio del método Sanger en electroforesis capilar. El electroferograma obtenido como resultado de la secuenciación fue analizado minuciosamente y editado por medio del programa Gentle. Las secuencias ensambladas fueron alineadas con el mismo programa, no se observaron diferencias en los nucleótidos de las secuencias obtenidas experimentalmente en comparación con la secuencia de la construcción. Se logro

confirmar también la correcta posición del marco de lectura abierto (ver apéndice II.), finalmente se realizó una traducción *in silico* del gen completo incluyendo la cola de histidinas situada en el amino terminal de la proteína, prediciendo así un producto del gen *chpv1.9* de aproximadamente 50 kDa, con un punto isoeléctrico teórico que oscila de los 6.7 a los 7.7 (el valor del pI calculado es variable dependiendo de los valores de pK, no hay uniformidad en los valores determinados de pK para cada aminoácido, los valores varían de acuerdo a los obtenidos experimentalmente por diferentes autores). Se seleccionó el ADN plasmídico de la clona 3 para proceder con la estrategia experimental.

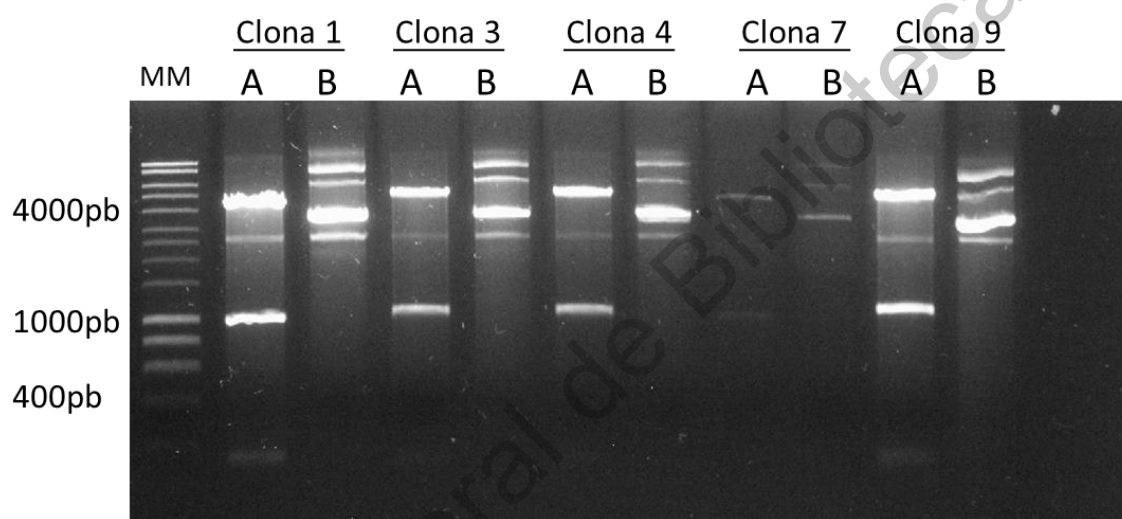


Figura 16. Análisis de restricción del producto de la recombinación LR, de plásmido pDEST-17.

MM: Marcador de talla molecular 1Kb, A: Digestión del plásmido pDEST-17 con nucleasa *EcoRI*, B: Plásmido sin digerir.

Se tomaron 15ng del plásmido de la clona 3 y se utilizó para llevar a cabo una transformación de la cepa BL-21-AI de *E. coli*, esta cepa contiene en su cromosoma el gen que codifica la ARN polimerasa T7 (T7RNAP) lo que la hace capaz de llevar a cabo la expresión de proteínas heterólogas. Una vez transformadas se colocaron en incubación y al día siguiente se obtuvieron aproximadamente 20 clonas transformadas, se seleccionaron 4 de ellas para llevar a cabo un ensayo de piloto de expresión. Las cuatro clonas se colocaron en cultivo y se indujeron con L-Arabinosa, los resultados se observaron por medio de una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes. Los resultados mostraron que las cuatro clonas son capaces de expresar la proteína quimérica CHPV1.9. La figura 17 muestra los resultados de la prueba piloto de expresión de la proteína *chpv1.9*. En la imagen A de la figura 17 se muestran las proteínas contenidas en el sobrenadante

del lisado de las células bacterianas de un cultivo con el inductor (a) y un cultivo sin inductor (b) de cada clona. En la imagen B de la figura 17 se observa el sedimento del mismo lisado celular de igual de un cultivo con inductor (a) y otro sin inductor (b). En el sedimento de lisado celular se observa una banda de aproximadamente 50 kDa de peso molecular que corresponde al peso esperado de la proteína CHPV1.9, esta banda no está presente en los cultivos no inducidos, ni en las muestras del sobrenadante del lisado celular, tampoco se observan en los cultivos controles (imagen c de la figura 17) los cuales son cultivos de la misma cepa de *E. coli* transformada únicamente con pUC19. Estos resultados muestran el éxito en la expresión de la proteína quimérica formada por 21 péptidos de *B. bigemina* en un sistema bacteriano. Cabe resaltar que estos resultados también muestran que la por su naturaleza proteína al ser expresada se deposita en cuerpos de inclusión, lo anterior es el motivo de porque en los geles de electroforesis la observamos en el sedimento del lisado celular, donde se encuentran todas las proteínas. Debido a que la expresión de la proteína es gobernada por la presencia del operón araBAD se procedió a realizar un ensayo con diferentes concentraciones de inductor y diferentes tiempos de incubación, con la finalidad de determinar si es posible regular la expresión de la proteína y obtenerla como proteína soluble en el sobrenadante del lisado celular.

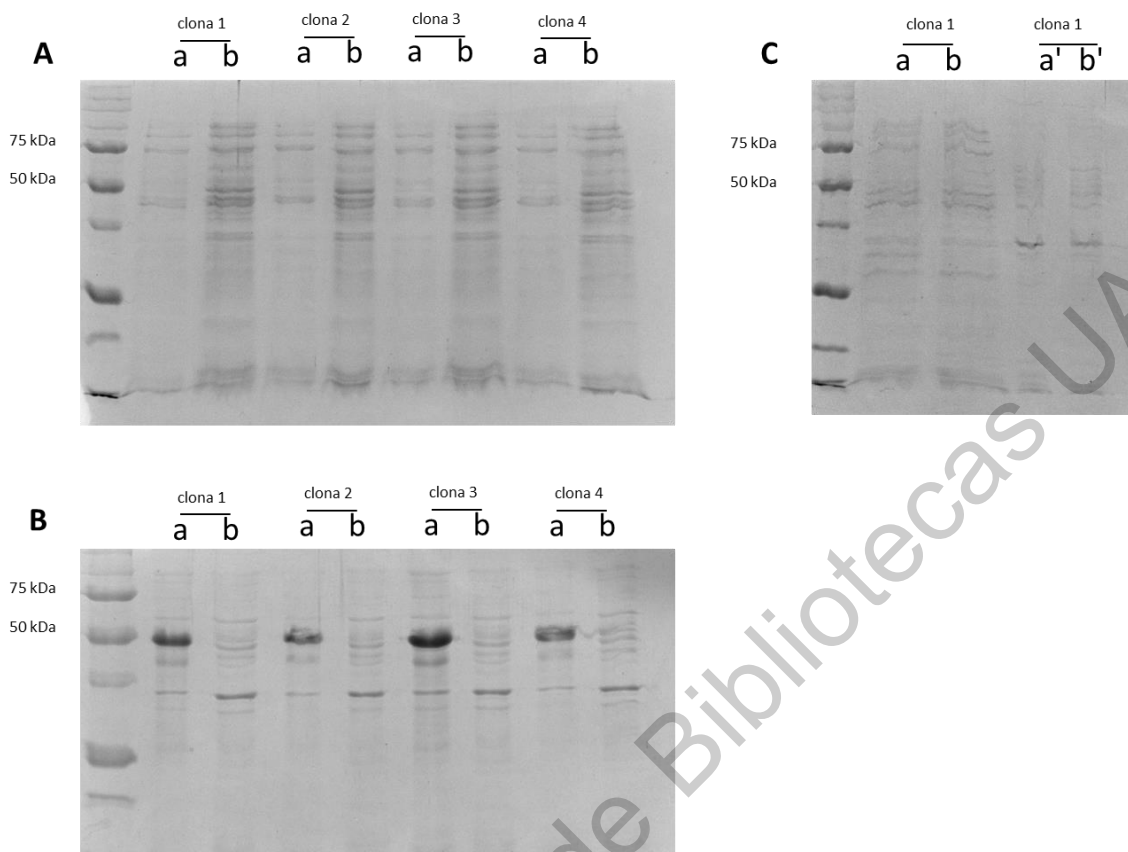


Figura 17. Prueba piloto de expresión de la proteína quimérica.

Después de la inducción y lisis de los cultivos bacterianos se realizaron electroforesis en condiciones desnaturizantes en la cuales se corrieron los cultivos inducidos (a) y los cultivos de las mismas clonas sin inducción (b). Así mismo se corrieron geles de los sobrenadantes (A) y de los sedimentos (B) resultantes de la lisis de cada cultivo, en estos últimos podemos observar una banda cercana a los 50KDa ausente en los cultivos no inducidos, así mismo se usó como control una sola clona de la misma cepa de *E. coli* transformada con el vector pUC19 a cual se realizó el mismo procedimiento (a y a' cultivo inducido, b y b' cultivos no inducidos, a, b y a', b' corresponde al sobrenadante y sedimento después de la lisis celular respectivamente).

La imagen A y B de la figura 18 muestran los resultados de los cultivos inducidos y no inducidos (a y b respectivamente) a cuatro diferentes concentraciones del inductor, se tomaron muestras de los cultivos cada hora, sin embargo, se muestran únicamente los resultados de las muestras colectadas después de 3 horas de cultivo. Se observaron los mismos resultados en todas las muestras a diferentes tiempos y diferente concentración de inductor, la proteína siempre es depositada en cuerpos de inclusión incluso al inicio de la inducción. Por lo anterior se procedió a realizar la purificación de la proteína por medio de cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes.

