



Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Ciencias Naturales  
 Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE EPÍTOPOS INMUNOGÉNICOS DE LA PROTEÍNA DE LA MEMBRANA APICAL 1 DE BABESIA BIGEMINA

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Presenta:**  
 Eduardo Vallejo Esquerra

**Dirigido por:**  
 Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

**SINODALES**

Nombre del Sinodal  
 Presidente

\_\_\_\_\_

Firma

Nombre del Sinodal  
 Secretario

\_\_\_\_\_

Firma

Nombre del Sinodal  
 Vocal

\_\_\_\_\_

Firma

Nombre del Sinodal  
 Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

Nombre del Sinodal  
 Suplente

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Nombre y Firma  
 Director de la Facultad

\_\_\_\_\_

Nombre y Firma  
 Director de Investigación  
 Posgrado

Centro Universitario  
 Querétaro, Qro.  
 Fecha  
 México

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue identificar epítomos conservados en la proteína AMA-1 y evaluar si anticuerpos contra péptidos sintéticos conteniendo epítomos, reconocen AMA-1 en *Babesia bigemina*. Usando herramientas de bioinformática, se seleccionaron secuencias conservadas que contenían epítomos B de la proteína AMA-1 y se eligió una secuencia de aminoácidos obtenida de forma sintética, utilizándose para generar anticuerpos en conejos. Los anticuerpos fueron evaluados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta en frotis de sangre obtenida de bovinos infectados experimentalmente con *Babesia bigemina*. Para determinar si anticuerpos de bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina* identifican el péptido diseñado, se utilizó la técnica de ELISA sándwich. Los resultados obtenidos en el análisis bioinformático permitieron seleccionar un péptido de diecinueve aminoácidos conservado en cepas de seis países. Anticuerpos de conejo contra este péptido reconocieron parásitos intraeritrocíticos mediante la inmunofluorescencia indirecta mientras que los sueros de bovinos naturalmente infectados no detectaron el péptido sintético mediante la técnica de ELISA. Se concluye que usando herramientas de bioinformática es posible diseñar epítomos con potencial para candidato vacunal y diagnóstico para el control de la babesiosis bovina.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, bioinformática, AMA-1, epítomo.

## SUMMARY

The objective of the present investigation was to identify conserved epitopes in AMA-1 protein and to evaluate if antibodies against synthetic peptides containing epitopes recognize AMA-1 in *Babesia bigemina*. Using bioinformatics tools, we selected sequences containing conserved B epitopes in AMA-1 protein and chose an amino acid sequence obtained synthetically used to generate antibodies in rabbits. The antibodies were evaluated with indirect immunofluorescence technique in smears of blood obtained from bovines infected experimentally with *Babesia bigemina*. To determine if antibodies of naturally infected bovines with *Babesia bigemina* identified the designed peptide, we utilize the ELISA sandwich technique. The results obtained in the bioinformatic analysis allowed us to select a nineteen amino acids peptide conserved in strains from six countries. Rabbit antibodies against this peptide recognized intraeritrocitic parasites with indirect immunofluorescence while the serum of naturally infected bovine didn't detect the synthetic peptide with the ELISA technique. We conclude that using bioinformatics tools it is possible to design epitopes with vacunal candidate potential and diagnose potential for the control of bovine babesiosis.

Key words: *Babesia bigemina*, bioinformatics, AMA-1, epitope.

## DEDICATORIAS

A mis padres:

José Eduardo y María Adolfina

Por haberme dado su ejemplo, confianza, paciencia y sustento a lo largo de mi formación como Médico Veterinario.

A mi Hermana:

Brenda

Por el cuidado, el apoyo y el ánimo que siempre me ha mostrado.

A mis Abuelos:

María José y Rosalba

Por darme ánimo y consejo de manera incondicional a lo largo de mi vida.

A todos mis compañeros de generación:

Por haberme brindado sus consejos y compañerismo a lo largo de la licenciatura.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, la cual ha contribuido para mi formación como Médico Veterinario Zootecnista y a la realización de este trabajo.

Al Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón por haber sido un gran profesor, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez por todas las veces que nos recibió en la UACM, por sus aportes para la realización de este trabajo y por su amable trato.

A Marisol Rocha por su ayuda con las pruebas diagnósticas para las pruebas de Inmunofluorescencia

Al Dr. Juan Diego Pérez de las Rosas por su apoyo, paciencia y amabilidad al recibirnos en el CENID-PAVET

Al Dr. Alfonso Falcón Neri por brindar su enseñanza y experiencia en la realización de las esplenectomías bovinas.

## Índice

INTRODUCCIÓN .....	1
Justificación.....	3
Hipótesis.....	5
Objetivo general. ....	5
Objetivos particulares.....	5
MARCO TEÓRICO .....	6
Definición.....	6
Taxonomía .....	6
Sinonimias.....	7
Agente Etiológico .....	7
Distribución Geográfica.....	8
Signos Clínicos.....	9
Ciclo de Vida.....	9
En el huésped bovino .....	9
En la garrapata vector .....	10
Periodo de Incubación.....	11
Patogenia .....	11
Lesiones Post Mortem.....	12
Diagnóstico.....	13
Diagnóstico Presuntivo.....	13
Diagnóstico Diferencial.....	13
Diagnóstico por Frotis Sanguíneo e Improntas .....	13
Diagnóstico por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) .....	14
Diagnóstico por Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) .....	15
Diagnóstico por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	15
Tratamiento .....	16
Proteína de la membrana apical 1 (AMA-1).....	18
Herramientas de Bioinformática.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS .....	20

Equipo:.....	20
Material de Cirugía:.....	21
Material de Monitoreo y Recolección de Sangre: .....	22
Material de Laboratorio: .....	23
Material Biológico .....	24
Reactivos:.....	25
Soluciones:.....	27
Diseño del péptido AMA-1 .....	28
Cepa de <i>Babesia bigemina</i> .....	29
Monitoreo clínico y detección de parásitos en sangre infectada .....	29
Extracción de ADN de <i>Babesia bigemina</i> a partir de eritrocitos infectados.....	30
Amplificación del gen <i>ama-1</i> en <i>Babesia bigemina</i> mediante PCR .....	31
Análisis de los amplicones por medio de electroforesis.....	32
Generación de Anticuerpos de conejo Anti-AMA-1 .....	33
Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.....	34
Prueba de ELISA sándwich .....	34
RESULTADOS .....	36
Determinación del péptido señal en la proteína AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	36
Determinación bioinformática de las regiones extracelular, transmembranal e intracelular de la proteína AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	37
Predicción de epítomos B .....	38
Predicción de la estructura tridimensional de AMA-1 y elección del epítomo B .....	42
Amplicón del gen interno de <i>ama-1</i> de <i>Babesia bigemina</i> .....	43
Análisis de anticuerpos anti AMA-1.....	43
Evaluación de sueros bovinos contra AMA-1 .....	44
DISCUSIÓN .....	46
CONCLUSIÓN.....	51
LITERATURA CITADA.....	53

## Índice de Imágenes

Figura 1. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen <i>ama-1</i> .....	31
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de AMA-1 en <i>Babesia bigemina</i> cepa México.....	36
Figura 3. Resultados de la predicción de epítomos B en el programa BcePred.....	39
Figura 4. Alineamiento de secuencia de los primeros 392 aminoácidos de AMA-1 en 6 cepas de <i>Babesia bigemina</i> .....	41
Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	42
Figura 6. Amplificación del gen <i>ama-1</i> mediante la técnica de PCR.....	43
Figura 7. Evaluación de la generación de anticuerpos anti AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> por medio de Inmunofluorescencia indirecta.....	44

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Primers utilizados para ampliar el gen <i>ama-1</i> de <i>Babesia bigemina</i> .....	32
Cuadro 2. Protocolo de la reacción de PCR incluyendo el volumen y los reactivos empleados.	32
Cuadro 3. Calendario de inmunización de los conejos con el péptido sintético AMA-1.....	33
Cuadro 4. Resultados para la predicción de epítomos B en el programa Antigenic.....	39
Cuadro 5. Resultados para la predicción de epítomos B en el programa ABCpred.....	40

## Índice de Gráficas

Gráfica 1. Determinación del péptido señal en la proteína AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	37
Gráfica 2. Determinación bioinformática de las regiones extracelular, transmembranal e intracelular de la proteína AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	38
Gráfica 3. Evaluación de sueros de bovinos naturalmente infectados a la presencia de anticuerpos contra un péptido de AMA-1 de <i>Babesia bigemina</i> .....	45

## INTRODUCCIÓN

La Babesiosis es causada por un parásito intraeritrocítico del género *Babesia*, el cual pertenece a un grupo de protozoos llamados comúnmente piroplasmas (Wiser 2009). Estos parásitos son causantes de grandes pérdidas en el ganado en áreas endémicas y pueden infectar a un amplio rango de animales domésticos, animales silvestres y ocasionalmente al hombre (Bock *et al* 2004). A pesar de haber un gran número de especies de *Babesia* distribuidas alrededor del mundo, todas tienen en común que utilizan como vector a la garrapata (Spickler, *et al* 2008, Bock *et al* 2004).

La babesiosis bovina es la enfermedad ocasionada por protozoarios más importante alrededor del mundo debido a las pérdidas directas que ocasiona en la producción (Radostits *et al* 2000). Estas pérdidas son grandes ya que los animales infectados mueren o atraviesan un largo periodo de recuperación, provocando pérdidas en la producción de leche y carne (Radostits *et al* 2000). Esta enfermedad es endémica en México y también ha causado grandes mermas en la ganadería bovina nacional, especialmente en las áreas tropicales y subtropicales del país (Rodríguez, *et al* 2000).

Para poder diagnosticar la enfermedad, comúnmente se realizan frotis sanguíneos, improntas en órganos (hígado, bazo, miocardio o riñones) e inmunofluorescencias indirectas (Barriga 2002, Bock 2004). Estas formas de diagnóstico son las más utilizadas de manera práctica, aunque experimentalmente se ha demostrado que pruebas como el Ensayo Inmonoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), la Inmunolectrotransferencia (Western Blot) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son más sensibles y específicas (Barriga 2002).

En muchos países, incluyendo a México, la enfermedad se previene por medio del control de la garrapata y programas de vacunación en el ganado (Quiroz 2005). El control del vector se realiza mediante baños garrapaticidas, mientras que para el control de *Babesia* se han preparado vacunas con cepas vivas atenuadas, las cuales se producen a partir de la sangre de animales previamente infectados. (Bock 2004). La problemática de estas dos medidas de control radica en que la resistencia de las garrapatas a los acaricidas es cada vez mayor y la vacunación con cepas vivas puede presentar la posibilidad de inocular otros agentes patógenos hacia los bovinos (Mosqueda 2007 y Bock 2004). Debido a que las vacunas actuales presentan serias desventajas, se ha propuesto la utilización de vacunas con subunidades parasitarias, derivadas de antígenos del parásito o como proteínas recombinantes (Jenkins 2001). Sin embargo el diseño de vacunas con subunidades se ha visto obstaculizado debido al gran polimorfismo en algunas proteínas parasitarias (Jenkins 2001, Torina, *et al* 2009).

Debido a que *Plasmodium* y *Babesia* pertenecen al mismo phylum, estos protozoarios comparten varios mecanismos para invadir células rojas; entre ellos la proteína transmembranal AMA-1 que ya ha sido caracterizada en *Plasmodium* spp. (Cooke, *et al* 2001, Wiser 2009, Torina *et al* 2009). Estudios con anticuerpos anti AMA-1 contra *Plasmodium knowlesi* han demostrado detener la invasión del protozoario hacia las células rojas y por ende AMA-1 se considera un fuerte candidato para la producción de vacunas con subunidades parasitarias contra malaria (Mitchell *et al* 2003). Sin embargo en *Babesia* sp. no se sabe si esta proteína tiene la misma función y si AMA-1 genera anticuerpos que reconocen epítopes B expuestos.

## Justificación

Las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo se han considerado por su riqueza como zonas donde se puede cultivar y producir alimento a la población humana. Esto es debido a la alta fertilidad que tiene el suelo para facilitar el crecimiento de forrajes, necesarios para la ganadería. Sin embargo, la presencia de enfermedades que afectan a los animales, evitan aprovechar al máximo el potencial que tienen estas áreas (Fernández *et al* 1995). Al menos 1.3 billones de animales domésticos están en riesgo de contraer Babesiosis, y la mayoría de la población mundial bovina, estimada en  $1.2 \times 10^9$  de cabezas está potencialmente expuesta a una o más especies de *Babesia* (Solorio *et al* 1997).

El impacto económico que tiene la babesiosis en la industria ganadera es muy grande haciéndola menos rentable debido a: costos de medicamentos, mortalidad, abortos, costos de medidas de control para garrapatas, vacunas, pérdida en la producción de leche y carne, y limitación en la exportación de ganado (Bock 2004). Debido a lo anterior, esta enfermedad es considerada como una seria limitante para la introducción de razas especializadas para la producción de carne y leche en zonas potencialmente forrajeras como son el trópico y subtrópico del país (Fernández, *et al* 1995).

El control de protozoarios de *Babesia* por medio de vacunación ha ayudado a controlar la incidencia de babesiosis bovina, sin embargo este método se considera riesgoso debido a que las vacunas que se utilizan actualmente requieren de cepas vivas y pueden presentar una virulencia atenuada en el bovino; además de existir el riesgo de contaminación con otros agentes patógenos (Bock 2004). Actualmente se intentan diseñar vacunas contra la babesiosis bovina que utilicen subunidades parasitarias y no cepas vivas de *Babesia*, sin embargo esto se ha complicado debido al gran polimorfismo que tienen algunas proteínas; especialmente las que se expresan en la superficie del parásito (Jenkins 2001 Torina *et al* 2009).