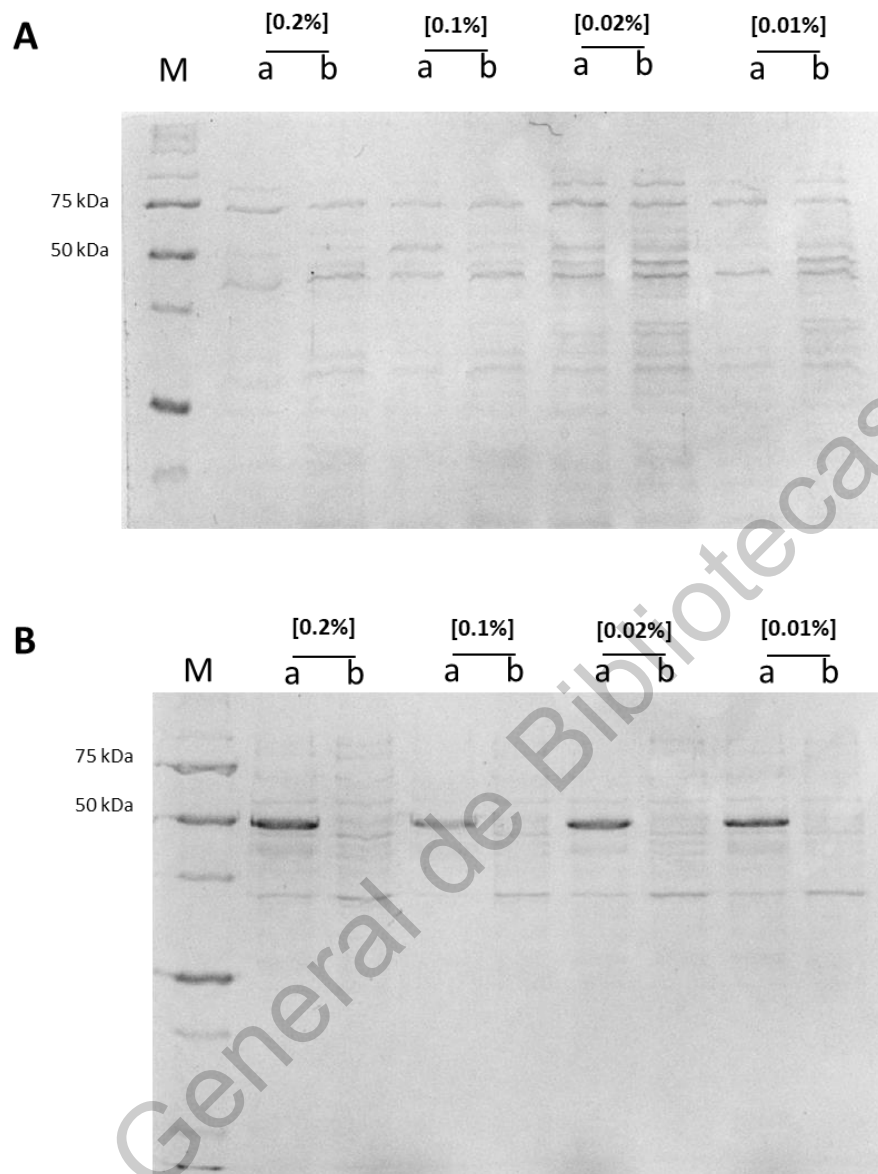


Figura 18. Resultados de expresión de CHPV1.9 a diferentes concentraciones de L-Arabinosa.

El primer intento en la purificación de la proteína quimérica se llevó a cabo con los buffers que se describen la sección de metodología, sin la adición de imidazol, las fracciones de proteína purificada resultantes de este primer ensayo se corrieron en un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se observó la proteína quimérica en el peso esperado, sin embargo, también se observaron proteínas que se incorporaron inespecíficamente. Después de añadir adicional los buffers con

imidazol a una concentración final de 15 mM de imidazol logramos obtener una purificación de la proteína quimérica de mejor calidad (Figura 19). Se analizaron 5 fracciones obtenidas de la purificación las cuales se eluyeron con el buffer D (carriles 2 al 6), al disminuir el pH con el buffer E se observó la presencia de proteínas de diferentes tamaños. Se seleccionaron únicamente las fracciones obtenidas de la elución con el buffer D las cuales fueron dializadas con buffer de replegamiento, posteriormente se utilizaron para preparar las dosis para las inmunizaciones.

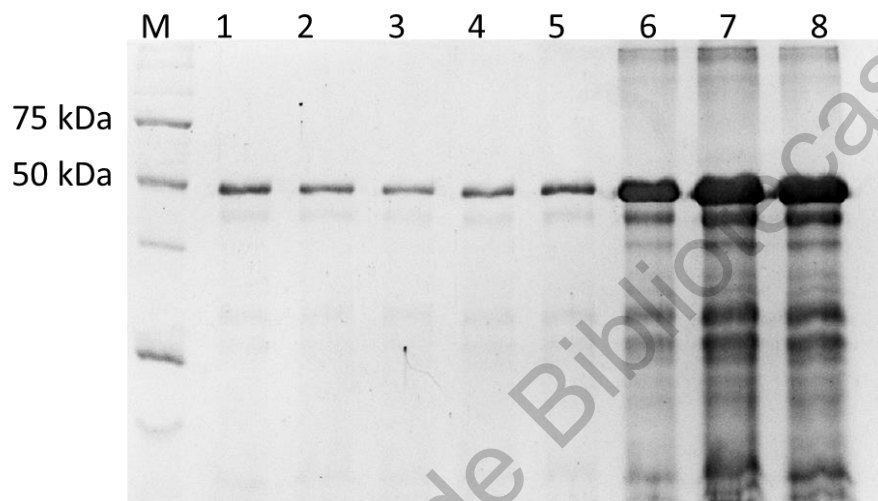


Figura 19. Resultados de la purificación de la proteína CHPV1.9 por medio de cromatografía de afinidad. Se observa en los carriles 1-5 las eluciones llevadas a cabo con buffer D, las eluciones 6, 7 y 8 corresponden a las realizadas con buffer E.

Etapas 3:

Identificación de los péptidos de *B. bigemina* en la proteína quimérica.

Se realizaron inmunoelectrotrasferencias para determinar si cada uno de los péptidos incluidos *in silico* en la proteína quimérica están presentes en la proteína que se expresó experimentalmente. Para este ensayo se utilizaron sueros de conejos que fueron inmunizados individualmente con cada uno de los péptidos (un conejo por cada péptido). Los anticuerpos anti-péptidos de *B. bigemina* lograron reconocer específicamente una proteína cercana a los 50 kDa como se muestra en la figura 20. Esto confirma que la proteína efectivamente está formada por los 21 péptidos de *B. bigemina*, también se logró detectar la proteína con un anticuerpos anti cola de histidinas elaborado por este equipo de trabajo usando un péptido de histidinas dendrimérico (MAP8).

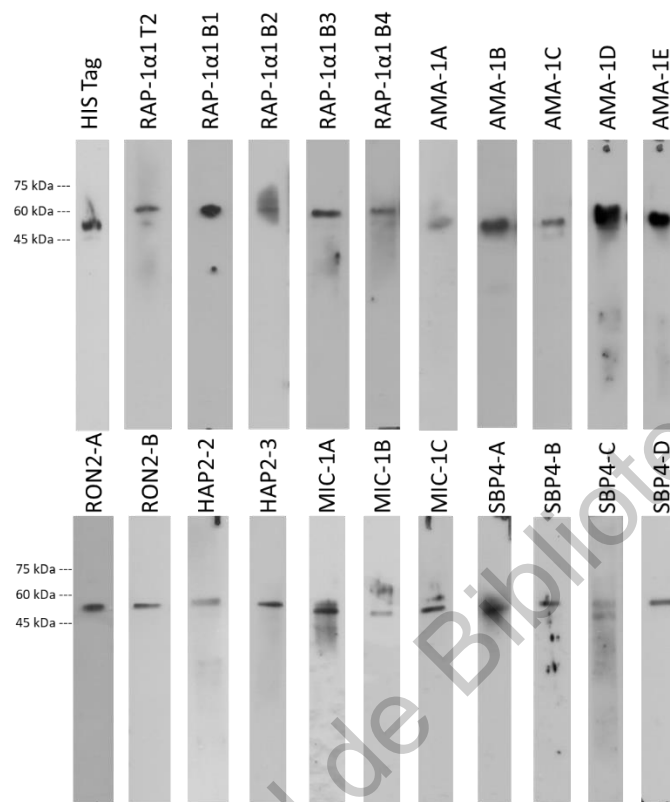


Figura 20. Inmunoelectrotransferencia de la proteína CHPV1.9 con sueros anti-péptidos de *B. bigemina*.

Etapa 4.

Determinación del título de anticuerpos de bovinos anti-CHPV1.9

Se llevo a cabo el diagnóstico por medio de inmunofluorescencia de 18 bovinos localizados en diferentes ranchos del estado de Querétaro, lo anterior para determinar si presentaban anticuerpos anti-*Babesia bigemina* y anti-*Babesia bovis*. La figura 21 muestra los resultados de la inmunofluorescencia de 8 de los 18 individuos diagnosticados, 4 bovinos ubicados en Guadalupe La venta en el municipio del Marqués fueron seleccionados. De acuerdo al registro los bovinos son provenientes del estado de Durango, zona libre del vector de la babesiosis. La imagen E y J corresponden al control positivo y negativo respectivamente, la imagen C, D, H e I corresponden a los 4 bovinos seleccionados para esta etapa experimental, como se puede observar en la imagen a diferencia de los otros individuos, se demostró que los cuatro bovinos seleccionados no presentaron anticuerpos contra *B. bigemina*, de igual forma los resultados de los 4 bovinos provenientes de Durango para anticuerpos anti-*B. bovis* emitidos por el Centro

Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria resultaron negativos.

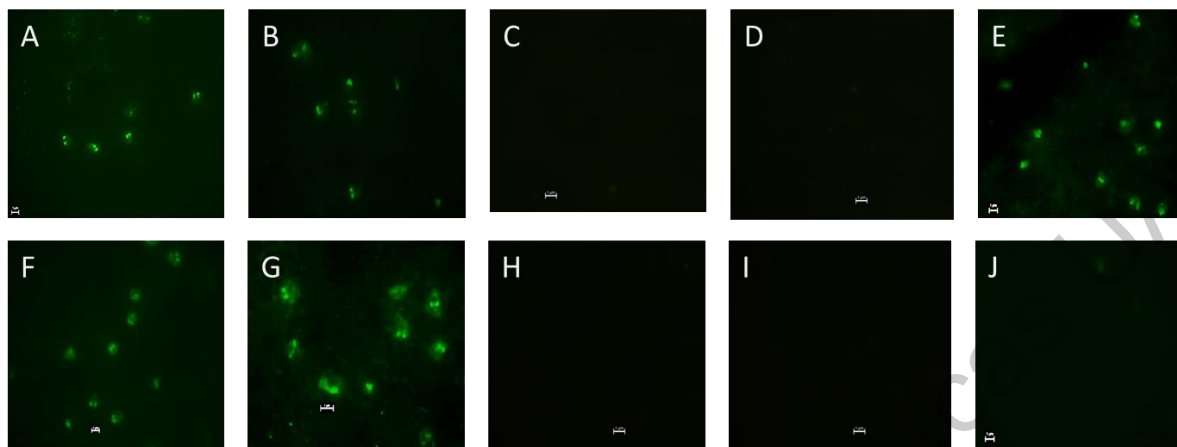


Figura 21. Diagnóstico de anticuerpos anti-*Babesia bigemina* por medio de inmunofluorescencia indirecta.

A, B, F y G: bovinos provenientes de diferentes ranchos del estado de Querétaro; C, D, H e I: bovinos provenientes del estado de Durango; E y J: Control positivo y negativo respectivamente.

El bovino 4811 y 7483 fueron vacunados exitosamente con la proteína CHPV1.9, las vacunaciones se realizaron con 21 días de diferencia. Diez días después de la tercera inmunización se tomaron los sangrados finales. Los sueros de estos animales fueron analizados por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en un formato indirecto (ELISA indirecta) usando como antígeno proteína quimérica CHPV1.9. Las gráficas de la figura 22 nos muestran los resultados de la titulación de los anticuerpos producidos por los bovinos después de la tercera inmunización. Como se puede observar en la gráfica A de la figura 22, logramos ver en color azul la curva de los títulos de anticuerpos del bovino 4811 después de la tercera inmunización, las diluciones de los sueros fueron seriadas al doble comenzando con una dilución 1:100 hasta 1:6,400 (1 y 7 en el eje de las X respectivamente), en color rojo se observa la media de la densidad óptica del suero pre-inmune a las mismas diluciones más tres desviaciones estándar, el valor de la media de la densidad óptica a la dilución más alta se encuentra muy alejada del valor de la densidad óptica de los negativos, sin embargo, se realizó una comparación de medias de muestras no pareadas con nivel de confianza del 95%, donde el valor de la media de la densidad óptica de las muestras pre-inmunización más tres desviaciones estándar es estadísticamente diferente que la media de la densidad óptica del suero post-inmunización. Por otra parte el bovino 7483 (gráfica B, figura 22) presento títulos más bajos, debido a que en la dilución 4 (dilución 1:800)

los valores de las medias de las densidades ópticas de las muestras pre-inmunes y post-inmunes están muy cercanos (gráfica B, figura 22) fue necesario llevar a cabo una comparación de muestras no pareadas, a pesar de que gráficamente se observa el valor de la densidad óptica del suero post-inmune por encima de la media del suero pre-inmune no hay diferencia estadísticamente significativa, los resultados de la comparación de medias de los sueros pre-inmunes y post-inmunes de la dilución 3 muestras diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior quiere decir que, el bovino 4811 alcanzó títulos de anticuerpos hasta 1:6,400, mientras que la respuesta del bovino 7483 fue más baja presentando títulos de anticuerpos hasta 1:400 solamente.

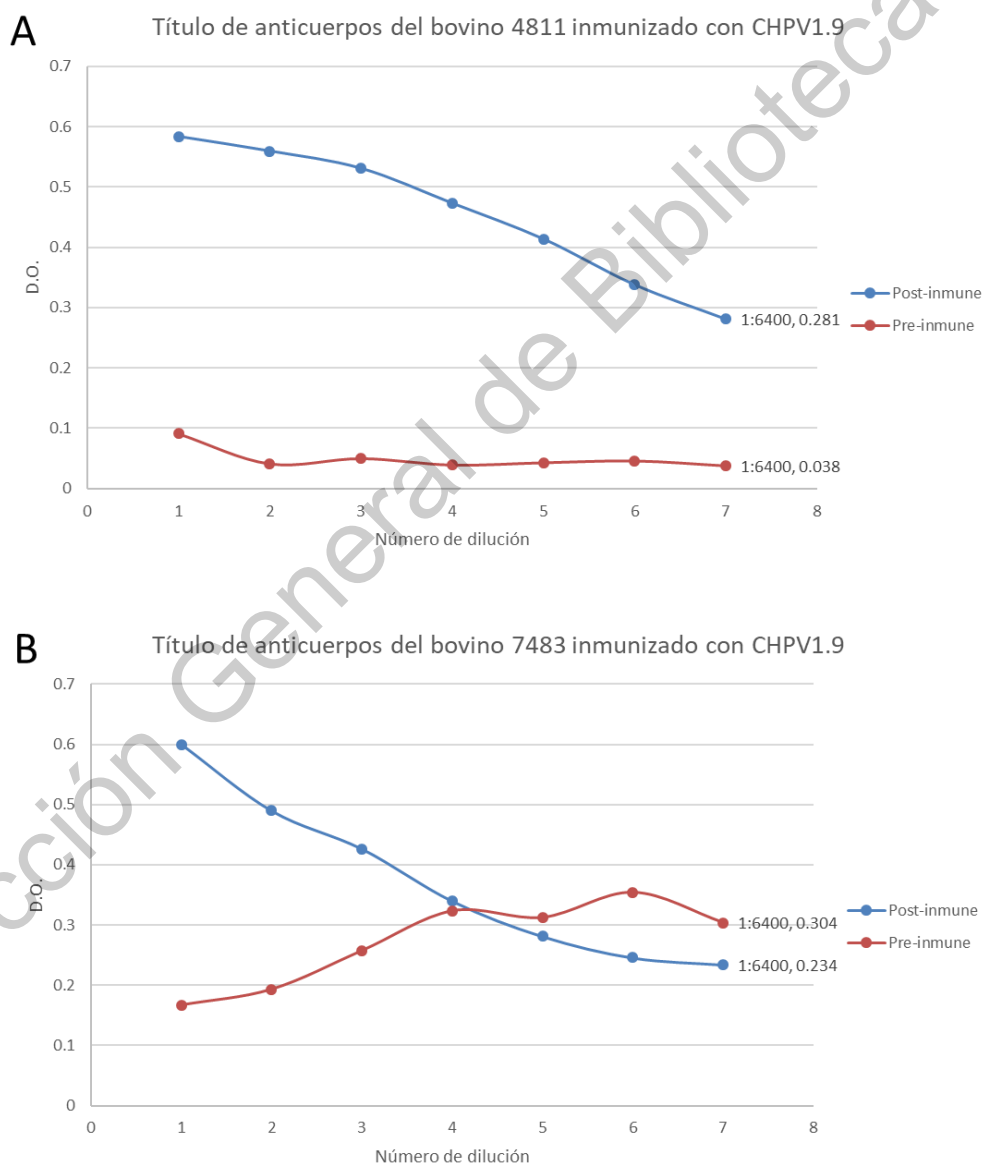


Figura 22. Gráfica de los títulos de anticuerpos de bovinos anti-CHPV1.9.

Etapas 5

Los anticuerpos anti-CHPV1.9 son capaces de reconocer los antígenos en las células de *B. bigemina*

Para determinar si los anticuerpos elaborados contra la proteína quimérica CHPV1.9 son capaces de reconocer los péptidos que se encuentran en las proteínas nativas del parásito se realizaron inmunofluorescencias indirectas utilizando eritrocitos infectados con *B. bigemina*.

La figura 23 muestra los resultados de la inmunofluorescencia indirecta en la que los sueros de bovinos inmunizados con la proteína CHPV1.9 reconocieron a las proteínas nativas de *B. bigemina* en eritrocitos infectados. Se observan los ácidos nucleicos de cada célula teñidos en azul (Hoescht 3342) mientras que las proteínas de *B. bigemina* se observan en color rojo debido a los anticuerpos conjugado con el fluorocromo Texas Red que están unidos a los anticuerpos anti-CHPV1.9. Aunque el bovino 7483 no logró tener un título elevado de anticuerpos se logra observar las células de *B. bigemina* en la preparación.

Debido a que algunos de los péptidos tienen regiones que están presentes en *Babesia bovis* se decidió hacer este mismo ensayo con eritrocitos infectados de *B. bovis*. La figura 24 muestra los resultados.