Actualmente se han investigado proteínas que son fuertes candidatos vacunales en otras especies del phylum *Apicomplexa*. Entre las proteínas más destacadas se encuentra la proteína de la membrana apical 1 (AMA-1) ya estudiada en *Plasmodium falciparum* y que ha demostrado estar conservada entre diferentes cepas (Stowers *et al* 2002, Mitchell *et al* 2003 Gaffar *et al* 2004, Kusi K.A 2010).

Hasta la fecha, no hay una vacuna de subunidades efectiva disponible comercialmente para *Babesia* spp (Bock 2004). Por lo tanto el análisis de regiones expuestas y conservadas de la proteína AMA-1 en *Babesia bigemina* permitirá proponer péptidos para el desarrollo de vacunas más seguras.

## **Hipótesis.**

Usando herramientas bioinformáticas, se pueden diseñar péptidos que contengan epítomos B en la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina* que son reconocidos por anticuerpos.

## **Objetivo general.**

Diseñar un péptido que contenga epítomos B en la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina* que sea reconocido por anticuerpos.

## **Objetivos particulares.**

- 1.- Seleccionar un péptido en la proteína AMA-1 que contenga epítomos B utilizando herramientas de bioinformática.
- 2.- Amplificar el gen *ama-1* mediante la técnica de PCR.
- 3.- Generar anticuerpos contra el péptido diseñado de AMA-1 que reconozcan a *Babesia bigemina* por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.
- 4.- Evaluar si sueros de bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina* identifican el péptido diseñado de AMA-1 por medio de la técnica de ELISA.

## MARCO TEÓRICO

### Definición

La babesiosis bovina es una infección parasitaria causada por protozoarios del género *Babesia* y transmitida por garrapatas de la familia *Ixodidae*. Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por la presencia de fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia en el ganado bovino. (Quiroz 2005, McCosker 1981).

### Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Babesia* según Levine N.D. en 1982 es la siguiente:

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

Hasta 1982 se han descrito más de 70 especies de *Babesia*, de las cuales se considera que sólo 18 causan enfermedad en diferentes mamíferos domésticos y únicamente se conocen los vectores de 15 de ellas (Levine 1982).

Las tres especies que más se encuentran en el ganado bovino son: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens* (Spickler *et al* 2008). Otras especies adicionales de *Babesia* que también pueden infectar al ganado incluyen a: *Babesia major*, *Babesia ovata*, *Babesia occultans* y *Babesia. Jakimovi* (Barros 2008).

## **Sinonimias**

Otros nombres con los que se le conoce a la enfermedad de babesiosis bovina son:

Fiebre del Agua Roja, Fiebre Bovina Transmitida Por Garrapatas, Fiebre de Texas, Piroplasmosis, Ranilla y Tristeza (Blood 2002, Quiroz 2005)

## **Agente Etiológico**

A pesar del gran número de especies descritas de *Babesia*, pocas especies han sido reportadas en el continente americano (Barriga 2002). Dentro de las especies de mayor importancia en bovinos, están *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*, aunque las dos especies que causan el mayor impacto económico en la industria ganadera a nivel mundial y nacional son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* que además son las únicas que se encuentran distribuidas en América (Spickler *et al* 2008, Bock *et al* 2004, Vignau 2005, Fernández *et al* 1995, Barriga 2002).

### *Babesia bigemina*

A *Babesia bigemina* se le cataloga dentro de las especies grandes de *Babesia* debido a que los merozoitos ocupan un espacio mayor que el radio de los eritrocitos (Chauvin *et al* 2009). Los trofozoitos de *Babesia bigemina* miden de 4 a 5 micras de largo por 2 micras de ancho cuando se encuentran en su forma pareada (Quiroz 2005).

## Distribución Geográfica

*Babesia bigemina* se distribuye en países que se encuentran en los paralelos 32° sur y 40° norte con respecto al ecuador, siendo una especie endémica en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (McCoscker 1981, Bock 2004). La amplia distribución de este parásito es debido a la disposición de sus vectores, dentro de los cuales se encuentran las garrapatas: *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus*, *Boophilus australis*, *Boophilus calcaratus*, *Boophilus decoloratus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Rhipicephalus bursa* (Quiroz 2005). A pesar del gran número de vectores, la garrapata *Boophilus microplus* es el vector que tiene mayor importancia y el de mayor distribución en el mundo (Bock *et al* 2004).

En México la babesiosis bovina está restringida a las regiones tropicales y subtropicales del país, cubriendo el 51.5% del territorio nacional, siendo transmitida por garrapatas *Boophilus microplus*, (Mosqueda 2007, Fernández *et al* 1995). A pesar de que la babesiosis sólo se localiza en lugares donde se encuentran las condiciones climáticas para la proliferación del vector, la Campaña Nacional Contra la Garrapata *Boophilus* spp (NOM-019-ZOO-1994) señala que la situación zoonosanitaria de los estados que se encuentran como áreas en fase de control son: Baja California, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Zacatecas. Mientras que los estados que la Campaña considera como territorios libres son: Baja California, Sonora, Aguascalientes, Tlaxcala y Distrito Federal. (SENASICA<sup>a</sup> 2010).

## Signos Clínicos

La babesiosis bovina ocasionada por *Babesia bigemina* puede ocurrir de forma aguda, subaguda, crónica o asintomática; siendo ésta última característica en los animales jóvenes (Barros 2008, Blood 2002). En todos los demás casos, los signos clínicos observados son: aparición repentina de fiebre alta de hasta 41 C°, abortos debido al estado febril, taquicardia, taquipnea, mucosas en un inicio congestionadas, después pálidas por la hemolisis y posteriormente ictéricas por la destrucción masiva de eritrocitos, hemoglobinuria de un color rojo marrón con presencia de espuma, depresión, debilidad, abatimiento, anorexia, ausencia de rumia, descenso en la producción láctea y posteriormente la muerte (Barros 2008, Blood 2002, Radostits *et al* 2000). La mayoría de los animales que cursan la enfermedad de manera severa, mueren en las primeras 24 horas, sin embargo aquellos que sobreviven a la infección se recuperan gradualmente de la anemia y la emaciación (Radostits *et al* 2000).

## Ciclo de Vida

*Para que Babesia bigemina* pueda completar su ciclo de vida, necesita de un huésped vertebrado (bovino) en el cual se lleva a cabo la reproducción asexual, y uno no vertebrado (garrapata) donde ocurre la reproducción sexual del protozooario (Homer 2000, Smith 1978).

### En el huésped bovino

*Babesia bigemina* tiene un ciclo de vida típico del phylum Apicomplexa, caracterizado por las fases de: merogonia, gametogonia y esporogonia (Wiser 2009). El ciclo en el huésped vertebrado comienza en el momento que los esporozoítos son inoculados mientras la garrapata se alimenta de la sangre del bovino (Wiser. F.M. 2009, Gutierrez 2000). El esporozoíto al entrar al torrente sanguíneo invade a los eritrocitos; aunque la invasión del esporozoíto al eritrocito todavía no es muy clara, se piensa que es muy similar a la realizada por el merozoíto (Mosqueda *et al*. 2002). Una

vez que el esporozoíto se encuentra dentro de las células rojas del huésped, este se transforma a trofozoíto. Posteriormente los trofozoítos se dividen por fisión binaria y dan origen a dos nuevos merozoítos que ya tienen desarrollado su complejo apical (Quiroz 2005 y Wiser 2009). Los dos merozoítos maduros, salen de los eritrocitos para después infectar a otros eritrocitos (Chauvin 2009). Este proceso de multiplicación asexual eritrocítica continúa en el hospedero vertebrado hasta que los eritrocitos infectados son ingeridos por garrapatas (Wiser 2009, Riek 1963).

### En la garrapata vector

Después de que la garrapata ingiere sangre infectada de bovino, hay destrucción rápida de los eritrocitos, liberando así las formas intracelulares de *Babesia* en el lumen intestinal de la garrapata (Smith 1978). Solo una pequeña proporción de las formas sanguíneas de *Babesia* ingeridas son infectivas para la garrapata, ya que la mayor parte de estas se degradan debido a procesos digestivos dentro del vector (Riek, 1964, Smith 1978). Los gametocitos son las únicas formas de *Babesia* que siguen teniendo un desarrollo posterior y son los responsables de iniciar la infección en la garrapata (Rudzinska 1976, Wiser 2009). Después de la ingestión de eritrocitos infectados, los gametocitos atraviesan por cambios morfológicos en el intestino debido a variaciones en la concentración de gases y en la temperatura, modificándose hasta convertirse en cuerpos radiados o Strahlenkörper; los cuales son conocidos como las fases sexuales de *Babesia* (Wiser 2009, Chauvin *et al* 2009, Rudzinska *et al* 1983, Riek, 1964). Los cuerpos radiados se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata para formar al cigoto; el cual penetra en las células intestinales, sufriendo una división meiótica para cambiar a un estadio motil llamado ooquineto (Chauvin *et al* 2009, Mosqueda *et al* 2004). Los ooquinetos invaden las células del epitelio intestinal donde inician la esporogonia, originando gran cantidad de esporoquinetos, también llamados vermículas o quinetos (Vignau 2005, Bock *et al* 2004). Los quinetos escapan del epitelio intestinal hacia la membrana basal para tener acceso a la hemolinfa, invadiendo nuevos tejidos dentro de la garrapata como los hemocitos, las células de los tubos de Malpighi, las fibras musculares, los oocitos y las células de las glándulas salivales (Bock *et al* 2004, Vignau 2005, Chiodini 2009). En las hembras de garrapatas

adultas, la invasión de los oocitos da inicio a la transmisión transovárica (Bock *et al* 2004, Chauvin *et al* 2009). En el huevo de la garrapata mientras el tejido larval se organiza, se lleva a cabo un ciclo de multiplicación de babesias; aumentando así el número de parásitos en el embrión (Riek, 1964). Los esporoquinetos migran a las células de las glándulas salivares, donde se lleva a cabo el cambio a la forma infectante de esporozoíto, el cual es inoculado en el hospedero bovino en el momento que la garrapata se alimenta de sangre (Chauvin *et al* 2009, Gutierrez 2000, Gállego 2007).

### **Periodo de Incubación**

Los signos clínicos de la babesiosis bovina causada por *Babesia bigemina* normalmente aparecen de 2 a 3 semanas después de la infestación por garrapatas. Después de que se inoculan los esporozoítos al torrente sanguíneo del bovino, el periodo de incubación es de 4 a 5 días (Spickler, *et al* 2008).

### **Patogenia**

*Babesia bigemina* no se considera una especie muy patógena dentro del grupo de enfermedades transmitidas por garrapatas, pero tiene gran importancia debido a la presencia de casos mortales en el ganado (Solorio *et al* 1997).

La babesiosis bovina es reconocida por la presencia de anemia hemolítica en los bovinos, que normalmente se muestra como una anemia macrocítica hipocrómica (Bock 2004). La enfermedad puede tener un curso benigno con una rápida recuperación o progresar a una fase que produce una condición debilitante y posteriormente la muerte (Solorio *et al* 1997). El principal factor que ocasiona los casos de muerte en los bovinos está relacionado con el cuadro anémico y la anoxia ocasionada por el descenso de eritrocitos en el torrente sanguíneo (Solorio *et al* 1997). Este cuadro es ocasionado debido a que *Babesia bigemina* ejerce una acción

traumática cuando sale de las células sanguíneas en forma de merozoítos, provocando una hemólisis intravascular que se manifiesta en anemia, ictericia y debilidad en el huésped (Bock 2004, Salas 2000, Quiroz 2005).

### **Lesiones Post Mortem**

Los hallazgos a la necropsia en ganado que muere de babesiosis por *Babesia bigemina* incluyen lesiones relacionadas con hemólisis intravascular (Barros 2008). Entre los hallazgos más comunes debido a la hemólisis y anemia se observan: la vejiga con orina de un color rojo oscuro, las membranas mucosas pálidas o ictericas, sangre acuosa de menor densidad, intensa coagulación intravascular, contenido rectal icterico o hemorrágico, serosa intestinal de color rosa oscuro debido a la imbibición de la hemoglobina y los tejidos subcutáneo, adiposo abdominal y el omento presentan un color amarillento debido a la ictericia (Barros 2008, Quiroz 2005 Blood 2002, Spickler, et al 2008). También se encuentra hepatomegalia, nefromegalia, esplenomegalia y con poca frecuencia edema pulmonar (Barros 2008, Blood 2002, Bock 2004, Spickler, et al 2008).

Dentro de las lesiones histológicas se encuentran: necrosis renal asociada con proteinosis tubular, hígado con infiltración grasa y/o necrosis centrolobular debido a hipoxia, y eritrofagocitosis en hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea (Barros 2008).

## Diagnóstico

### Diagnóstico Presuntivo

La presencia de fiebre, anemia, ictericia y hemoglobinuria son signos clínicos que sugieren la presencia de babesiosis en ganado que se encuentra en áreas enzoóticas. Los signos clínicos de enfermedades que sugieren una enfermedad hemolítica junto con los hallazgos a la necropsia y la presencia del vector, permiten un diagnóstico presuntivo sólido dirigido a la babesiosis bovina (Barros 2008, Solorio *et al* 1997).

### Diagnóstico Diferencial

Debido a que la babesiosis tiene similitud con enfermedades que causan anemia hemolítica, se tienen que considerar en el diagnóstico diferencial las siguientes enfermedades: Eperitrozonosis, Leptospirosis, Hemoglobinuria Bacilar, Anaplasmosis, Intoxicación por S-metil-L-cisteína sulfóxido e Intoxicación por cobre. (Blood 2002, Spickler *et al* 2008).