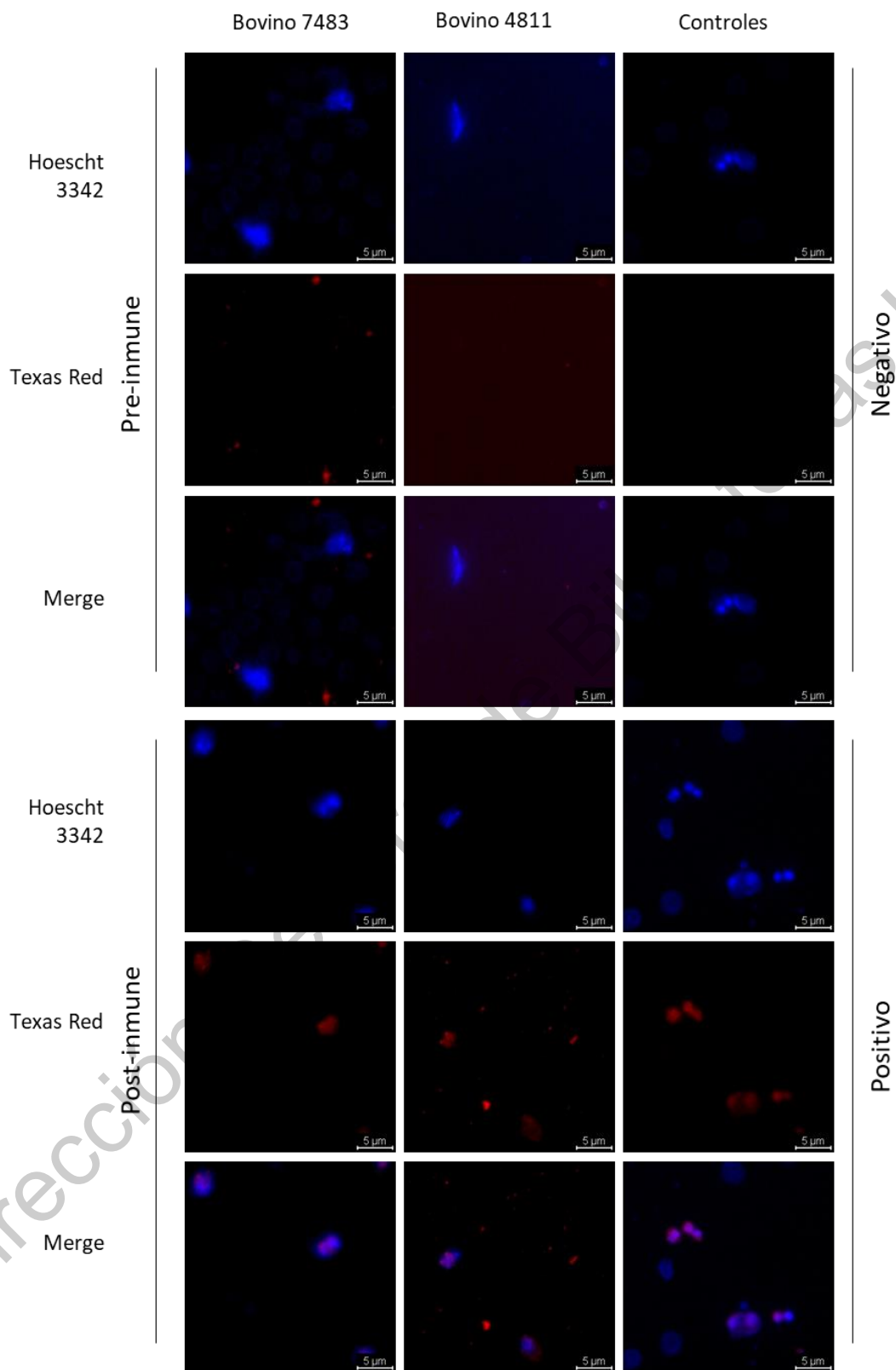


Figura 23. Inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-CHPV1.9 con células infectadas de *B. bigemina*.

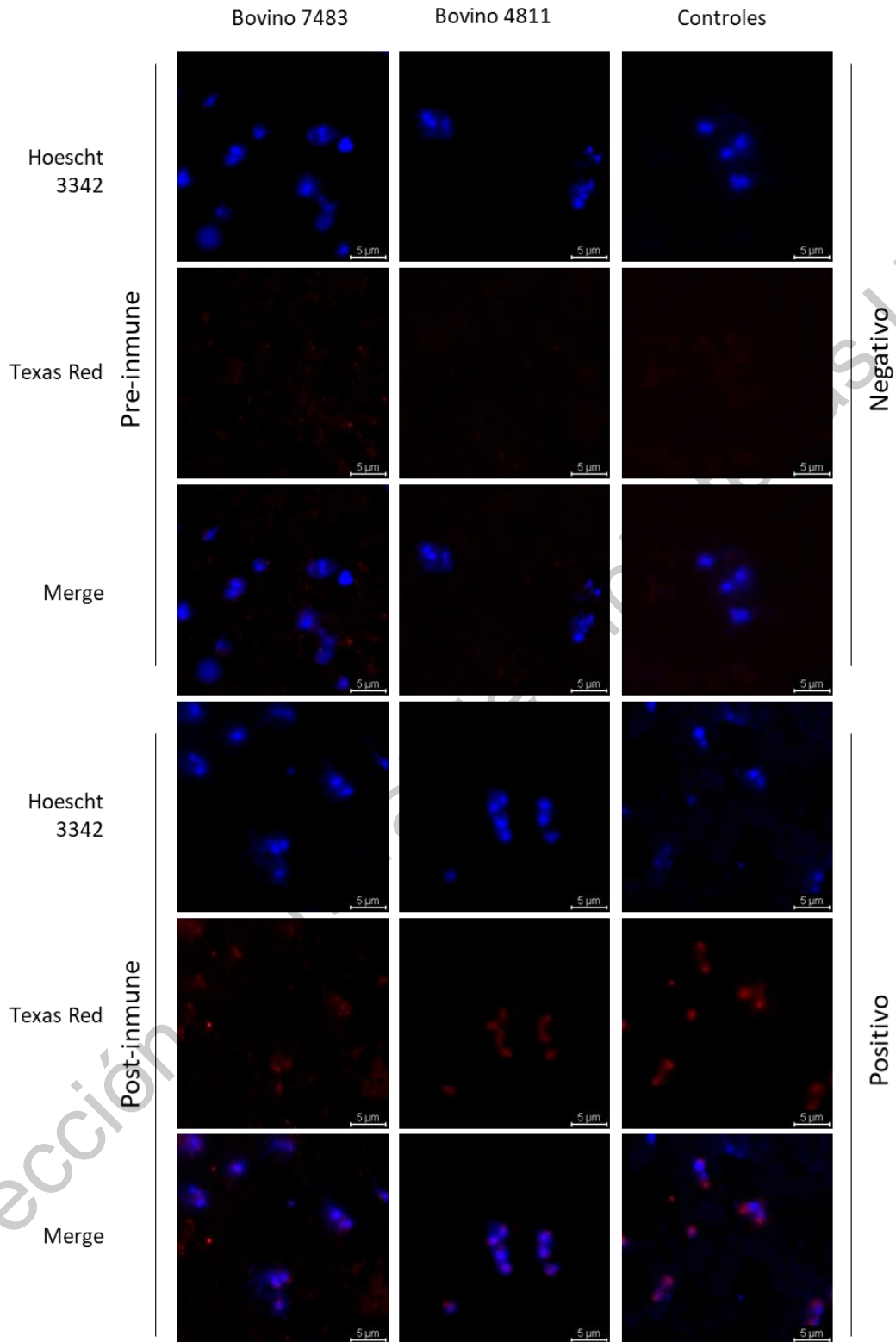


Figura 24. Inmunofluorescencia de los anticuerpos anti-CHPV1.9 con células infectadas de *B. bovis*

Con la finalidad de determinar si los anticuerpos anti-CHPV1.9 poseen un efecto en el ciclo de vida de *B. bigemina* se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la formación de cigotos y adicionalmente por medio de un proyecto paralelo al presente se evaluó el efecto de la vacunación en bovinos desafiados con *B. bigemina*. Los resultados de la inhibición de la formación de cigotos mostraron que no existe una diferencia significativa el porcentaje de formación de cigotos en los cultivos adicionados con anticuerpos anti-CHPV1.9 y los cultivos adicionados con suero pre-inmunización del mismo bovino. Por otra parte, los bovinos vacunados desafiados mostraron una diferencia significativa en los porcentajes de parasitemia, el volumen celular aglomerado y temperatura rectal.

Dirección General de Bibliotecas

Discusión.

Anteriormente se ha buscado la manera de desarrollar vacunas efectivas contra la babesiosis bovina, en la que el uso de cultivo celular y de animales no sea necesario. Las vacunas disponibles contra la babesiosis son elaboradas de parásitos vivos atenuados, aunque son efectivas poseen desventajas como altos costo de elaboración y posible reversión de la virulencia. Algunos de los esfuerzos por encontrar un candidato vacunal que elimine las desventajas de las vacunas actuales involucra el uso de herramientas bioinformáticas e ingeniería genética. En este trabajo de investigación se hizo uso de herramientas bioinformáticas que ayudaron a seleccionar péptidos con alta probabilidad de ser epítomos, el uso de softwares para el desarrollo de vacunas no es algo reciente, el surgimiento del término “vacunología reversa” hace alusión al uso de estas herramientas con la finalidad de discernir si alguna proteína de importancia en el ciclo de vida de los patógenos tiene potencial para producir una respuesta inmune protectora. Actualmente existen un sinnúmero de trabajos de investigación donde el uso de estas herramientas ha representado un avance gigantesco en el desarrollo de vacunas

106–108.