### Diagnóstico por Frotis Sanguíneo e Improntas

El método comúnmente usado para identificar *Babesia* spp en animales infectados es mediante el examen microscópico de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Bock 2004). Esta técnica es uno de los pocos métodos diagnósticos que se utilizan en México de manera oficial para confirmar el diagnóstico de babesiosis bovina (SENASICA<sup>b</sup> 2010, NOM-019-ZOO-1994). Para la realización de frotis sanguíneos, la NOM-019-ZOO-1994 sugiere que la sangre sea obtenida de la vena caudal o auricular.

Normalmente el frotis sanguíneo es una técnica confiable, para la detección de infecciones agudas, no lo es para la detección de portadores asintomáticos donde las parasitemias son bajas debido a la baja sensibilidad de esta prueba (Bock 2004, Mosqueda 2007).

También se puede realizar el diagnóstico por medio de improntas en tejidos de: corteza cerebral, riñones, hígado, bazo y médula ósea, sin embargo en México sólo tienen validez diagnóstica las improntas en cerebro y riñón (Spickler, et al 2008, NOM-019-ZOO-1994).

#### Diagnóstico por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Otra técnica diagnóstica utilizada en México para la detección de babesiosis bovina es la inmunofluorescencia indirecta (SENASICA<sup>b</sup> 2010). Esta prueba inmunológica es utilizada ampliamente en México para detectar la presencia de *Babesia* spp. La IFI consiste en detectar la presencia de anticuerpos específicos contra un determinado microorganismo, mediante un anticuerpo anti-anticuerpo marcado con un fluorocromo (Bock 2004, Florentino S.G 1994, Tortora *et al* 2007).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene la desventaja de requerir formas intraeritrocíticas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* como antígenos para poder distinguir entre las dos diferentes especies, lo cual es muy difícil de obtener y procesar (Mosqueda 2007). También es necesaria la capacitación de personal especializado y requiere mucho tiempo para poder interpretar las muestras, por lo que el análisis de varios sueros es complicado y tardado (Mosqueda 2007, Florentino S.G 1994).

### Diagnóstico por Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

La técnica de ELISA indirecto permite identificar anticuerpos contra antígenos específicos mediante la interacción antígeno anticuerpo y la acción de una enzima ligada a un anticuerpo secundario (Tortora *et al* 2007). Esta prueba permite detectar la presencia de anticuerpos contra *Babesia* spp.; no obstante en México aún no existe un ELISA definido para el diagnóstico de *Babesia bigemina* (Goff *et al* 2008, Spickler *et al* 2008, NOM-019-ZOO-1994). Esta problemática se debe a que los anticuerpos contra estos protozoarios tienen baja especificidad, sin embargo se están proponiendo nuevas soluciones para poder diferenciar entre *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* por medio de nuevos antígenos para su implementación en ELISAs (Bock 2004, Goff *et al* 2008, Spickler *et al* 2008).

La técnica de ELISA es una prueba rápida, se pueden procesar un gran número de muestras y no se requiere de una capacitación extensa para la interpretación de los resultados, debido a que la lectura es por medio de un escáner computarizado (Tortora *et al* 2007 Florentino S.G 1994). A pesar de que la técnica de ELISA tiene numerosas ventajas sobre otras pruebas diagnósticas, actualmente esta prueba no tiene validez de forma oficial para el diagnóstico de babesiosis bovina en México (NOM-019-ZOO-1994).

### Diagnóstico por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La babesiosis bovina puede diagnosticarse por medio de la prueba de PCR, teniendo como ventaja la posibilidad de detectar y diferenciar entre *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (Spickler *et al* 2008). La prueba de PCR es una técnica que permite amplificar muestras pequeñas de DNA de modo que sea posible confirmar la presencia del agente por medio de electroforesis en un gel de agarosa (Pestana *et al* 2010).

Se considera que el diagnóstico por medio de PCR es mucho más sensible que todas las pruebas antes mencionadas, debido a que esta técnica puede identificar niveles de parasitemia de hasta 0.000001%; el equivalente a 3 eritrocitos infectados en 20 µl de muestra (Figuroa *et al* 1994). Desafortunadamente en México, este método aún no se aplica de manera oficial para el diagnóstico de babesiosis (NOM-019-ZOO-1994).

## Tratamiento

Para poder tratar exitosamente la babesiosis bovina, se requiere de un diagnóstico temprano seguido de una correcta e inmediata administración de medicamentos. Los medicamentos de uso más común para el tratamiento de babesiosis son:

FÁRMACO	DOSIS
Aceturato de Diminazeno	3-5 mg/kg (Intramuscular)
<i>Imidocarb</i>	5-10 mg/kg (Intramuscular)
<i>Amicarbalida</i>	5-10 mg/kg (Intramuscular)

(Barros 2008)

Desafortunadamente el tratamiento farmacológico no tiene ningún efecto si los bovinos presentan debilitamiento producido por la anemia, ya que los fármacos controlan la infección pero no eliminan por completo al parásito; haciendo que el diagnóstico temprano sea esencial para el tratamiento exitoso de la babesiosis bovina (Barriga 2002, Barros 2008). Otra inquietud que existe por el uso de medicamentos

para el control de la babesiosis es su efecto residual en la leche y en la carne, haciendo más controvertido su uso por la creciente preocupación acerca de los residuos farmacológicos en los alimentos de consumo humano (Spickler et al 2008).

### **Vacunas Contra *Babesia***

El método más común para la inmunopprofilaxis de babesiosis en áreas enzoóticas es la inoculación de cepas vivas, la cual requiere de cepas vivas atenuadas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (Bock 2004, Spickler et al 2008, Palmer y McElwain 1995). La mayor parte de la producción de estas vacunas para el ganado se lleva a cabo en instalaciones apoyadas por el gobierno, principalmente en Australia, Argentina, Sudáfrica, Israel y Uruguay (Bock 2004, Bock et al 2004).

La vacunación de animales susceptibles con inóculos de parásito virulento o atenuado, ha sido un abordaje exitoso para la vacunación contra la babesiosis; sin embargo las vacunas vivas atenuadas presentan notorias desventajas entre las cuales están la necesidad de estar constantemente almacenadas en frío, su corta vida de anaquel, la probabilidad de causar morbilidad y mortalidad en animales vacunados, riesgo de contaminación con otros agentes patógenos y la posibilidad de que los parásitos atenuados reviertan a una virulencia mayor (Jenkins 2001, Bock 2004, Alvarez et al 2004, Mosqueda 2007). Debido a que actualmente las vacunas contra babesiosis bovina no son seguras y presentan diversos inconvenientes, una alternativa para lidiar con estas desventajas es el desarrollo y utilización de vacunas con subunidades parasitarias (Jenkins 2001, Alvarez et al 2004, Mosqueda 2007). Avances en el entendimiento del mecanismo de inmunidad de los protozoarios y el desarrollo de herramientas moleculares permiten el desarrollo de vacunas hechas con subunidades de antígenos, aunque se debe de considerar la variación antigénica entre diferentes cepas debido a que una vacuna hecha con una subunidad variable podría no actuar contra cepas heterólogas (Jenkins 2001).

## Proteína de la membrana apical 1 (AMA-1)

AMA-1 es una proteína transmembranal de tipo I con tres estructuras características: un ectodominio N-terminal rica en cisteína, un dominio transmembranal hidrofóbico y una cola citoplasmática C-terminal (Gaffar *et al* 2004). Esta proteína se localiza en el complejo apical de los merozoítos y es secretada de los micronemas permitiéndole al merozoíto extracelular infectar las células sanguíneas (Soldati *et al* 2001, Howell *et al* 2003). Cuando los merozoítos tienen contacto con los eritrocitos, requieren reorientar su complejo apical para ponerlo en contacto con la membrana plasmática del eritrocito (Soldati *et al* 2001). La proteína AMA-1 permite la reorientación del complejo apical del merozoíto para su posterior invasión y replicación en las células sanguíneas (Mitchell *et al* 2003).

A pesar de que la mayoría de los estudios de AMA-1 provienen de investigaciones con *Plasmodium* spp, los miembros del phylum *Apicomplexa* coinciden en el método de invasión de células blanco (Stowers *et al* 2002, Mitchell *et al* 2003, Gaffar *et al* 2004 Torina *et al* 2009). Aunado a esto, homólogos de la proteína AMA-1 además de estar presentes en todas las especies de *Plasmodium*, también se encuentran en otros apicomplexas como *Babesia* (Howell *et al* 2003, Gaffar *et al* 2004, Torina *et al* 2009). Estudios con AMA-1 en *Babesia bovis* han mostrado que anticuerpos anti-AMA-1 contra el dominio N-terminal pueden reconocer a la proteína recombinante de AMA-1 y a merozoítos de *Babeisa bovis* (Gaffar *et al* 2004). También se mostró que hay una disminución en la capacidad de invasión de células rojas por parte de los merozoítos de hasta un 65% cuando anticuerpos anti-AMA-1 se incuban con eritrocitos y merozoítos de *Babesia bovis* en un ensayo de invasión (Gaffar *et al* 2004).

Actualmente no solo se están haciendo estudios en *Plasmodium* spp para saber cómo funciona la proteína AMA-1 en la invasión de los merozoítos, también se está investigando su potencial como candidato vacunal para su inclusión como posible vacuna de subunidades parasitarias contra la enfermedad de malaria en humanos (Stowers *et al* 2002, Mitchell *et al* 2003, Kusi K.A 2010).

## **Herramientas de Bioinformática**

La bioinformática se puede definir como la unión entre las ciencias biológicas e informáticas, la cual permite almacenar, recuperar, manipular y distribuir información relacionada con macromoléculas como el DNA, RNA, y proteínas mediante el uso de bases de datos y programas computacionales (Luscombe *et al* 2001, Xiong 2006).

Anteriormente la informática era una disciplina en la cual matemáticos, estadísticos, científicos computacionales e ingenieros desarrollaban tecnología para manejar y apoyar campos de información destinados a las ciencias de la salud (Mount 2004). Sin embargo ahora la bioinformática organiza gran cantidad de datos biológicos relacionado con los genomas; teniendo un enfoque aplicado a varias áreas de investigación como la biología molecular, la agricultura, la medicina, la farmacología, entre otras (Mount 2004).

El objetivo de la bioinformática es entender cómo funciona la célula a un nivel molecular mediante el análisis de información estructural y secuencias moleculares (Xiong 2006). La razón por la cual las funciones celulares se pueden entender mediante el análisis de estas secuencias es debido a que todas las funciones celulares son realizadas por proteínas cuyas capacidades y características son determinadas por sus secuencias moleculares (Xiong 2006). El DNA al ser el componente básico para la traducción de proteínas, toma un papel esencial para la comprensión del funcionamiento de las células, en la cual la bioinformática puede ser una herramienta muy útil (Xiong 2006).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Lista de equipo, material, reactivos y soluciones

### Equipo:

Agitador Orbital. Marca Felisa, No de Catálogo: FE-315
Agitador Vortex. Marca Daigger, Vortex Genie 2, Cat.22220A
Autoclave. Marca Felisa, No de Catálogo: FE-397
Balanza de Precisión. Marca Ohaus, Adventurer Pro, No de Catálogo: AV213C
Baño María a 60°C. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371
Cámara de electroforesis. Marca Bio-Rad, No. De Catálogo 170-4467
Campana de flujo laminar. Marca Labconco No. de Catálogo: 3620804 DELTA
Centrífuga. Marca Sorvall, Legend Mach 1.6 R, No. de Catálogo:75004337
Congelador a -20°C. Marca Frigidaire. No de Catálogo: FGCH25M8LW
Fotodocumentador. Marca Bio-Rad Doc XR Model Universal Hood, No. de Catálogo200902015716
Fuente de poder para Electroforesis. Marca Bio-Rad, No. De Catálogo 165-5052
Incubadora. Marca felisa. No de catálogo: FE-133
Lector de ELISA. Marca Bio-Rad imark microplate reader, No. de Catálogo: 11437
Microcentrífuga para hematocrito.

<p>Marca Clay Adams, Autocrit II Mod. 0574</p>
<p>Microcentrifuga Para viales de 1.5ml.          Marca Eppendorf, Centrifuga 5418, No. de Catálogo: 22331</p>
<p>Microscopio binocular para campo claro.          Marca Carl Zeiss Referencia de Catálogo: Axiostar Plus</p>
<p>Microscopio Laser Confocal.          Marca Leica TCS-SP2</p>
<p>Platina.          Marca CIMAREC, No. de Catálogo: SP131325</p>
<p>Potenciometro.          Marca Hanna, No. de Catálogo 736-HI 2211</p>
<p>Refrigerador.          Marca Mabe, No de Catálogo: RM43S07B.BLA</p>
<p>Termociclador C1000.          Marca Bio-Rad, No. de Catálogo 185-1096</p>
<p>Ultracentrífuga.          Marca IES centra MP4R</p>

**Material de Cirugía:**

<p>Alcohol al 70%.          Alcoholera del centro, No Cat: 750 13807 00113</p>
<p>Algodón.          Marca Zuum, No. de Catálogo: 1224</p>
<p>Botón grande de 2cm de diámetro</p>
<p>Cloruro de Benzal Rojo.          Marca Antibenzil de Farmaceuticos Altamirano.</p>
<p>Cuerdas para sujeción de bovino.          Marca Monitex de Industrial Sisalara, No. de Catálogo: ME-M58</p>
<p>Diaceturato 4-4' diazoaminodibenzamidina trihidratada.          Marca Ganaseg de Novartis. No. De Registro: MB7605000</p>
<p>Instrumental quirúrgico de cirugía general</p>

Jabón quirúrgico Verde. Marca Antibenzil de Farmaceúticos Altamirano
Jeringas de 5ml, 10ml y 20ml. Marca TERUMO. No Cat: 389701002736-01, 389701002712-01 y SS+20ES1
Lidocaína 2.0 g/100 ml. Marca Xylocaína de AstraZeneca. No. de Catálogo: 0186-0232.
Nylon calibre 1. Marca Ethilon, No. de Catálogo: 489T
Penicilina G procaínica, penicilina G sódica, estreptomina y flumetasona. Marca Flumivet 80 de VetilabInternacional.
Xilacina al 10%. Marca Procin de PISA
Yodopovidona. Marca Germisin de Farmaceúticos Altamirano.

### **Material de Monitoreo y Recolección de Sangre:**

Agujas vacutainer. Marca Becton Dickinson Eclipse, No. de Catálogo: 368607
Bolsa para recolección de sangre. Marca Becton Dickinson Vacutainer Safety lok. No. de Catálogo: 367283
Camisa para Vacutainer. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 364893
Matraz Kitazato de 500 ml. Marca Pyrex
Perlas de vidrio
Portaobjetos. Marca Pearl, No. de Catálogo: 7102
Termómetro 10047 rectal de mercurio. Marca Le Roy, No. de Catálogo: 729513100471

Tubos capilares de vidrio con heparina. Marca Fisher, No. de Catálogo: 02-668-25
Tubos Vacutainer de 6ml sin anticoagulante. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 367815
Tubos Vacutainer de 6ml con heparina. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 367878

**Material de Laboratorio:**

Aceite de inmersión. Marca Zeiss, Immersol 518N, No. de Catálogo 000000-1111-806
Caja de Coplin. Marca Wheaton. No de Catálogo: 900470
Cámara de incubación
Expert Portable Pipet Aid. Marca BD Falcon, No. de Catálogo: 357590
Frasco 250ml, 300ml, 500ml y 1l. Marca Pyrex
Gradillas para tubos de 15 ml, 50ml y 1.5ml
Guantes de nitrilo. Marca Kimberly Clark, No de Catálogo: N220M
Marco para ELISA. Marca Becton Dickinson, No de catálogo 353913
Matríz de Erlenmeyer. Marca Pyrex
Micropipetas de 10µl, 20µl, 200µl y 1000µl. Marca Gilson
Pipeta multicanal de 300µl. Marca High Tech Lab, No. de Catálogo: 5424
Pipetas desechables de 10ml y de 25ml. Marca Falcon, No de catálogo: 356550 y 357535
Pizeta
Portaobjetos. Marca Pearl, No. de Catálogo: 7102

Pozos para ELISA. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 353279
Probetas de 250ml, 500ml y 1l. Marca Pyrex
Puntillas de 10µl, 20µl, 200µl y 1000µl. Marca Molecular BioProducts, ART. No de catálogo: 2139, 2149, 2069 y 2275
Toallas interdobradas. Marca Sanitas, No de catálogo: 92231
Tubos de propileno libres de nucleasas y estériles de 15 ml y 50ml. Marca Falcon. No de Catálogo: 352097 y 352073
Vaso de precipitados de 100ml, 250ml, 500ml. Marca Pyrex
Viales de 1.5 ml. Marca Fastgene, No de catálogo: KJ306
Viales para PCR de 0.5ml. Marca Thistle scientific. No de catálogo: AX-PCR-05D-B
Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Marca Promega

### **Material Biológico**

Bovinos experimentales
<i>Babesia bigemina</i> Cepa Salto
<i>Babesia bigemina</i> Cepa Xochitepec
Conejos experimentales
Péptido sintético AMA-1 (TGVCRLNATPTCLIINAG)
Suero de Bovinos Infeccionados con <i>Babesia bigemina</i>
Suero de Conejo Anti-AMA-1

**Reactivos:**

Acetona. Marca: J.T. Baker, No. de Catálogo: 9006-03
Ácido clorídrico. Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 9535-05
Ácido Xanturénico. Marca Sigma, No. de Catálogo: X-3250
Adyuvante Montanide ISA 070. Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: f5506
Agarosa. Marca invitrogen Ultra pure, No. de Catálogo: 15510-027
Agua destilada
Agua libre de nucleasas. Marca Promega
Alcohol metílico absoluto. Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 9093-68-C
Antibiótico-antimicótico. Marca Invitrogen No. de Catálogo: 15240-062
Anticuerpo secundario (FITC donkey anti-rabbit IgG). Laboratorios Jackson Inmuno Research, No. de Catálogo: 711096152
Conjugado Peroxidase-Conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Bovine IgG (H+L)
Etanol desnaturalizado. J.T. Baker, No. de Catálogo: 9014-02
Ácido sulfúrico. Marca Sigma, No. de Catálogo:320501
Hidroxido de potasio. Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: 221473-500g
Hojuelas de sosa. Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 3722-01
Isopropanol. Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 9080-01
KCl.

<p>Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 3040-01</p>
<p>Fosfato biácido de Potasio(<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>).</p> <p>Marca Química dinámica SA de CV, No. de Catálogo: 95300</p>
<p>Marcador de Peso molecular</p>
<p>Medio M199.</p> <p>Marca Sigma, No. de Catálogo: M-5017</p>
<p>Metanol.</p> <p>Marca Productos quimicos Monterrey SA, No. de Catálogo: 06122</p>
<p>Carbonato de Sodio (<math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math>).</p> <p>Marca J.T.Baker, ,No. de Catálogo: 3602-01</p>
<p>Fosfato Dihidrogenado de Sodio (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>).</p> <p>Marca Productos químicos Monterrey SA, No. de Catálogo: 35932</p>
<p>Cloruro de Sodio.</p> <p>Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 3624-01</p>
<p>Fosfato monohidrato de Sodio (<math>\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}</math>).</p> <p>Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 3818-01</p>
<p>Bicarbonato de Sodio (<math>\text{NaHCO}_3</math>).</p> <p>Marca Merck, No. de Catálogo: 1.06329.0500</p>
<p>Percoll.</p> <p>Marca Sigma No. de Catálogo: P-1644</p>
<p>Proteinasa K</p>
<p>Sustrato diluido.</p> <p>Marca Amresco TMB LIQUID-1 COMPONENT</p>
<p>Tinción de giemsa.</p> <p>Marca Merck KGaA</p>
<p>Tween 20,</p> <p>Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: 63158</p>
<p>Xileno (<math>\text{C}_8\text{H}_{10}</math>).</p> <p>Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: X1040-4L</p>

**Soluciones:**

<b>TAE (1x)</b>	
TAE 40x	25 ml
Agua destilada	975 ml
Volumen Final	1 litro

<b>PBS (10X) pH 7.2 (IFI)</b>	
NaCl	80.06 g
KCl	2.23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.72 g
Agua destilada	Cbp 1 L

<b>PBS (1X) pH 7.2 (ELISA)</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.23 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18 g
NaCl	9.00 g
Agua destilada	Cbp 1 L

<b>Solución de Bloqueo (ELISA)</b>	
Leche Svelty	3 g
PBS	Cbp 100ml

<b>Solución Buffer de carbonatos (ELISA) pH 10.3</b>	
Carbonato de Sodio	10.60 g
Bicarbonato de Sodio	975 ml
Agua Destilada	Cbp 100 ml

<b>Solución de lavado (ELISA)</b>	
Tween 20	1.5 ml
PBS	Cbp 300 ml

<b>Solución de dilución de anticuerpos (ELISA)</b>	
Tween 20	1.5 ml
PBS	Cbp 300 ml

<b>Solución de paro (ELISA)</b>	
H2SO4	0.15 Normal
Agua destilada	Cbp 100 ml

<b>Gel de Agarosa(15x15 cm)</b>	
TAE (1x)	356.4 ml
Agarosa	3.6 g
Volumen final	360 ml

<b>Gel de Agarosa(7x7 cm)</b>	
TAE (1x)	39.6 ml
Agarosa	0.4 g
Volumen Final	40 ml

### **Diseño del péptido AMA-1**

Para seleccionar y diseñar el péptido de AMA-1 primero se determinó la secuencia de aminoácidos del péptido señal en la proteína predicha de *Babesia bigemina* cepa México por medio del programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, Nielsen H. et al 1997, Dyrlov2004). Después se predijeron las regiones transmembranal y citoplasmática de la proteína utilizando el programa TMHMM v. 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)). Una vez que se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región extracelular de AMA-1 se determinaron las regiones consideradas como epítopes B utilizando los programas ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>, Saha y Raghava 2006); BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>, Saha y Raghava 2004 ) y Antigenic ([http://bioinfo.bgu.ac.il/cgi-bin/emboss.pl?\\_action=input&\\_app=antigenic](http://bioinfo.bgu.ac.il/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=antigenic)). Después de

tener un panel de péptidos candidatos a epítipo B, se seleccionaron aquellos péptidos localizados en las regiones más conservadas en la secuencia predicha de aminoácidos de 6 cepas de *Babesia bigemina* :México, Brasil, Argentina, Turquía, Australia e Italia. Posteriormente se predijo la estructura tridimensional de la proteína AMA-1 en el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>, Arnold et al 2006, Kiefer et al 2009, Peitsch 1995) utilizando como molde la estructura de la proteína AMA-1 de *Plasmodium vivax*. Se escogió como molde esta proteína debido a la similitud que posee con AMA-1 de *Babesia bigemina*; la cual se determinó por medio de una búsqueda BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, NCBI/Blast 2010) en la base de datos del Banco de Proteínas (PDB de las siglas en inglés Protein Data Bank) (RCSB PDB 2010). Al contar con la estructura predicha de la proteína de AMA-1 en *Babesia bigemina* cepa México, se identificó la localización de los péptidos candidatos a epítipo B en las regiones más expuestas de la estructura tridimensional predicha de la proteína.

### **Cepa de *Babesia bigemina***

Para la obtención de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina*, se inocularon 70 ml de sangre infectada con *Babesia bigemina* cepa Xochitepec mantenida en nitrógeno líquido en un bovino *Bos taurus* esplenectomizado (35 ml vía intravenos y 35 ml vía intramuscular). La Técnica quirúrgica para la esplenectomía del bovino se realizó conforme al procedimiento descrito en el libro de Técnicas Quirúrgicas en Animales (Alexander, año).

### **Monitoreo clínico y detección de parásitos en sangre infectada**

El monitoreo de la parasitemia del bovino consistió en la detección de merozoítos de *Babesia bigemina* en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, la determinación del Volumen Celular Aglomerado (VCA) mediante la técnica del micro hematocrito y el monitoreo de la temperatura rectal. La temperatura rectal y las

muestras sanguíneas fueron analizadas diariamente después del día 5 post inoculación. Cuando el bovino mostró signos clínicos positivos a babesiosis y el monitoreo sanguíneo reveló una parasitemia mayor al 1%, se extrajo sangre del animal usando bolsas de sangrado con citrato de sodio como anticoagulante que fueron mantenidas a 4 °C. Se centrifugó la sangre completa en tubos de propileno estériles de 15 ml a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos. Inmediatamente la muestra se llevó a la campana de flujo laminar para desechar el plasma y la capa flogística. El paquete de eritrocitos infectados se utilizó para realizar frotis en laminillas que fueron congeladas a -20 °C o para la extracción de ADN.

### **Extracción de ADN de *Babesia bigemina* a partir de eritrocitos infectados**

Para la extracción de ADN de la sangre infectada con *Babesia bigemina*, se utilizó un protocolo modificado del kit de extracción promega (especifica))e centrifugó la sangre completa en tubos de propileno estériles de 15 ml a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos. El paquete celular de eritrocitos se lavó con PBS y centrifugación. Se repitió este procedimiento hasta obtener un pellet claro, al cual se le agregó proteinasa K en una concentración de 50 µg/ml y se dejó incubando en baño maría toda la noche a 55 °C. La muestra se transfirió a un vial de 1.5 ml y se le añadieron 900 µl de Solución de Lisis de Células para incubarlo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 20 segundos y se agregaron 300 µl de Solución de Lisis de Núcleos, dejándolo incubar a 37 °C por una hora. Después se añadieron 100 µl de Solución de Precipitación de Proteínas, se homogenizó la muestra y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 ml y se agregaron 300 µl de isopropanol, se volvió a homogeneizar y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. Terminando el proceso de centrifugado, se retiró el sobrenadante, se agregó etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por un minuto. Se retiró el etanol del vial y se dejó secar por 15 minutos sobre papel absorbente limpio en la campana de flujo laminar.

Por último se agregaron 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN y se dejó incubar toda la noche a 4 °C.

### Amplificación del gen *ama-1* en *Babesia bigemina* mediante PCR

El protocolo de ciclado de PCR utilizado para la amplificación de *ama-1* fue el siguiente: Para la desnaturalización inicial de la doble cadena de ADN se realizó un calentamiento a 95 °C durante 1 minuto. Para la amplificación exponencial se realizaron 35 ciclos de: desnaturalización por 15 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C para el alineamiento y 1 minuto a 72 °C para la fase de extensión. Posteriormente para la extensión final se mantuvo a 72 °C por 7 minutos (ver Fig 1). La secuencia de los primers utilizados se muestra en el cuadro 1 y el protocolo de la reacción de PCR incluyendo el volumen y los reactivos empleados se muestra en el cuadro 2.

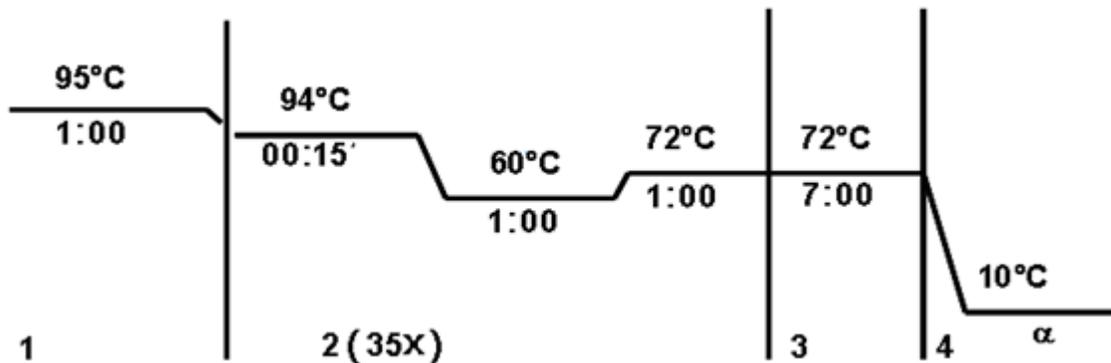


Figura 1. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen *ama-1*.