Diferentes grupos de trabajo alrededor del mundo han colaborado para encontrar un antígeno que genere protección contra la babesiosis. Diferentes candidatos han sido propuestos como posibles agentes vacunales, entre ellos proteínas periféricas del parásito, proteínas involucradas en el ciclo de vida, etcétera. Algunas proteínas como RAP-1¹⁰² han sido expresadas de forma recombinante en diferentes versiones, ya sea la proteína completa o fragmentos que contienen dominios inmunogénicos. En el caso particular de esta proteína, a pesar de que los bovinos inmunizados con estas proteínas recombinantes desarrollaron una fuerte respuesta inmune con producción de interferón gamma, una proliferación celular de linfocitos T y IgG específicas anti-RAP-1, los bovinos no generaron una respuesta protectora. Otros intentos se han llevado a cabo con otros candidatos vacunales, las 12D3, 11C5, MSA-1, MSA-2c de *B. bovis* son algunos ejemplos y otros más han sido estudiados^{109–111}. Sin embargo, en la mayoría de los casos a pesar de la aparente respuesta inmune por parte de los animales vacunados, estos individuos no logran desarrollar una respuesta inmune protectora. Algunos autores especulan que la causa del poco éxito de estas vacunas es que las células parasitarias poseen un variado arsenal para lograr penetrar las células del hospedante, además de que la variabilidad antigénica y la diferente topología de las proteínas recombinantes difiere con las proteínas nativas.

El desarrollo de una vacuna quimérica con 6 diferentes antígenos de *B. bigemina* surge con la finalidad de aumentar el número de dianas moleculares, con péptidos que sean conservados en diversas cepas de México y el mundo, aumentando así las probabilidades de éxito de este candidato vacunal. Para llegar a este punto fue necesario evaluar anticuerpos anti-péptidos individuales para determinar si por sí solos tenían capacidad de neutralizar las proteínas que participan en la invasión de *B. bigemina* al eritrocito *in vitro*. Otros autores han reportado diferentes resultados en los porcentajes de inhibición de las células infectadas *in vitro* con el uso de anticuerpos contra proteínas del parásito ^{35,36,39,112}, en este estudio encontramos diferentes porcentajes de inhibición causados por anticuerpos anti-epítomos de las proteínas usadas en este estudio. En la mayoría de los casos logramos observar una disminución estadísticamente significativa de la reducción de células parasitadas en comparación con los cultivos adicionados con sueros pre-inmunes. El porcentaje más alto fue obtenido por los anticuerpos contra el péptido B2 de RAP-1 α 1 con un 74.86 % de inhibición, mientras que el menor fue causado por los anticuerpos contra el péptido B de la proteína MIC-1, a pesar de esta gran diferencia de porcentajes, se observó que la mezcla de anticuerpos tuvo un efecto aditivo en reducción del número de células infectadas. De igual forma se logró observar que los péptidos anti-HAP2 tienen un efecto en el porcentaje de formación de cigotos *in vitro*, resultados similares fueron obtenidos por Blagborough y colaboradores utilizando anticuerpos anti-HAP2 en *Plasmodium berghei* ¹¹³, en donde ellos determinaron que estos anticuerpos inhibían hasta en un 81% la formación de ooquinetos, cabe señalar que este porcentaje fue determinado por medio del conteo de ooquinetos y gametos femeninos de *P. berghei* (sin tomar en cuenta los gametos masculinos), en el género *Babesia* no existe dimorfismo sexual por lo que resulta imposible separar los gametos por lo que los resultados obtenidos en este trabajo incluyen todas las células sexuales independientemente de la expresión de esta proteína.

Con base en los resultados anteriores se decidió incluir todos los péptidos inmunogénicos a la construcción de la proteína quimérica. Diversas estrategias han incluido la construcción de proteínas multiantigénicas contra parásitos apicomplexos, El Bissati y colaboradores desarrollaron una proteína con péptidos de diversos antígenos de superficie de *T. gondii*, donde observaron una diferencia estadísticamente significativas en la producción de INF- γ en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con los péptidos individuales en comparación con las proteínas quiméricas que fueron diseñadas, obteniendo en esta última mayor producción de esta citocina. Adicionalmente, lograron observar una diferencia significativa en la tasa de supervivencia de ratones inmunizados al ser retados contra el parásito. Por otra parte, también existen reportes de la generación de proteínas multiantigénicas contra *B. bovis*, Jaramillo-Ortíz y colaboradores ¹¹⁴

desarrollaron una proteína quimérica que contiene tres diferentes péptidos inmunogénicos MSA-2c, HSP20 y RAP-1 en la cual observaron la producción de INF- γ e inmunoglobulinas el tipo IgG2 que correlacionan con una respuesta Th1 del tipo protectora contra *Babesia*, además de que la proteína diseñada por ellos fue reconocida por sueros de bovinos de campo.

Por lo anterior, se escogió la estrategia de generar *in silico* un gen sintético que codifica para una proteína que contiene 21 péptidos de 6 proteínas diferentes, de las cuales 5 proteínas participan en el proceso de invasión de *B. bigemina*, la sexta proteína participa en la fusión de fases sexuales. A pesar de que existen diversos estudios sobre el uso de proteínas de fusión o proteínas quiméricas como agentes vacunales, no existen reglas escritas sobre su diseño. Como estrategia para aumentar las probabilidades de éxito en la utilización de estas posibles vacunas, en algunas de ellas se añaden secuencias accesorias como potenciadores de la inmunogenicidad o como adyuvantes, tal como el péptido PADRE, secuencias CpG o agonistas de los receptores tipo Toll ¹¹⁵, de igual forma la adición de aminoácidos espaciadores que prevengan la formación de “neopéptidos” por la yuxtaposición de dos secuencias de diferentes proteína ^{116,117}. El diseño de la proteína CHPV1.9 si bien no involucró la adición de secuencias potenciadoras de la inmunogenicidad, si tomó en cuenta el uso de espaciadores para eliminar la predicción de neopéptidos yuxtapuestos, la proteína quimérica posee un residuo de glicina como espaciadores entre los péptidos B y A de la proteína RON-2 y dos residuos de glicina ente el péptido A de la proteína RON-2 y el péptido A de la proteína MIC-1.

Uno de los principales objetivos en la búsqueda de una vacuna efectiva contra la babesiosis bovina es disminuir los costos de producción. En la actualidad existen diversos productos farmacéuticos los cuales son producidos por medio de fuentes biológicas, es decir, proteínas, vitaminas o metabolitos que son expresados o producidos por bacterias u hongos. En este estudio se logró clonar y expresar una proteína heteróloga sintética. La proteína CHPV1.9 no existe de forma natural en el género *Babesia*, sino que es el conjunto de fragmentos de seis proteínas diferentes. La expresión de esta proteína se llevó a cabo en *Escherichia coli* debido a la diversidad de ventajas que posee, primero por su fácil manipulación, propagación y tiempo de generación. Esta bacteria es una de las más estudiadas debido a que ha sido el modelo de estudio de los mecanismos y procesos celulares de los eucariotas por lo que se conoce a fondo su genética y fisiología. Por lo anterior se cuenta con una gran diversidad de estrategias para la expresión de proteínas recombinantes, que además la expresión de las mismas puede ser encendida, apagada o regulada en caso de ser proteínas que puedan ser tóxicas para las células bacterianas ^{118–120}. Se logró purificar la proteína CHPV1.9 por medio de cromatografía de afinidad; sin embargo, fue necesario recurrir a condiciones desnaturalizantes para lograr

obtener la proteína desnaturalizada. Lo anterior debido a que después de los análisis de expresión la proteína quimérica fue localizada en la fracción insoluble del lisado celular. Generalmente las proteínas heterólogas se encuentran en cuerpos de inclusión cuando son sobre expresadas en *E. coli*, esta sobreexpresión se debe a diversas causas, entre ellas la presencia de promotores fuertes, altas concentraciones de las moléculas inductoras e incluso factores físicos, como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, pH y temperatura ¹²¹⁻¹²³. En un intento por obtener la proteína quimérica en la fracción soluble y facilitar su purificación se llevaron a cabo diferentes cultivos bajo diferentes condiciones para su expresión, entre ellas la adición de diferentes concentraciones de la L-arabinosa como inductor, además de que estos cultivos se colocaron a incubar a temperatura ambiente en un agitador orbital (Resultados mostrados en Figura 18), bajo ninguna de las diferentes concentraciones de inductor se observó que la proteína fuera expresada en la fracción soluble. Un análisis más profundo de la secuencia de la proteína CHPV1.9 reveló que posee un valor del índice GRAVY (Grand Average of Hydropathy) de -0.475. El índice de hidropatía es calculado por los residuos de aminoácidos que contiene una proteína, donde la cadena lateral de cada residuo aporta características de hidrofobicidad o hidrofiliidad. De acuerdo a la escala propuesta por Kyte and Doolittle ^{124,125} valores negativos del índice GRAVY indican proteínas no polares, por lo tanto insolubles. Debido a lo anterior se puede explicar el motivo por el cual la proteína quimérica siempre es expresada en cuerpos de inclusión, por su propia naturaleza no polar los cambios en las condiciones de cultivo no fueron suficiente para hacer que la proteína se encontrara en la fracción soluble del lisado celular.