Oligonucleótido	Secuencia	Orientación
ama-1 Forward	GTG CTC TTA CAA ACG CAG GC	Sentido
ama-1 Reverse	CGT TGA TGA TGA GGC AGG TAG	Antisentido

**Cuadro 1.** Primers utilizados para ampliar el gen *ama-1* de *Babesia bigemina*. Los primers utilizados para la amplificación del gen *ama-1* fueron diseñados para amplificar un fragmento de 732 pares bases (pb) del gen.

Componente	ADN muestra	Control positivo	Control negativo
Mastermix (Promega)	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
Agua libre de nucleasas	5.5 µl	6.5 µl	10.5 µl
ADN con <i>Babesia bigemina</i> Xochitepec	5 µl	--	--
ADN con <i>Babesia bigemina</i> cepa México	--	4 µl	--
Oligonucleótido Forward	1 µl	1 µl	1 µl
Oligonucleótido Reverse	1 µl	1 µl	1 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl

**Cuadro 2.** Protocolo de la reacción de PCR incluyendo el volumen y los reactivos empleados.

### **Análisis de los amplicones por medio de electroforesis**

Se preparó un gel de agarosa a una concentración del 1% diluyendo la agarosa en búfer TAE (1X) calentándolo a punto de ebullición y enfriando en un recipiente con agua a temperatura ambiente. Previamente se colocó el peine en la charola de preparación, y cuando la agarosa aún estaba líquida se vertió sobre el recipiente de gelificación y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El gel de agarosa

se colocó en la cámara de electroforesis y se vertió búfer TAE (1X) hasta cubrirlo completamente. Para cargar el ADN en el gel se prepararon 10 µl de muestra con 3 µl de búfer de carga y se utilizaron también 5 µl de marcador molecular con 3 µl de búfer de carga en viales de 0.2 ml. Se depositó el marcador molecular y las muestras en los pocillos del gel de agarosa y se corrió en la cámara de electroforesis a 75 voltios por una hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio y los amplicones se visualizaron en el fotodocumentador.

### **Generación de Anticuerpos de conejo Anti-AMA-1**

Para la generación de anticuerpos Anti-AMA-1 se utilizaron dos conejos machos raza California. Antes de la primera inmunización se tomó una muestra sanguínea para obtener el suero pre-inmune de ambos conejos. Cada inmunización se realizó con 100 µg del péptido sintético TGVCRLNATPTCLIINAG acoplado a la hemocianina de lapa (KLH) y emulsificado con adyuvante Montanide ISA 70 para obtener un volumen final de 2.5 ml. Cada inmunización se realizó de manera subcutánea en la zona de la ingle en ambos costados. El calendario de inmunización utilizado se muestra en el cuadro 3.

<b>Día</b>	<b>Inoculaciones</b>
0	Primera inoculación
15	Segunda inoculación
25	Tercera inoculación
35	Cuarta inoculación
41	Exsanguinación

**Cuadro 3. Calendario de inmunización de los conejos con el péptido sintético AMA-1**

El día 41 post inoculación se realizó la exanguinación en tubos de propileno de 50 ml y la sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 25 minutos para la separación del suero. Las muestras de suero se colocaron en viales de 1.5ml estériles y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta**

Para la realización de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, se descongelaron las laminillas previamente preparadas. Una vez secas, se fijaron por inmersión en acetona al 100% durante 10 minutos. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos y después se cuadrícularon con esmalte de uñas. Se agregó el suero post-inmunización anti-AMA-1 de cada conejo en las cuadrículas superior e intermedia y como controles negativos se utilizó el suero pre-inmunización en la cuadrícula inferior en una dilución 1 en 50 con PBS para un volumen final de 100 µl. Una vez agregado el anticuerpo primario, las laminillas se incubaron a 37°C por 30 minutos en la cámara húmeda. Terminando el tiempo de incubación, se realizaron 2 lavados con PBS y uno con agua destilada para después dejarse secar a 37°C durante 15 minutos. Se agregó anticuerpo secundario conjugado con FITC en una dilución 1 en 50 diluido con PBS para un volumen final de 50 µl, a cada una de las cuadrículas previamente incubadas con el anticuerpo primario y se volvieron a incubar por 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda. Se realizaron 2 lavados con PBS y uno con agua destilada y al secarse las laminillas, se procedió a hacer la lectura en el microscopio de inmunofluorescencia con filtro especial para FITC.

### **Prueba de ELISA sándwich**

Para determinar la presencia de anticuerpos contra el péptido TGVRILNATPTCLIINAG en bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina*, se analizaron 10 sueros de bovinos de zonas endémicas de babesiosis y positivos a

*Babesia bigemina* mediante una técnica de ELISA sándwich cuyo protocolo se describe a continuación. Se tapizó el fondo de los pozos con 10 µg/ml de anticuerpo de conejo anti AMA-1, en un volumen final de 200 µl de búfer de carbonatos, se cubrió con papel encerado y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se realizaron 5 lavados con la solución de lavado, aplicando 200 µl por pozo. Después se agregaron 200 µl de solución bloqueadora y se incubó 1 hora a 4 °C. Se lavó 5 veces con 100 µl de solución de lavado, se agregó el péptido el péptido sintético a una concentración de 20 µg/ml en un volumen final de 100 µl de solución bloqueadora y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 5 veces con 100 µl de solución de lavado y se adicionaron los 10 sueros problema, a una dilución 1:100 con solución bloqueadora en un volumen final de 100 µl por pozo. Se dejó incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 hora y se realizaron 5 lavados con 100 µl de solución de lavado. Se agregó el conjugado a una dilución 1:1000 en un volumen final de 100 µl por pozo, se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se hicieron los últimos cinco lavados con 100 µl de solución de lavado. Posteriormente se agregaron 100 µl de sustrato TMB por pozo, se dejó reposar durante 12 minutos y se agregaron 100µl de solución de paro por pozo para poder realizar la lectura en el lector de ELISA a 450 nm. Como controles negativos se usaron 2 sueros de bovinos no infectados y como controles positivos se utilizaron 2 sueros de bovinos infectados con *Babesia bigemina*. Cada suero fue analizado por triplicado y el promedio de las lecturas de los sueros controles negativos se utilizó para obtener el valor del punto de corte.

## RESULTADOS

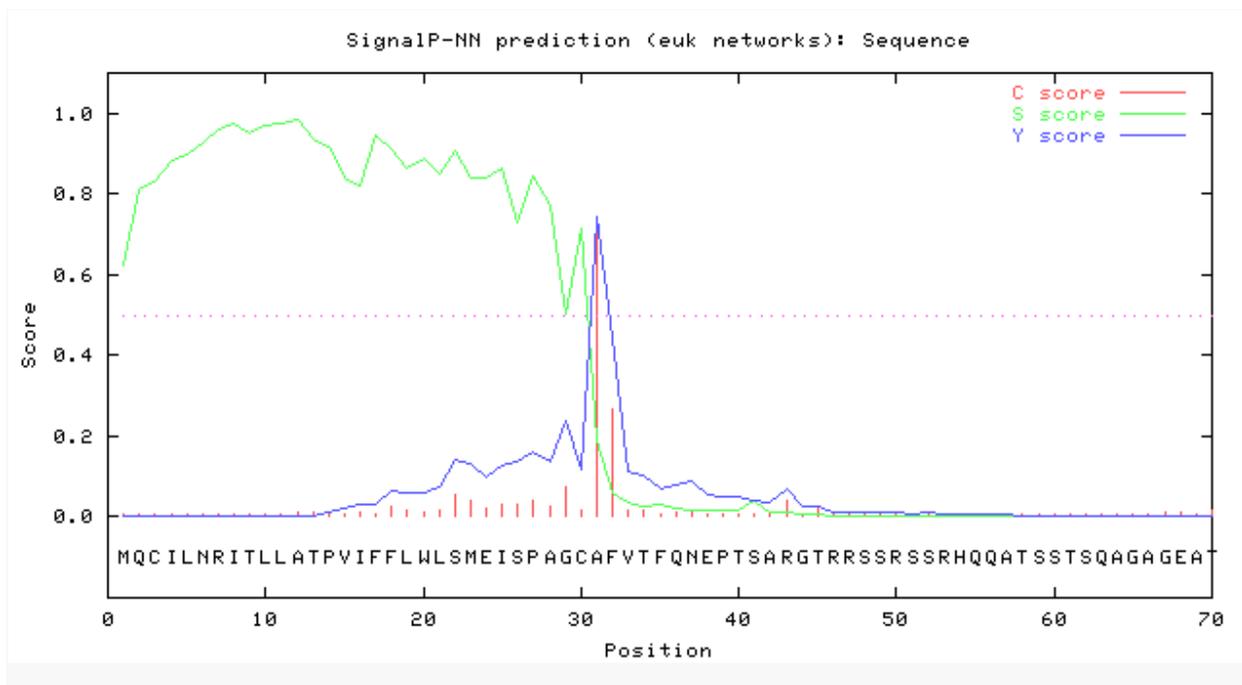
**Objetivo 1:** Seleccionar un péptido en la proteína AMA-1 que contenga epítomos B utilizando herramientas de bioinformática.

### **Determinación del péptido señal en la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina***

La predicción del péptido señal en la secuencia de aminoácidos de AMA-1 en *Babesia bigemina* cepa México (Figura 2) fue realizada en el programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). De acuerdo con los resultados arrojados en este análisis (Gráfica 1), el péptido señal se encuentra entre el aminoácido 1 (Metionina) y el aminoácido 30 (Cisteína).

```
>bigemina_mexico 595 bp
MQCILNRITLLATPVIFFLWLSMEISPAGCAFVTFQNEPTSARGTRRSSRSSHQATSS
TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
GNLSPVSAADLRKWKYKGNVAVTNCAEYASNIVPGSDQRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSP
MQYNQGTRYCDEDGSAKEGPPSLLCMKPYKSEADAHLYYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDA
IFGTWVSGACVALESAFEEYVNSAECAAILFENSAADVDIDIDSERYNEISELYNGLKN
LQLQQIAFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCRILNATPTCLIINAGSLAM
TALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRDSREDGDRNSGITLNMKTLKCTKYVHISKY
SESCGTYYYCSEEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAAVISTALVLLCLAIYWIYQRLWSTKKG
RQHDDYDRLMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRDAYIWGEAAARPSDITPVHLTKLN
```

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína AMA-1 en *Babesia bigemina* cepa México. En verde se muestra la localización del péptido señal, en rojo la región transmembranal, en azul la región intracelular y en (color) la región extracelular.

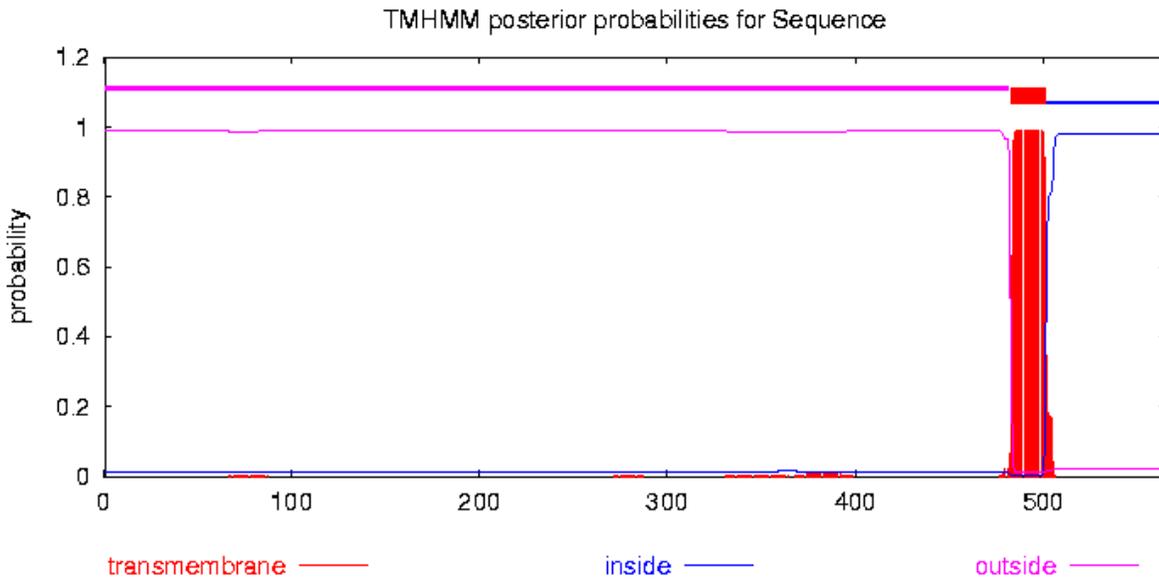


Gráfica 1. Determinación del péptido señal en la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina*. Se muestra la predicción del péptido señal de AMA-1, donde C score (línea roja) muestra el corte del péptido señal, mientras que S score (línea verde) muestra los aminoácidos que constituyen el péptido señal y Y score (línea azul) muestra el punto de corte más probable para el péptido señal.

### Determinación bioinformática de las regiones extracelular, transmembranal e intracelular de la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina*

La predicción de las regiones extracelular, transmembranal e intracelular fue analizada con el programa TMHMM v. 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)). Los resultados de este análisis (Gráfica 2) indican que eliminando la secuencia del péptido señal, la región transmembranal se encuentra entre el aminoácido 483 (Alanina) y el 501 (Tirosina), mientras que la región transmembranal se encuentra entre el aminoácido 502 (Glutamina) y el 565 (Asparagina).

Sequence	TMHMM2.0	outside	1	482
Sequence	TMHMM2.0	TMhelix	483	501
Sequence	TMHMM2.0	inside	502	565



**Gráfica 2.** Determinación bioinformática de las regiones extracelular, transmembranal e intracelular de la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina*. Se muestra la localización de la región extracelular (rosa), la región transmembranal (rojo) y la región intracelular (azul) de acuerdo a su posición numérica en la secuencia de aminoácidos de AMA-1.

## Predicción de epítomos B

El análisis para la predicción de candidatos a epítomos B en AMA-1 se realizó en los programas ABCpred, BcePred y Antigenic. Los resultados del análisis bioinformático en los programas BcePred (Figura 3), Antigenic (Cuadro 4) y ABCpred (Cuadro 5), reveló una gran cantidad de posibles péptidos candidatos a epítomo B, los cuales se analizaron y compararon en la secuencia de 6 cepas de *Babesia bigemina* (Figura 4).

<sup>1</sup>AFVTFQNEPTSARGTRRSSRSSHQQTSSSTSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRY  
 MIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYRMPPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYR  
 GLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIHGNLSPVSAADLRKWGYKGNVAVTNCAEYASNIVPGSD  
 QRTKYRYPFVYDGKEEMCYILYSPMQYNQGTRYCDEDGSAKEGPSSLLCMKPYKSEADAHL  
 YYGSARIDPKWDQNCMPKPIKDAIFGTWVSGACVALESAAFEYVNSAAEECAAILFENSAADV  
 DIDIDSERYNEISELYNGLKNLQLQQAIFSLFAPMAKSAASATLSKGVGMNWANYESETGVCR  
ILNATPTCLIINAGSLAMTALGSPLESDAINYPCHIDTLGYVEPRKRDSREDGDRNSGITTALNM  
 KTLKCTKYVHISKYSESCGTYYYCSEEKSGYLSRLYQFMCSHNVKKAIVISTALVLLCLAIYWI  
 YQRLWSTKKGRQHDDYDRLMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRTDAYIWGEAAARPSDITPVHLT  
KLN<sup>565</sup>

Figura 3. Resultados de la predicción de epítomos B en el programa BcePred. Los epítomos B en la secuencia de aminoácidos de AMA-1 se encuentran subrayados y marcados en azul.

Puntaje	Secuencia	Posición
1.266	GYLSRLYQFMCSHNVKKAIVISTALVLLCLAIYWIYQRL	466
1.173	MCYILYSPM	203
1.170	GTWVSGACVALES	273
1.156	TLKCTKYVHISKYSESCGTYYYCSE	439
1.130	ETGVCRILNATPTCLIINAG	367
1.128	RYPFVYD	192
1.128	SSLLCMKP	231
1.127	ITPVHLT	556
1.126	EEYVNSAAEECAAILFEN	288
1.125	GKCPVMGKVISLASGADFLEPI	95

Cuadro 4. Resultados para la predicción de epítomos B en el programa Antigenic. Un mayor puntaje indica que el péptido tiene mayor posibilidad de ser un epítomo B.

Rango	Secuencia	Posición	Puntaje
1	MTALGSPLESDAINYP	390	0.97
2	EAVGNKYRMPYTKGKCP	83	0.94
3	KSEADAHLYYGSARID	240	0.92
4	NYESETGVCRILNATP	363	0.91
5	PLESDAINYPCHIDTL	396	0.90
6	KSAASATLSKGVGMNW	346	0.89
7	LASGADFLEPISADNP	106	0.88
8	MSKYEYDDVSHDNIEP	520	0.87
9	CSEKSGYLSRLYQFM	460	0.86
10	EMCYILYSPMQYNQGT	202	0.85
11	NSGITTALNMKTLKCT	428	0.84
12	PETVIKHTGASAGALT	129	0.83
13	DEDGSAKEGPSSLLCM	221	0.82
14	TKKGRQHDDYDRLMSK	507	0.81
15	DQRTKYRYPFVYDGKE	186	0.80
16	PWTRYMIKYDIARCHG	57	0.79
17	SRLYQFMC SHNVKKA	469	0.78
18	KDAIFGTWVSGACVAL	268	0.77
19	LCLAIYWIIYQRLWSTK	493	0.76
20	KCTKYVHSHKYSESCGT	441	0.75
21	SERYNEISELYNGLKN	315	0.74
22	AGALTNAGNIHGNLSP	140	0.73
23	AYIWGEAAARPSDITP	543	0.72
24	AVTNCAEYASNIVPGS	170	0.71
25	CLINAGSLAMTALGS	380	0.67
26	HNVKKAAVISTALVLL	478	0.66
27	VCRILNATPTCLINA	370	0.60
28	DNPRYRGLAFPETVIK	119	0.58
29	AAARPSDITPVHLTKL	549	0.54
30	ISELYNGLKNLQLQOI	321	0.53

**Cuadro 5. Resultados para la predicción de epítomos B en el programa ABCpred. Un mayor puntaje indica que el péptido tiene mayor posibilidad de ser un epítomo B.**

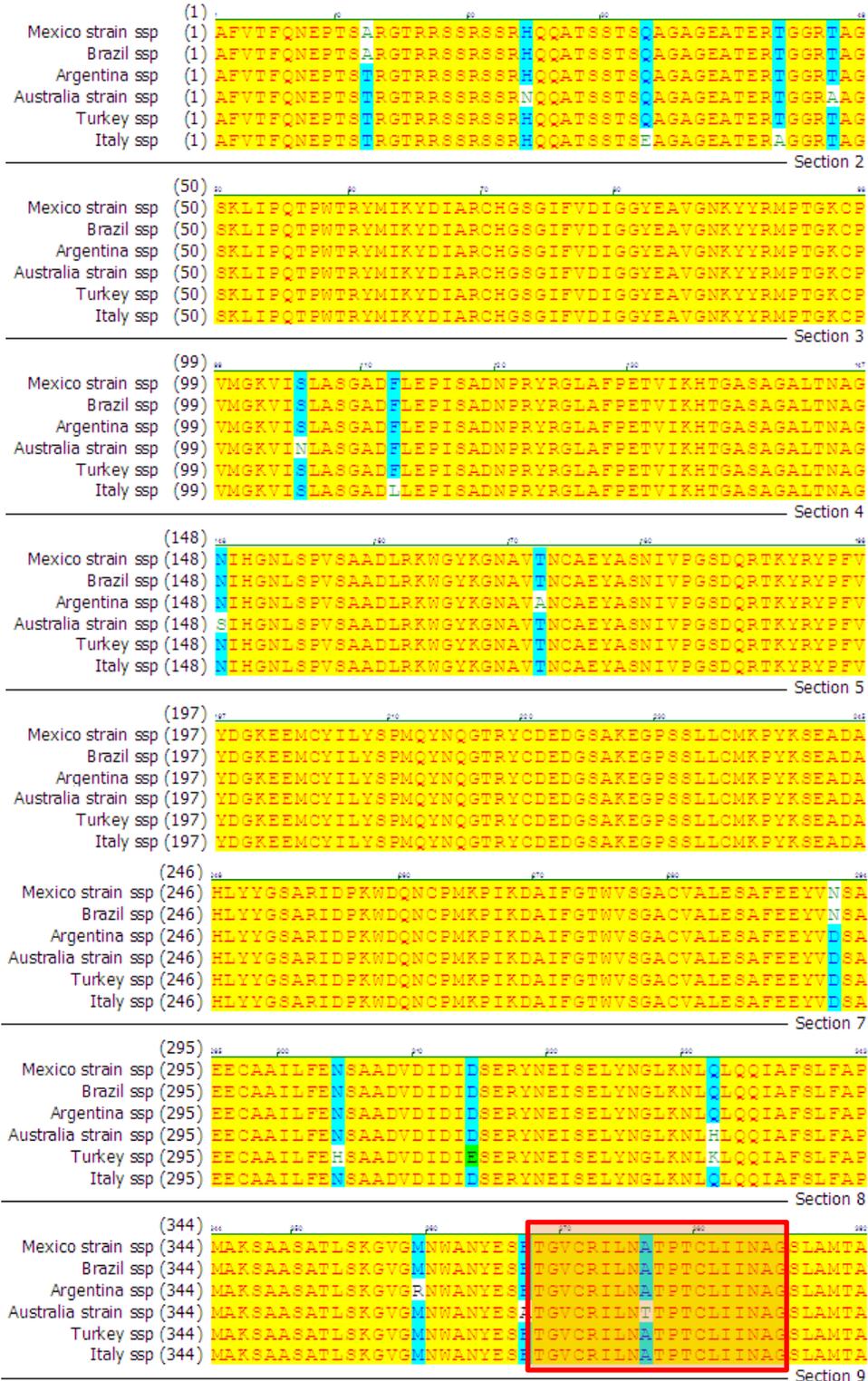


Figura 4. Alineamiento de secuencia de los primeros 392 aminoácidos de AMA-1 en 6 cepas de *Babesia bigemina*. En color azul se muestran los aminoácidos conservados; en verde, los aminoácidos similares; en blanco, los aminoácidos no similares; en amarillo, los aminoácidos de secuencia idéntica y marcado en rojo, el péptido seleccionado.

## Predicción de la estructura tridimensional de AMA-1 y elección del epítipo B

Para la predicción de la estructura tridimensional de la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina*, se eligió una proteína cuya estructura tridimensional ya estuviera en el PDB. Para escoger el molde se hizo una búsqueda BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la secuencia de AMA-1 de *Babesia bigemina* y el resultado del valor más alto fue el de AMA-1 en *Plasmodium vivax* con una cobertura del 71%. Utilizando a AMA-1 de *Plasmodium vivax*, se modeló la proteína de AMA-1 de *Babesia bigemina* con el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Al localizar los péptidos candidatos a epítipo B en la estructura tridimensional (Figura 5), se eligió el péptido TGVCRLNATPTCLIINAG (Figura 4).

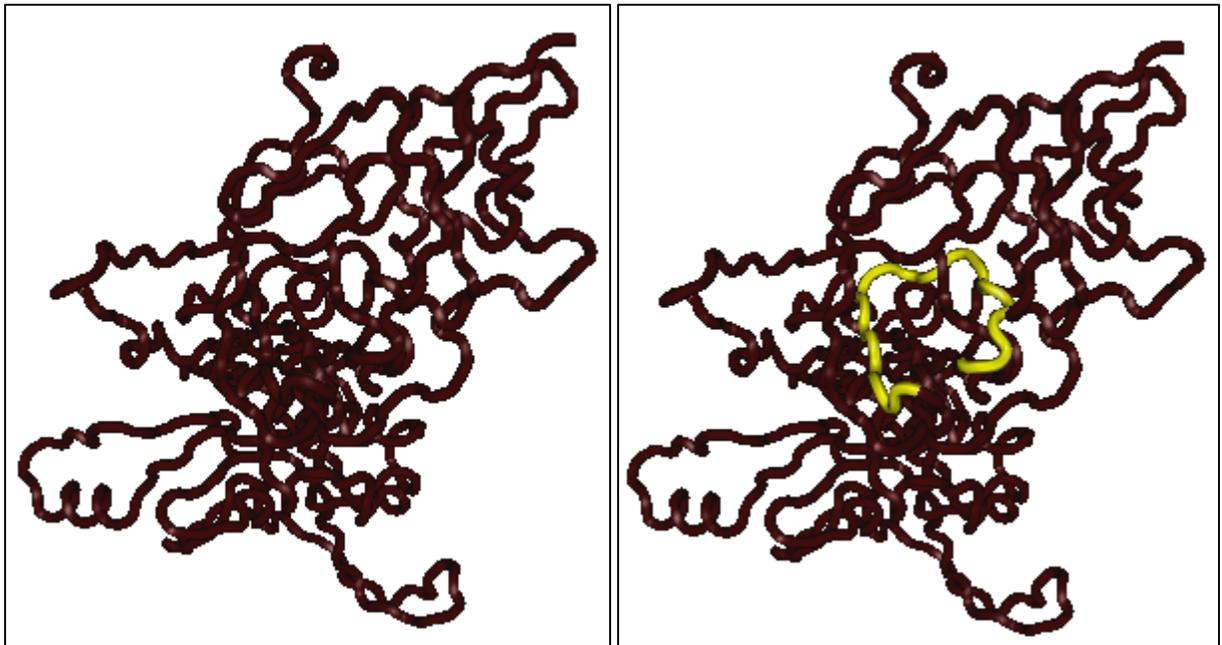


Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina* (Izquierda) y la porción del péptido TGVCRLNATPTCLIINAG marcado en amarillo en la misma proteína (Derecha).

Objetivo 2: Amplificar el gen *ama-1* mediante la técnica de PCR

### **Amplicón del gen interno de *ama-1* de *Babesia bigemina***

La amplificación de *ama-1* a partir de ADN de *Babesia bigemina* fue hecha por medio de la técnica de PCR utilizando primers específicos para el gen *ama-1*(Figura 6). En las muestras de *Babesia bigemina* cepa México (Carril 3) y Xochitepec (Carril 4), se visualizó un amplicón del tamaño esperado (732 pb); mientras que para la muestra control negativo (Carril 2) no se observó ninguna señal de amplificación.

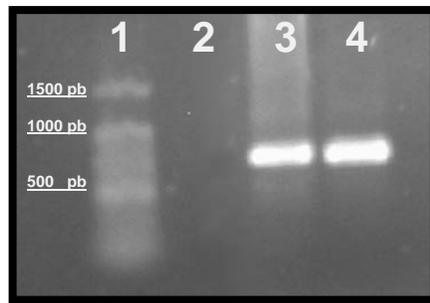


Figura 6. Amplificación del gen *ama-1* mediante la técnica de PCR. Carril 1) Marcador de pares de bases; Carril 2) Muestra sin ADN como control negativo; Carril 3) Muestra con ADN de *Babesia bigemina* cepa Xochitepec; Carril 4) Muestra con ADN de *Babesia bigemina* cepa México.