Debido a lo anterior, fue necesario realizar la purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes, estas condiciones de purificación se lograron utilizando buffers con 8M de urea, ya que la proteína quimérica es un conjunto de epítomos unidos entre sí, y no es una proteína que posea actividad catalítica, las condiciones de purificación, el replegamiento y/o topología de la proteína no se consideran como un punto crítico para su uso como inmunógeno; sin embargo fue necesario utilizar condiciones de acidez para la diálisis de la proteína. Lo anterior debido a que el punto isoeléctrico teórico de la proteína oscila entre 6.5 y 7.0, al llevar esta proteína a condiciones de pH fisiológico propicia el paso por su punto isoeléctrico ocasionando que se precipite en el medio, el proceso de diálisis de la proteína quimérica se llevó a cabo en un gradiente de urea comenzando con una concentración de 1.5 M hasta reducirla por debajo de 0.05M (aproximadamente 0.046M), al igual que en este proyecto de investigación diferentes autores han optado por estas estrategias para la obtención de proteínas solubles que puedan ser plegadas y tener un estado catalítico activo o que estén en condiciones adecuadas para estudios de cristalografía ^{95,96}

Por otra parte, la proteína CHPV1.9 fue reconocida por anticuerpos anti-péptidos y se determinó experimentalmente por medio de Western Blot que la proteína quimérica está conformada por los 21 epítomos con los que fue diseñada. Anticuerpos generados a partir de inmunizaciones con cada uno de los péptidos individuales reconocieron una banda de aproximadamente 50 kDa, que corresponde con el peso calculado experimentalmente y el observado en experimentos previos. Resultados similares obtuvo Jaramillo-Ortiz y colaboradores¹¹⁴ al evaluar la proteína quimérica diseñada de proteínas de *B. bovis*.

Finalmente se utilizó esta proteína para inmunizar bovinos provenientes de zonas libres del vector de la babesiosis. Al igual que en otros estudios, la administración de proteínas recombinantes fue útil para la producción de anticuerpos específicos contra esta proteína, en este trabajo se confirmó la producción de anticuerpos específicos contra la proteína quimérica por medio de un ensayo de ELISA indirecto, a pesar de que la respuesta de los dos bovinos utilizados no fue de igual magnitud, se logró comprobar que los anticuerpos de ambos individuos reconocen merozoítos de *B. bigemina* y debido a que algunos de estos epítomos son conservados también en *B. bovis*, los anticuerpos anti-CHPV1.9 fueron capaces de reconocer merozoítos de ambas especies. Estos resultados concuerdan con otros autores donde el uso de proteínas recombinantes, fragmentos de proteínas o péptidos inmunogénicos son capaces de producir anticuerpos que reconocen las proteínas nativas presentes en las células de *B. bigemina*^{43,46,82,83}, estos resultados le dan un valor agregado a esta proteína, ya que no solo puede llegar a servir como inmunógeno sino que además puede ser utilizada como potencial herramienta para el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en fundamentos inmunológicos.

Conclusiones

- Los péptidos inmunogénicos de las proteínas RAP-1 α 1, HAP-2, MIC-1, RON-2, SBP-4 y AMA-1 son capaces de generar anticuerpos que inhiben la fusión de fases sexuales y la invasión de *B. bigemina* al eritrocito bovino *in vitro*.
- Se logró construir un gen sintético quimérico que codifica a una proteína multiepitópica formado de 21 péptidos de 5 proteínas diferentes.
- El gen quimérico codifica para una proteína de aproximadamente 50kDa.
- Se confirmó experimentalmente que la proteína CHPV1.9 está conformada de los 21 péptidos con los cuales fue diseñada.
- La proteína quimérica es inmunogénica y produce anticuerpos que reconocen merozoítos de *B. bigemina* y de *B. bovis*.

Material publicado y productos obtenidos.

Del presente trabajo de investigación se generó información y resultados los cuales fueron publicados en revistas internacionales. A continuación, se muestra dicho material.

- Artículo de primer autor
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. 2018, 5(2), 32; <https://doi.org/10.3390/vetsci5020032>
- Artículo de segundo autor
Hap2, a novel gene in *Babesia bigemina* is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation.
Parasites & Vectors 2017 **10**:568; <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2510-0>

Pérez-Soria, M. M. E., Hernández-Silva, D. J. & Mosqueda, J. Analysis of the allelic variability of BmVDAC and Subolesin, two vaccine candidates against *Rhipicephalus microplus* in isolates from Mexico. *Nova Sci.* **11**, 126–142 (2019).
- Artículo como colaborador
Mosqueda, J., Hidalgo-Ruiz, M., Calvo-Olvera, D., Hernandez-Silva, D., Ueti, M., Mercado-Uriostegui, M., . . . Igarashi, I. (2019). RON2, a novel gene in *Babesia bigemina*, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasion. *Parasitology*, 146(13), 1646-1654. doi:10.1017/S0031182019001161
- Capítulo de libro
Juan Mosqueda, Diego Josimar Hernández-Silva and Mario Hidalgo-Ruiz (December 20th 2017). Genome-Based Vaccinology Applied to Bovine Babesiosis, Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment, Rosa Estela Quiroz-Castañeda, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72636. Available from: <https://www.intechopen.com/books/farm-animals-diseases-recent-omic-trends-and-new-strategies-of-treatment/genome-based-vaccinology-applied-to-bovine-babesiosis>
- Registro de patente

La proteína desarrollada en este trabajo de investigación al momento de la publicación de este documento se encuentra bajo trámite de registro de patente.

- Asistencia a congresos
 - Los resultados parciales de este proyecto fueron presentados durante el X Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria “Un mundo, una salud”, celebrado del 9 al 11 de agosto del 2016 en la ciudad de Puebla, Pue, México
 - Este proyecto fue presentado en la Segunda Reunión de la Babesiosis celebrada el 17 y 18 de abril del 2019 en la Universidad de Yale, New Haven, Connecticut, EUA.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Financiamiento

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento de los siguientes programas e instituciones

- “FONDO DE PROYECTOS ESPECIALES DE RECTORÍA” de la **Universidad Autónoma de Querétaro** en dos años consecutivos durante el 2018 y 2019.
- Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Ciencia Básica número 167129.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

Referencias

1. Babes, v. *Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.* vol. 107 (1888).
2. Bowman, D. D. *Georgis' Parasitology for Veterinarians.* (Elsevier Health Sciences, 2009).
3. Blackman, M. J. & Bannister, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**, 11–25 (2001).
4. Berenguer, J. G. *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario.* (Edicions Universitat Barcelona, 2007).
5. Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A. & Gray, J. S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1219–1237 (2008).
6. Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* **40**, 37 (2009).
7. Graindorge, A. et al. The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for Toxoplasma gondii Entry and Exit from Host Cells. *PLOS Pathog.* **12**, e1005388 (2016).
8. Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. & Jarra, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* **2**, 1461–1477 (2000).
9. Portman, N. & Slapeta, J. The flagellar contribution to the apical complex: a new tool for the eukaryotic Swiss Army knife? *Trends Parasitol.* **30**, 58–64 (2014).
10. Sibley, L. D. Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. *Traffic Cph. Den.* **4**, 581–586 (2003).
11. Russell, D. G. & Burns, R. G. The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J. Cell Sci.* **65**, 193–207 (1984).
12. Hu, K., Roos, D. S. & Murray, J. M. A novel polymer of tubulin forms the conoid of Toxoplasma gondii. *J. Cell Biol.* **156**, 1039–1050 (2002).
13. Caldas, L. A., de Souza, W. & Attias, M. Calcium ionophore-induced egress of Toxoplasma gondii shortly after host cell invasion. *Vet. Parasitol.* **147**, 210–220 (2007).
14. Carmen, M. G. D., Mondragón, M., González, S. & Mondragón, R. Induction and regulation of conoid extrusion in Toxoplasma gondii. *Cell. Microbiol.* **11**, 967–982 (2009).
15. Vieira, M. C. F. & Moreno, S. N. J. Mobilization of intracellular calcium upon attachment of Toxoplasma gondii tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**, 157–162 (2000).

16. Bradley, P. J. & Sibley, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 582–587 (2007).
17. Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. & Mitchell, G. H. Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology* **121**, 273–287 (2000).
18. Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. & Dubremetz, J.-F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, 203–211 (1988).
19. Torii, M., Adams, J. H., Miller, L. H. & Aikawa, M. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infect. Immun.* **57**, 3230–3233 (1989).
20. Terkawi, M. A. *et al.* Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **178**, 40–45 (2011).
21. Hines, S. A. *et al.* Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69**, 149–159 (1995).
22. Dowling, S. C., Perryman, L. E. & Jasmer, D. P. A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infect. Immun.* **64**, 2618–2626 (1996).
23. Ruef, B. J. *et al.* A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**, 1–12 (2000).
24. Guo, J. *et al.* Characterization of a novel secretory spherical body protein in *Babesia orientalis* and *Babesia orientalis*-infected erythrocytes. *Parasit. Vectors* **11**, 433 (2018).
25. Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J. & Persing, D. H. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 451–469 (2000).
26. Rudzinska, M. A., Lewengrub, S., Spielman, A. & Piesman, J. Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J. Protozool.* **30**, 338–346 (1983).
27. Rudzinska, M. A., Spielman, A., Lewengrub, S., Trager, W. & Piesman, J. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2966–2970 (1983).
28. Kreier, J. *Parasitic Protozoa: Babesia and Plasmodia*. (Academic Press, 2012).
29. Karakashian, D. S. J. *et al.* Ultrastructural studies on sporogony of *Babesia microti* in salivary gland cells of the tick *Ixodes dammini*. *Cell Tissue Res.* **231**, 275–287 (1983).
30. Sonenshine, D. E. & Roe, R. M. *Biology of Ticks*. (OUP USA, 2013).
31. Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A. & Knowles, D. P. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by

- Rhipicephalus (Boophilus) microplus during acute infection. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 426–431 (2007).
32. Mosqueda, J., McElwain, T. F. & Palmer, G. H. 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 (2002).
 33. Yokoyama, N., Okamura, M. & Igarashi, I. 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 (2006).
 34. Jasmer, D. P., Reduker, D. W., Hines, S. A., Perryman, L. E. & McGuire, T. C. Surface epitope localization and gene structure of a Babesia bovis 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**, 75–83 (1992).
 35. Mosqueda, J., McElwain, T. F., Stiller, D. & Palmer, G. H. 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 (2002).
 36. Silva, M. G. *et al.* Babesia bovis expresses a neutralization-sensitive antigen that contains a microneme adhesive repeat (MAR) domain. *Parasitol. Int.* **59**, 294–297 (2010).
 37. McElwain, T. F., Perryman, L. E., Musoke, A. J. & McGuire, T. C. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive Babesia bigemina merozoite surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**, 213–222 (1991).
 38. Boyle, M. J., Wilson, D. W. & Beeson, J. G. New approaches to studying Plasmodium falciparum merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int. J. Parasitol.* **43**, 1–10 (2013).
 39. Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J. & de Vries, E. 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 (2004).
 40. Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R. & Bannister, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* **72**, 154–158 (2004).
 41. Takemae, H. *et al.* Characterization of the interaction between Toxoplasma gondii rhoptry neck protein 4 and host cellular β -tubulin. *Sci. Rep.* **3**, 3199 (2013).

42. Hidalgo-Ruiz, M. *et al.* Babesia bovis RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasit. Vectors* **11**, (2018).
43. Mosqueda, J. *et al.* RON2, a novel gene in Babesia bigemina, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasion. *Parasitology* 1–9 (2019) doi:10.1017/S0031182019001161.
44. Gunn, A. & Pitt, S. J. *Parasitology: An Integrated Approach*. (John Wiley & Sons, 2012).
45. Mehlhorn, H. & Schein, E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages*. in *Advances in Parasitology* (ed. Muller, J. R. B. and R.) vol. 23 37–103 (Academic Press, 1985).
46. Camacho-Nuez, M. *et al.* Hap2, a novel gene in Babesia bigemina is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation. *Parasit. Vectors* **10**, 568 (2017).
47. Hussein, H. E. *et al.* The Babesia bovis hap2 gene is not required for blood stage replication, but expressed upon in vitro sexual stage induction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005965 (2017).
48. Liu, Y. *et al.* The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in Chlamydomonas and Plasmodium gametes. *Genes Dev.* **22**, 1051–1068 (2008).
49. Besser, K. von, Frank, A. C., Johnson, M. A. & Preuss, D. Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. *Development* **133**, 4761–4769 (2006).
50. Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. & Kuroiwa, T. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat. Cell Biol.* **8**, 64–71 (2006).
51. Liu, Y., Pei, J., Grishin, N. & Snell, W. J. The cytoplasmic domain of the gamete membrane fusion protein HAP2 targets the protein to the fusion site in Chlamydomonas and regulates the fusion reaction. *Development* **142**, 962–971 (2015).
52. Wong, J. L., Leydon, A. R. & Johnson, M. A. HAP2(GCS1)-Dependent Gamete Fusion Requires a Positively Charged Carboxy-Terminal Domain. *PLOS Genet* **6**, e1000882 (2010).
53. Bastos, R. G., Johnson, W. C., Mwangi, W., Brown, W. C. & Goff, W. L. Bovine NK cells acquire cytotoxic activity and produce IFN-gamma after stimulation by Mycobacterium bovis BCG- or Babesia bovis-exposed splenic dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **124**, 302–312 (2008).
54. Brown, W. C. *et al.* A novel 20-kilodalton protein conserved in Babesia bovis and B. bigemina stimulates memory CD4(+) T lymphocyte responses in B. bovis-immune cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **118**, 97–109 (2001).

55. Gonçalves, P. M., Passos, L. M. & Ribeiro, M. F. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* **82**, 11–17 (1999).
56. Goff, W. L., Johnson, W. C., Horn, R. H., Barrington, G. M. & Knowles, D. P. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol.* **25**, 185–188 (2003).
57. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A. & Jorgensen, W. Babesiosis of cattle. *Parasitology* **129**, S247–S269 (2004).
58. Goff, W. L. *et al.* The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* **23**, 463–471 (2001).
59. Smith, R. D. *et al.* Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **916**, 510–520 (2000).
60. Goff, W. L., Storset, A. K., Johnson, W. C. & Brown, W. C. 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 (2006).
61. Riek, R. F. Babesiosis. *Babesiosis*. (1968).
62. Roberts, J. A., Kerr, J. D. & Tracey-patte, P. Function of the spleen in controlling infections of *Babesia rodhaini* in mice. *Int. J. Parasitol.* **2**, 217–226 (1972).
63. Estes, D. M. & Brown, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **90**, 1–10 (2002).
64. Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P. & Goff, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* **138**, 75–87 (2006).
65. Shoda, L. K. *et al.* *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect. Immun.* **68**, 5139–5145 (2000).
66. Shoda, L. K., Zarlenga, D. S., Hirano, A. & Brown, W. C. Cloning of a cDNA encoding bovine interleukin-18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN-gamma-inducing activity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **19**, 1169–1177 (1999).
67. Brown, W. C., Rice-Ficht, A. C. & Estes, D. M. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **63**, 45–55 (1998).
68. Rodríguez, S. D. *et al.* CD4+ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein I. *Infect. Immun.* **64**, 2079–2087 (1996).
69. Stich, R. W. *et al.* Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* **66**, 4130–4136 (1998).
70. Brown, W. C., McElwain, T. F., Palmer, G. H., Chantler, S. E. & Estes, D. M. Bovine CD4+ T-Lymphocyte Clones Specific for Rhoptry-Associated Protein 1

- of *Babesia bigemina* Stimulate Enhanced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 Synthesis. *Infect. Immun.* **67**, 155–164 (1999).
71. O'Donoghue, P. J., Friedhoff, K. T., Vizcaino, O. G. & Weyreter, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. *Vet. Parasitol.* **18**, 1–12 (1985).
72. Guglielmone, A. A., Lugaresi, C. I., Volpogni, M. M., Anziani, O. S. & Vanzini, V. R. Babesial antibody dynamics after cattle immunisation with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. *Vet. Parasitol.* **70**, 33–39 (1997).
73. Brown, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* **101**, 233–248 (2001).
74. Mahoney, D. F., Wright, I. G. & Goodger, B. V. Immunity in Cattle to *Babesia Bovis* After Single Infections with Parasites of Various Origin. *Aust. Vet. J.* **55**, 10–12 (1979).
75. SENASICA. Situación actual del control de la garrapata boophilus spp. *gob.mx* <http://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.
76. Rodríguez-Vivas, R. I. *et al.* Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* **8**, 61–74 (2017).
77. Ueti, M. W., Olafson, P. U., Freeman, J. M., Johnson, W. C. & Scoles, G. A. A Virulent *Babesia bovis* Strain Failed to Infect White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *PloS One* **10**, e0131018 (2015).
78. Cárdenas-Canales, E. M. *et al.* Nilgai antelope in northern Mexico as a possible carrier for cattle fever ticks and *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *J. Wildl. Dis.* **47**, 777–779 (2011).
79. Wright, I. G. *et al.* The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Parasitol.* **44**, 3–13 (1992).
80. Hines, S. A., Palmer, G. H., Jasmer, D. P., McGuire, T. C. & McElwain, T. F. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**, 85–94 (1992).
81. Suarez, C. E. *et al.* Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 45–52 (1991).
82. Hernández-Silva, D. J. *et al.* 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**, (2018).

83. Barreda, D. *et al.* Identification of conserved peptides containing B-cell epitopes of *Babesia bovis* AMA-1 and their potential as diagnostics candidates. *Transbound. Emerg. Dis.* **0**, (2019).
84. Valdez-Espinoza, U. M. & Mosqueda-Gualito, J. J. Identificación de epítomos conservados en aislados de *Babesia bigemina*. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2015).
85. Harvey, K. L., Yap, A., Gilson, P. R., Cowman, A. F. & Crabb, B. S. Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1. *Int. J. Parasitol.* **44**, 853–857 (2014).
86. Chesne-Seck, M.-L. *et al.* Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **144**, 55–67 (2005).
87. Montero, E., Rodriguez, M., Oksov, Y. & Lobo, C. A. *Babesia divergens* Apical Membrane Antigen 1 and Its Interaction with the Human Red Blood Cell. *Infect. Immun.* **77**, 4783–4793 (2009).
88. Drew, D. R. *et al.* Defining the Antigenic Diversity of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 and the Requirements for a Multi-Allele Vaccine against Malaria. *PLOS ONE* **7**, e51023 (2012).
89. Moreau, E. *et al.* *Babesia divergens* apical membrane antigen-1 (BdAMA-1): A poorly polymorphic protein that induces a weak and late immune response. *Exp. Parasitol.* **155**, 40–45 (2015).
90. Sivakumar, T. *et al.* Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. *Infect. Genet. Evol.* **19**, 134–140 (2013).
91. Yoshinari, T. *et al.* A PCR Based Survey of *Babesia ovata* in Cattle from Various Asian, African and South American Countries. *J. Vet. Med. Sci.* **75**, 211–214 (2013).
92. Torina, A. *et al.* Characterization of the Apical Membrane Antigen-1 in Italian Strains of *Babesia bigemina*: Characterization of the AMA-1 in *Babesia bigemina*. *Transbound. Emerg. Dis.* **57**, 52–56 (2010).
93. Lobo, C. A., Cursino-Santos, J. R., Rodriguez, M., Ord, R. & Singh, M. Receptor–ligand interactions underlying RBC invasion in *Babesia*. *ISBT Sci. Ser.* **10**, 173–180 (2015).
94. Terkawi, M. A. *et al.* Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **178**, 40–45 (2011).
95. Ruef, B. J. *et al.* A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**, 1–12 (2000).
96. Cruz- Reséndiz, A. & Mosqueda-Gualito, J. J. Expresión recombinante de la Proteína de los Cuerpos Esfericos (SBP-4) de *Babesia bigemina*. (Universidad Autónoma de Querétaro, 2014).