Objetivo 3: Generar anticuerpos contra el péptido diseñado de AMA-1 que reconozcan a *Babesia bigemina* por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

### **Análisis de anticuerpos anti AMA-1**

El análisis de la generación de anticuerpos anti AMA-1 de *Babesia bigemina* se realizó por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando parásitos intraeritrocíticos. Al analizar las muestras de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* en el microscopio de fluorescencia, se observaron señales positivas en aquellas muestras que fueron incubadas con los sueros de los dos conejos contra el péptido TGVCRLNATPTCLIINAG de AMA-1 (Figura 7). Por otro lado, las muestras de

eritrocitos infectados e incubados con suero pre inmunización utilizadas como control negativo, no mostraron fluorescencia (Figura 7).

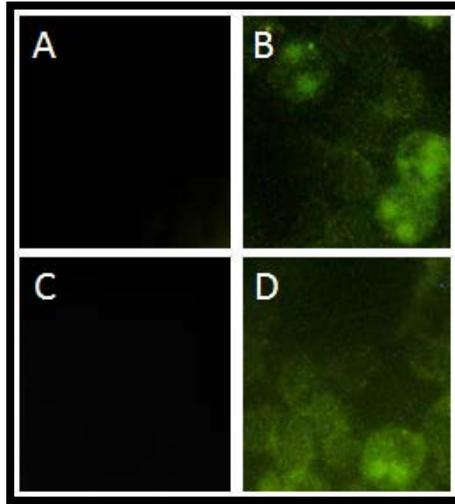
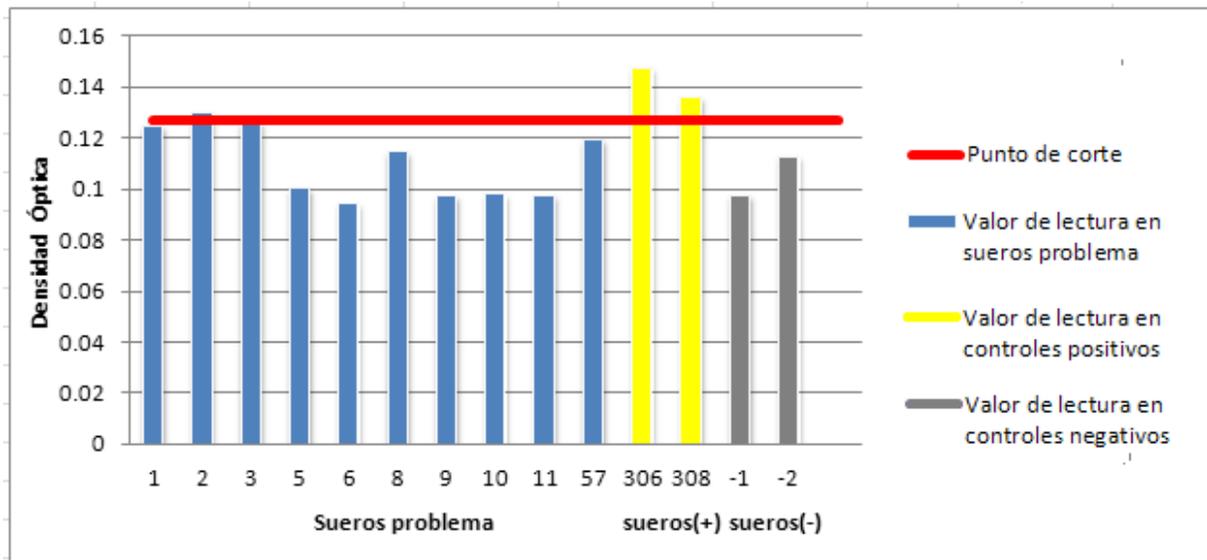


Figura 7. Evaluación de la generación de anticuerpos anti AMA-1 de *Babesia bigemina* por medio de Inmunofluorescencia indirecta. Panel A: Eritrocitos infectados incubados con suero pre inmune del conejo 1; Panel B: Eritrocitos infectados incubados con el suero del conejo 1 anti-AMA 1 post inmunización, Panel C: Eritrocitos infectados incubados con suero pre inmune del conejo 2; Panel D Eritrocitos infectados incubados con suero del conejo 2 anti-AMA 1 post inmunización.

Objetivo 4 Evaluar si sueros de bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina* identifican el péptido diseñado de AMA-1 por medio de la técnica de ELISA sándwich.

#### **Evaluación de sueros bovinos contra AMA-1**

Para determinar si los anticuerpos de bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina* identifican el péptido TGVCRLNATPTCLIINAG de AMA-1, se analizaron 10 sueros de bovinos mediante la técnica de ELISA sándwich. De las 10 muestras analizadas, los sueros 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 57 no mostraron señal positiva mientras que el suero 2 mostró una señal positiva al sobrepasar el punto de corte con un valor de 0.1270 (Gráfica 3). Como controles negativos se usaron dos sueros de bovinos no infectados y como controles positivos se usaron sueros de dos bovinos inmunizados con el péptido sintético de AMA-1. Cada suero se analizó por triplicado.



Gráfica 3. Evaluación de sueros de bovinos naturalmente infectados a la presencia de anticuerpos contra un péptido de AMA-1 de *Babesia bigemina*. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones obtenidas de cada suero y su relación al punto de corte

## DISCUSIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad económicamente importante en México y hasta la fecha no hay vacunas comerciales disponibles en el país. Las vacunas actuales para la profilaxis de la babesiosis bovina presentes en el mercado presentan numerosos riesgos por utilizar cepas vivas para su elaboración. Para poder elaborar vacunas más seguras, se propone utilizar subunidades proteicas.

Las proteínas de superficie de los merozoítos son de vital importancia para la invasión de eritrocitos y por ende son proteínas muy significativas para el desarrollo de los protozoarios de *Babesia*. AMA-1 es una proteína de superficie y participa en la reorientación en los merozoítos al momento de invadir las células rojas, por lo que se considera un buen candidato para su inclusión en vacunas con subunidades parasitarias. Sin embargo, actualmente no hay estudios de la proteína AMA-1 en *Babesia bigemina* ni su uso como inmunógeno. Es por esto que el objetivo de la presente tesis es diseñar un péptido que contenga epítomos B en la proteína AMA-1 de *Babesia bigemina* que sea reconocido por anticuerpos.

Para poder identificar epítomos dentro de la secuencia de aminoácidos de AMA-1, primero se identificó el péptido señal por medio del programa bioinformático SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Con los resultados arrojados por este análisis, se determinó que la primera porción de 30 aminoácidos en la secuencia de AMA-1 de *Babesia bigemina* cepa México, fue predicha como péptido señal (Nielsen H. et al 1997, *Dyrlø v2004*).

Debido a que en el momento que se transcribe una proteína membranal, el péptido señal se hidroliza y no forma parte de la proteína madura; la primera porción de 30 aminoácidos de la secuencia AMA-1 no se tomó en cuenta para la predicción de epítomos B (Vargas 2005). Se consideró que al momento que se transcribe la proteína y se transloca a la membrana celular del protozoario, este péptido se hidroliza y por lo

tanto, el sistema inmunitario del bovino no generaría una respuesta inmune contra esta primera porción de aminoácidos.

La proteína AMA-1 cuenta con un dominio transmembranal y una cola citoplasmática además de la región extracelular (Gaffar *et al* 2004). De acuerdo con los resultados del programa TMHMM Server v. 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)), la región transmembranal de *Babesia bigemina* consta de 19 aminoácidos y empieza en el aminoácido 483 A (Alanina) y termina en el aminoácido 501 Y (Tirosina). Por su parte, la región intracelular consta de 64 aminoácidos y comienza en el aminoácido 502 Q (Glutamina) y termina en el aminoácido 565 N (Asparagina) ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)). Debido a que estas 2 regiones de la proteína AMA-1 no se encuentran expuestas de manera extracelular en la membrana del parásito (Gaffar *et al* 2004), se consideró que el sistema inmunitario del bovino no podría producir anticuerpos que reconociesen a la proteína AMA-1 en un merozoíto de *Babesia bigemina* y por lo tanto no se consideraron estas dos regiones para la predicción de epítomos B.

Una vez determinada la secuencia de aminoácidos que se encuentran en la proteína madura y la porción extracelular de esta proteína en la membrana de *Babesia bigemina*, se buscaron las porciones de aminoácidos más antigénicas y con mayor posibilidad de ser epítomos B. Debido a que los métodos experimentales para la caracterización de epítomos B requiere de un costo elevado y mucho tiempo (Saha y Raghava 2006), se utilizaron programas bioinformáticos para predecir epítomos B. Para este análisis se eligieron 3 diferentes programas bioinformáticos debido a que cada programa predice de diferente manera y con distintos algoritmos las regiones antigénicas de las proteínas. Al utilizar 3 programas para la predicción de regiones antigénicas y encontrar similitudes en la predicción, se hipotetiza que el diseño del péptido será más confiable. Los resultados de los programas ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y Antigenic ([http://bioinfo.bgu.ac.il/cgi-bin/emboss.pl?\\_action=input&\\_app=antigenic](http://bioinfo.bgu.ac.il/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=antigenic)), mostraron una gran cantidad de candidatos para epítomos B.

Como se esperaba, hubo un número elevado de péptidos predichos para epítipo B por los 3 programas por lo tanto, los péptidos conservados presentes en la secuencia de AMA-1 de 6 cepas de *Babesia bigemina* del mundo incluyendo: México, Brasil, Argentina, Turquía, Australia e Italia, fueron comparados. Debido a que la variación antigénica es uno de los mayores problemas para la elaboración de vacunas con subunidades parasitarias en *Babesia* spp (Dalrymple B.P., 1993), se escogió un péptido con baja variación en la secuencia de aminoácidos de AMA-1 en *Babesia bigemina*.

Para seleccionar una secuencia de aminoácidos con elevada probabilidad de ser un epítipo B, se obtuvo un modelo tridimensional de la estructura predicha de AMA-1. Esto es porque a la fecha no se cuenta con la estructura tridimensional para esta proteína en *Babesia bigemina* en la base de datos del Banco de Proteínas, únicamente se encuentra la estructura tridimensional de AMA-1 de algunos protozoarios de *Plasmodium* spp (RCSB PDB 2010). Por lo tanto, para poder hacer un modelo tridimensional de AMA-1, se buscó en el PDB un modelo ya existente que tuviera la mayor similitud posible a AMA-1 de *Babesia bigemina* para utilizar como un molde principal. La búsqueda en el PDB mostró que la estructura con mayor similitud a AMA-1 de *Babesia bigemina* fue la estructura de la proteína AMA-1 de *Plasmodium vivax* (RCSB PDB 2010).

Ya con la estructura tridimensional predicha de AMA-1 por el programa SWISS-MODEL (Arnold et al 2006, Kiefer et al 2009, Peitsch 1995) y con base en todos los análisis bioinformáticos previamente hechos, se eligió la secuencia de aminoácidos TGVCRLNATPTCLIINAG que fue una de las pocas secuencias de aminoácidos que mostraron estar en la superficie de la estructura tridimensional predicha de AMA-1; tuvo un valor predictivo elevado de ser candidato a epítipo B y está en una región conservada dentro de la secuencia de 6 cepas de *Babesia bigemina*.

La confirmación de que la secuencia de nucleótidos del gen *ama-1* se encuentra en el material genético de *Babesia bigemina*, fue comprobada cuando se amplificó una sección interna del gen *ama-1* por medio de la técnica de PCR. El resultado en la amplificación del gen *ama-1* en las muestras con *Babesia bigemina*, mostró un resultado positivo al analizar las muestras por medio de electroforesis, mientras que la muestra sin material genético no mostro ninguna amplificación. Debido a que los primers se diseñaron específicamente en la parte interna del gen *ama-1*, el amplicón tuvo un peso molecular esperado de 732 pb. Con los resultados de la prueba de PCR se demostró que el gen se encuentra en la secuencia genética de *Babesia bigemina* de la cepa utilizada en este trabajo experimental. Reportes de otros genes de *B. bigemina* como el gen *gp45* han mostrado que algunas cepas no tienen esos genes o bien la secuencia es muy variable y no se puede amplificar el gen con los mismos pares de primers (Fisher *et al* 2001). El hecho de que estos pares de primers amplifican un fragmento de *ama-1* de cepas de seis países distintos sugiere que pueden tener potencial como una herramienta diagnóstica para la Babesiosis bovina. Debido a que los primers son específicos para el gen *ama-1* de *Babesia bigemina* también se podrían utilizar para discriminar entre *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* de acuerdo a los análisis BLAST que se hicieron en este trabajo (NCBI/Blast 2010).

Para evaluar si el péptido seleccionado por medio de análisis bioinformáticos es inmunogénico y por lo tanto induce la generación de anticuerpos anti AMA-1 de *Babesia bigemina*, se analizó el suero de conejos inmunizados con este péptido por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Las muestras de fases eritrocíticas de *B. bigemina* incubadas con suero de conejo anti péptido de AMA-1 mostraron señal positiva demostrando que el péptido de AMA-1 genera anticuerpos que reconocen la proteína nativa en fases eritrocíticas de *Babesia bigemina* y por lo tanto es inmunogénico. Este análisis inicial es muy importante porque a pesar de que el sistema inmunológico del conejo es distinto al del bovino, indica que hay una alta probabilidad de que el sistema inmune de bovinos inmunizados con este péptido puedan generar anticuerpos que reconozcan a la proteína de AMA-1 en merozoítos de

*Babesia bigemina* y bloquear la invasión eritrocítica como en estudios hechos con anticuerpos anti AMA-1 de *Plasmodium knowlesi* (Mitchell *et al* 2003).

Una vez que el péptido de AMA-1 se analizó por medio de diferentes herramientas bioinformáticas y se comprobó que podía ser reconocido por anticuerpos específicos, se esperaba demostrar que el sistema inmunitario de animales que viven en zonas endémicas de babesiosis bovina, generan anticuerpos anti AMA-1 contra el péptido TGVCRILNATPTCLIINAG. Para lograr esto, 10 sueros de bovinos nativos de una zona endémica de babesiosis y que habían sido positivos a *Babesia bigemina* por inmunofluorescencia indirecta, se analizaron mediante la técnica de ELISA sándwich. Los resultados de la prueba de ELISA mostraron que de los diez sueros analizados sólo uno tuvo señal positiva en la prueba de ELISA, lo cual sugiere que la mayor parte de los bovinos infectados con *Babesia bigemina* no generan una inmunidad humoral contra el péptido TGVCRILNATPTCLIINAG de AMA-1. Debido a que se está buscando que los anticuerpos generados contra el péptido sintético de AMA-1 sean anticuerpos que puedan proteger al bovino contra la infección por *B. bigemina*, se esperaba que la mayoría de los sueros de bovinos infectados de zonas endémicas tuviera anticuerpos que reconocieran a este péptido. A pesar de los resultados de este análisis, esto no quiere decir que el péptido sintético de AMA-1 no sea un candidato vacunal potencial. Se hipotetiza que el sistema inmune del bovino monta una respuesta humoral hacia los epítomos inmunogénicos que no necesariamente son los epítomos neutralizantes protectivos y excluye al mismo tiempo a otros epítomos, esta es una estrategia de evasión de la respuesta inmune utilizada por la mayoría de los patógenos (Kuby, 2007, Roitt *et al* 2008). Si este péptido es utilizado como componente de una vacuna contra la babesiosis bovina, una vez que se demuestre su potencial protector, al momento de inocularlo a los bovinos, se intentaría generar linfocitos B de memoria específicos para él, de tal manera que el bovino pueda montar una respuesta secundaria protectora cuando tenga su primer reto con *Babesia bigemina*.

## CONCLUSIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad muy importante en los trópicos del mundo, incluyendo a México. *Babesia bigemina* es uno de los patógenos causantes de esta enfermedad y a la fecha no hay vacunas ni métodos de diagnósticos eficientes contra ella. Para investigar un método de control para esta enfermedad se trabajó con AMA-1; una proteína con un potencial muy elevado como candidato vacunal y de diagnóstico donde la bioinformática fue una herramienta muy útil debido al gran potencial que tiene para apoyar en la elaboración de vacunas contra la babesiosis bovina. Utilizando estas herramientas se pudo seleccionar un péptido en la secuencia de aminoácidos de AMA-1 que tuviera potencial inmunogénico; permitió la predicción de regiones de AMA-1 tales como el péptido señal, la región extracelular y la región citoplasmática, así como el análisis de epítomos B y la formación de un modelo tridimensional predicho de esta proteína.

Por medio de anticuerpos anti péptido AMA-1 analizados por inmunofluorescencia indirecta, se comprobó que el péptido seleccionado (TGVCRILNATPTCLIINAG) tiene un alto potencial inmunogénico y capacidad para la generación de anticuerpos debido a que estos fueron capaces de reconocer a *Babesia bigemina*; características necesarias para la producción de una vacuna elaborada con sub unidades parasitarias.

La secuencia de aminoácidos TGVCRILNATPTCLIINAG no es un péptido que el sistema inmune de los bovinos analizados que sufrieron un reto previo a *Babesia bigemina* utiliza para generar una respuesta humoral. Sin embargo no se descarta la posibilidad de utilizar este péptido como un candidato para la elaboración de vacunas.

De acuerdo con la investigación que se realizó en el presente trabajo, mediante herramientas bioinformáticas se diseñó un péptido de la secuencia de AMA-1 que contenía epítomos B con la capacidad de ser reconocidos por anticuerpos generados contra el péptido. Esto nos permite proponer a este péptido como un sólido candidato para ser incluido en una vacuna contra la babesiosis bovina causada por *Babesia bigemina*.

## LITERATURA CITADA

- Alexander A., 1989, Técnicas Quirúrgicas en animales. Editorial Interamericana. México D.F.
- Alvarez J.A., Ramos J.A., Rojas E.E., Mosqueda J.J., Vega C.A., Olvera A.M., Figueroa J.V., Canto G.J., 2004. Challenge of Cattle Vaccinated with a Combined Babesia bovis and Babesia bigemina Frozen Immunogen. Annals of the New York Academy of Sciences. 1026: 277-83
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T., 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics. 22:195-201
- Barriga O.O, 2002. Las enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos en América Latina. Editorial Germinal. Chile Pág: 196-199
- Barros C.S.L, 2008. Foreign animal diseases: Babesiosis. USAHA. Estados Unidos. Pág: 147-157
- Blood D.C., 2002. Manual de Medicina Veterinaria. Mc Graw Hill. España. Pág: 533-535
- Bock, R., 2004. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: CHAPTER 2.3.8. BOVINE BABESIOSIS. OIE. Francia Ubicado en: [http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A\\_00059.htm](http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00059.htm) Fecha de Consulta 16/08/2010.
- Bock R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen W., 2004. Babesiosis of Cattle. Parasitology 129: S247-269.
- Chauvin A., Moreau E, Bonnet s, Plantard O, Malandrin L, 2009. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. EDP Sciences. Vet. Res. 40:37,
- Chiodini P.L., 2009. Manson's tropical diseases: Babesiosis. El sevier Health Sciences. Reino Unido. Pág: 1302
- Cooke B.M., Mohandas N., Coppel R.L 2001. Advances in Parasitology: The Malaria-Infected Red Blood Cell: Structural and Functional Changes. Academic Press. Estados Unidos, Pág: 57-59
- Dalrymple B.P., 1993. Molecular Variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. Acta Tropicana. 53: 227-238

- Diario Oficial de la Federación, 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994. Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus ssp.*, Primera Sección. Pág: 47
- Dyrløv J.B., Nielsen H., Heijne G.V. Brunak S., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0., *J. Mol. Biol.*, 340:783-795
- Fernández R.M., Cantó A.G.J., Aboytes T.R., 1995. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia spp* y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. *Revista Veterinaria México*. 26: 407-409
- Figueroa J.V., Chieves L.P., Johnson G.S., Goff W.L., Buening G.M., 1994. Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev Lat. Amer. Microbiol.*, 36: 47-55
- Fisher T. G., McElwain T. F., Palmer G. H., 2001. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infect. Immun.* 69: 3782-3790
- Florentino S.G, Gutiérrez M.F.F., Rueda N.S.A., Rodríguez J.A.R., 1994. La inmunología en el diagnóstico clínico. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Pág: 76-85
- Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.F.J., Vries E., 2004. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1, *Infection and Immunity* 72: 2947–2955.
- Gállego J.B., 2007. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Ediciones Universitat Barcelona. España. Pág: 203-206
- Goff W.L., Johnson W.C., Molloy J.B., Jorgensen W.K., Waldron S.J., Figueroa J.V., Matthee O., Adams D.S., McGuire T.C., Pino I., Mosqueda J., Palmer G.H., Suarez C.E., Knowles D.P., McElwain T.F., 2008. Validation of a competitive ELISA for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15:1316–1321
- Gutierrez Y., 2000. Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations, Oxford University Press. Estados Unidos, Pág 252.258
- Homer M.J., Aguilar D.I., Telford S.R., Krause P.J., Persing D.H., 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology*. 13:451-469
- Howell S.A., Well I., Fleck S.L., Kettleborough C., Collins C.R., Blackman M.J., 2003. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *The journal of biological chemistry*. 278: 23890–23898

- Jenkins M.C., 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*.101: 291-310
- Kiefer F., Arnold K., Künzli M., Bordoli L., Schwede T., 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*. 37: 387-392.
- Kindt T.J, Goldsby R.A., Osborne B.A., 2007 *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana México. Pág 81-84
- Kusi K.A., Faber B.W., Riasat V., Thomas A.W., Kocken C.H.M., Remarque E.J., 2010. Generation of Humoral Immune Responses to Multi-Allele PfAMA1 Vaccines; Effect of Adjuvant and Number of Component Alleles on the Breadth of Response. *PLoS ONE*. 5: e15391
- Levine N.D., 1982. Apicomplexa. In synopsis and classification of living organisms, MCGRAW-HILL Book Co., Pág: 571-587
- Luscombe N.M., Greenbaum D., Gerstein M., 2001. What is bioinformatics? An introduction and overview of the field. *Methods Inf. Med*. 40: 346-358
- McCosker P.J., 1981. The global importance of Babesiosis: Ristic M, Krier J. Eds. *Babesiosis* New York Academic Pres. 1-24.
- Mitchell G. H., Thomas A. W., Margos G., Dluzewski A. R., Bannister L. H. , 2003. Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. *American Society for Microbiology*. 72: 54-158
- Mosqueda J., Falcon A., Antonio Alvarez J., Alberto Ramos J., Oropeza-Hernandez L.F., Figueroa J.V., 2004. *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.
- Mosqueda J., McElwan T.F., Stiller D., Palmer G.H. 2002. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity*. 70: 1599- 1602
- Mosqueda J.J., Figueroa J.V., Alvarez A., Bautista R., Falcon A., Ramos A., Canto G., Vega C.A., 2007. Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico, *Parassitologia*. 49:20- 22
- Mount D.W., 2004, *Bioinformatics: sequence and genome analysis*, CSHL Press, Estados Unidos, Pág 7-10

- NCBI/Blast, 2010, Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Fecha de Consulta 20/08/2010
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., Heijne G.V., 1997, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. 10:1-6
- Palmer G.H., McElwain T.F., 1995. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 57: 233-253
- Peitsch, M. C., 1995, Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*. 13: 658-660
- Pestana E.A., Belak S., Diallo A. Crowther J.R., Viljoen.G.J., 2010. Early Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics - Real Time PCR Applications. Springer. Estados Unidos, Pág 9-16
- Quiroz, R. H. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa SA de CV. México D.F. Pág 187-199
- Radostits O. M., Blood D.C., Gay C.C., Hinchcliff K.W., 2000. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. Elsevier Health Sciences. Reino Unido, Pág 1289-1295
- Riek R. F., 1964. The life cycle of *Babesia bigemina*(Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J of Agri. Res.* 17: 247-254
- Roitt I.M., Delves P.J., Martin S.J., Burton D.R., 2008. *Inmunología Fundamentos*. Ed. Médica Panamericana. Argentina, Pág: 233-235
- Rodríguez V.R.I., Domínguez A.J.L., Cob G.L. , 2000. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999). *Rev. Bioméd*, 11: 277-282.
- RSCB PDB, 2010. [www.pdb.org](http://www.pdb.org), Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. Bourne P.E., 2000, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242
- Rudzinska M.A., Spielman A., Lewengrub S., Trager W., Piesman J., 1983. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2966–2970.
- Saha S., Raghava G.P.S., 2004. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. *LNCS*. 3239: 197-204

- Saha S., Raghava G.P.S., 2006. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. *Proteins*. 65:40-48
- Salas J.J., Cordero L. 2000. *Enfermedades de los Animales Domésticos*. EUNED. Costa Rica. Pág 116, 117
- SENASICA<sup>a</sup>, 2010. Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus spp.*, SENASICA. México. <http://www.senasica.gob.mx/?id=803> Fecha de Consulta 21/09/2010
- SENASICA<sup>b</sup>, 2010. CENAPA: Departamento de Hemoparásitos y Helminología. SENASICA. México. <http://www.senasica.gob.mx/?id=81> Fecha de consulta 13/10/2010
- Smith R.D., 1978. Ciclo biológico de Babesia en la garrapata. Departamento de hemoprotozoarios Instituto Nacional de investigaciones pecuarias. SARH. *Ciencia Veterinaria México D.F.* 2:234-260
- Soldati D., Dubremetz J. F., Lebrun M., 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*, *International Journal for Parasitology*. 31:1293–1302.
- Solorio R.J.L., Rodríguez V.R.I, 1997, Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control., *Revista Biomed.*, 8:95-105,
- Spickler A.R., Roth J.A., 2008, Bovine babesiosis ,CFSPH , Estados Unidos. Ubicado en:<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm> Fecha de Consulta 16/08/2010.
- Stowers W. A., Kennedy C. M., Keegan P. B., Saul A., Long A. C., Miller H. L., 2002. Vaccination of Monkeys with Recombinant Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Confers Protection against Blood-Stage Malaria. *American Society for Microbiology*. 70:6961-6967
- Torina A., Agnone A., Sireci G., Mosqueda J.J., Blanda V., Albanese I., La Farina M., Cerrone A., Cusumano F. Caracappa S. 2009. Characterization of the Apical Membrane Antigen-1 in Italian Strains of Babesia bigemina. *Transboundary and Emerging Diseases*. 57: 52–56
- Tortora G.J., Funke B.R., Case.C.L., 2007. *Introducción a la microbiología*, Ed. Médica Panamericana. Argentina. Pág: 542-546
- Vargas D., 2005. *Fundamentos moleculares en medicina: Desde ARN hasta la proteína*. Manual Moderno. México, Pag: 87,88

Vignau M.L. 2005. Parasitología práctica y modelos de Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos, UNLP, Argentina. Buenos Aires, Pág 33-35

Wiser F.M. 2009 Apicomplexa, Tulane University. Estados Unidos. Ubicado en: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html> Fecha de Consulta: 01/08/2010.

Xiong J., 2006. Essential bioinformatics. Cambridge University Press. Reino Unido. Pp 3-5