97. Lamarque, M. *et al.* The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* **7**, e1001276 (2011).
98. Hidalgo-Ruiz, M. *et al.* Babesia bovis RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasit. Vectors* **11**, 575 (2018).
99. Carruthers, V. B. & Tomley, F. M. Receptor-ligand interaction and invasion: Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell. Biochem.* **47**, 33–45 (2008).
100. Fourmaux, M. N. *et al.* The MIC1 microneme protein of Toxoplasma gondii contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 201–210 (1996).
101. Suarez, C. E. *et al.* Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the Babesia bigemina rap-1 locus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **127**, 101–112 (2003).
102. Norimine, J. *et al.* 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 (2003).
103. Johnson, M. A. *et al.* Arabidopsis hapless Mutations Define Essential Gametophytic Functions. *Genetics* **168**, 971–982 (2004).
104. Mosqueda, J. *et al.* Babesia bigemina sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected Boophilus microplus ticks. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1229–1236 (2004).
105. Chung, B. K.-S. & Lee, D.-Y. Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression. *BMC Syst. Biol.* **6**, 134 (2012).
106. Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O. & Rosales-Mendoza, S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J. Biomed. Inform.* **53**, 405–414 (2015).
107. Del Tordello, E., Rappuoli, R. & Delany, I. Chapter 3 - Reverse Vaccinology: Exploiting Genomes for Vaccine Design. in *Human Vaccines* (eds. Modjarrad, K. & Koff, W. C.) 65–86 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802302-0.00002-9.
108. Rappuoli, R., Bottomley, M. J., D'Oro, U., Finco, O. & Gregorio, E. D. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J. Exp. Med.* **213**, 469–481 (2016).
109. Hope, M. *et al.* Potential for recombinant Babesia bovis antigens to protect against a highly virulent isolate. *Parasite Immunol.* **27**, 439–445 (2005).
110. Antonio Alvarez, J. *et al.* Immunization of Bos taurus steers with Babesia bovis recombinant antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. *Transbound. Emerg. Dis.* **57**, 87–90 (2010).

111. Rathinasamy, V., Poole, W. A., Bastos, R. G., Suarez, C. E. & Cooke, B. M. Babesiosis Vaccines: Lessons Learned, Challenges Ahead, and Future Glimpses. *Trends Parasitol.* **35**, 622–635 (2019).
112. Munkhjargal, T. *et al.* Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. *Exp. Parasitol.* **166**, 29–36 (2016).
113. Blagborough, A. M. & Sinden, R. E. *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. *Vaccine* **27**, 5187–5194 (2009).
114. Jaramillo Ortiz, J. M. *et al.* Evaluation of different heterologous prime–boost immunization strategies against *Babesia bovis* using viral vectored and protein-adjuvant vaccines based on a chimeric multi-antigen. *Vaccine* **34**, 3913–3919 (2016).
115. Ghaffari-Nazari, H. *et al.* Improving Multi-Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy that Enhances CD4⁺ T Help in BALB/c Mice. *PLoS One* **10**, e0142563 (2015).
116. Novak, Z., Fraga, E. & Singh, B. Evidence for immunodominance between closely related epitopes in the selection of T cell repertoire: Hierarchy of T cell epitopes in a repeating sequence. *Mol. Immunol.* **29**, 1467–1476 (1992).
117. Perkins, D. L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J. A. & Geftter, M. L. Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J. Immunol.* **146**, 2137–2144 (1991).
118. Correa, A. & Oppezzo, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high-throughput screening. *Biotechnol. J.* **6**, 715–730 (2011).
119. Choi, J. H., Keum, K. C. & Lee, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 876–885 (2006).
120. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
121. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Factories* **14**, 41 (2015).
122. Singh, A., Upadhyay, V. & Panda, A. K. Solubilization and Refolding of Inclusion Body Proteins. in *Insoluble Proteins: Methods and Protocols* (ed. García-Fruitós, E.) 283–291 (Springer, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2205-5_15.
123. Kane, J. F. & Hartley, D. L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **6**, 95–101 (1988).
124. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132 (1982).

125. Garrett, R. H. & Grisham, C. M. *Biochemistry*. (Cengage Learning, 2008).
126. Modanloo Jouybari, R., Sadeghi, A., Khansarinejad, B., Sadoogh Abbasian, S. & Abtahi, H. Production of Recombinant Streptavidin and Optimization of Refolding Conditions for Recovery of Biological Activity. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **6**, 178–185 (2018).
127. Bhat, E. A. & Rather, M. A. and I. A. Key Factors for Successful Protein Purification and Crystallization. *Glob. J. Biotechnol. Biomater. Sci.* **4**, 1–7 (2018).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Apéndices

Apéndice I. Consideraciones Bioéticas

Previo a la realización de este proyecto, el protocolo del mismo fue sometido al comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, mismo que fue revisado y aprobado por el comité. Folio de aprobación: **27FCN2016**.

Manejo, almacenamiento y disposición final de residuos peligrosos biológicos infecciosos

Las muestras biológicas derivadas del presente estudio tales como sangre, suero y plasma sanguíneo serán depositados en contenedores para líquidos rígidos, con sellado hermético de polipropileno, color rojo, con la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos” y con el símbolo universal de riesgo biológicos sin ser llenados más del 80% de su capacidad. Los cultivos bacterianos y materiales involucrados en el proceso serán sometidos a esterilización en autoclave 15 minutos, 15 libras de presión y 121°C, los sólidos resultantes serán dispuestos en bolsas rojas de polietileno con la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos” y con el símbolo universal de riesgo biológico sin rebasar la capacidad de llenado más de 80%. De igual manera los materiales sólidos tales como guantes, tubos y papel contaminados serán dispuestos en bolsas rojas con las mismas características mencionadas con anterioridad. Los materiales punzocortantes serán colocados en contenedores rígidos de polipropileno con sello hermético resistente a fracturas de color rojo con la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos” y el símbolo universal de riesgo biológico. Dichos materiales serán almacenados temporalmente no más de treinta días, estando a cargo de su recolección y disposición final la empresa “Transporte y Recolección Integral de Residuos Peligrosos S.A. de C.V.” misma que presta sus servicios a la Universidad Autónoma de Querétaro. La manipulación, almacenaje, transporte y disposición final se llevará a cabo bajo las consideraciones de la norma mexicana vigente NOM-087-ECOL-SSA1-2002 [69].

Obtención de muestras biológicas e inmunización de bovinos

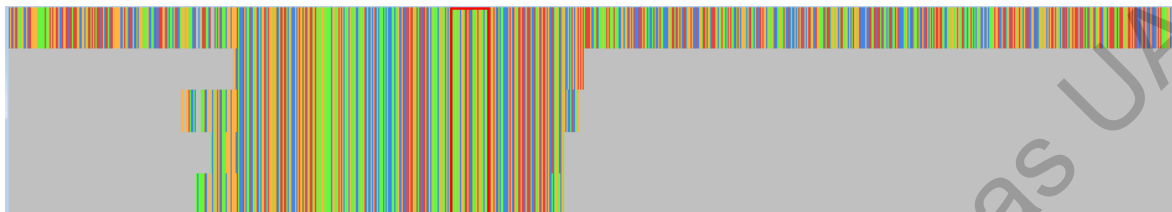
El manejo de animales, la toma de muestra y la administración de antígeno estará a cargo del Maestro en Ciencias y MVZ Roberto José Rodrigo Morales García el cual está capacitado y cuenta con cuatro años de experiencia en el manejo, cuidado y manipulación de ganado bovino.

Para este estudio se requerirá de dos bovinos ubicados en la división de la Facultad de Ciencias Naturales campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, a cada uno de ellos se le tomará una sola muestra de sangre de la vena yugular externa de un volumen mínimo de 500ml y máximo de 750ml utilizando como método de sujeción una manga de manejo. La primera muestra será tomada de un

solo bovino durante la fase I, una vez tomada la muestra se prescinde de este individuo. Durante la fase III de la estrategia experimental descrita en la metodología del presente documento, a un segundo individuo se le aplicarán 3 inmunizaciones de un mililitro de volumen con la proteína de estudio como antígeno, utilizando agujas de 18G de calibre y 1 pulgada de longitud. Las tres inmunizaciones tendrán espacio de una semana entre cada una de ellas y serán administradas por vía subcutánea en la zona del cuello entre el ganglio pre-escapular y retrofaríngeo, una vez concluido el esquema de inmunización se tomará una muestra sanguínea de la misma forma descrita con anterioridad, una vez tomada la muestra se prescinde del individuo. Las venopunciones serán tomadas por medio de dispositivos de extracción sanguínea con vacío utilizando agujas de calibre 18G y 2 pulgadas de longitud. Dentro del presente protocolo se toma en consideración la regla de las tres R, reduciendo al máximo el número de individuos y maximizando el refinamiento de las metodologías empleadas en el manejo de los bovinos. Dichos animales tendrán alimento que cumpla con sus necesidades fisiológicas y agua potable ad libitum, de igual forma el estabulamiento cuenta con condiciones propicias de tamaño(superficie entre 175 a 225 metros cuadrados), sombra (de 18 a 25 metros cuadrados), inclinación (libre de encharcamientos), alimentación (comedero de concreto tipo canoa y bebedero de pileta en la periferia del establo), higiene de suelo y área de descanso (concreto para evitar acumulación de lodo), así como enriquecimiento que propicien y favorezcan comportamientos apropiados de la especie. Dicho corral no contiene más de cinco individuos de manera simultánea. Todo lo anterior con fundamento establecido en el Código Sanitario para los Animales Terrestres, Capítulo 7: Bienestar animal, 2015 de la Organización Mundial de Sanidad Animal [70].

Apéndice II. Alineamiento de la secuencia del gen *chpv1.9*.

pENTER.ID-TOPO-CHPV19/1-3689
 Quimera_optimizada_BOBASIC/1-1107
 spv19-9-ensamble/1-1220
 CHPV19-4-ENS-AMBLE/1-1112
 Chpv19-9-ensamble/1-1151



Dirección General de Bibliotecas UNQ