



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencia Biológicas

**Evaluación *in vitro* de la respuesta inmune celular de
bovinos inducida por péptidos de *Babesia bovis***

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

Presenta:

IBT. Alma Susana Mejía López

Director de tesis:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito



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

Evaluación in vitro de la respuesta inmune celular de bovinos inducida por péptidos de Babesia bovis

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

Presenta:
Alma Susana Mejía López

Dirigido por:
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente


Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Secretario


Firma

Dra. María Eugenia López Arellano
Vocal

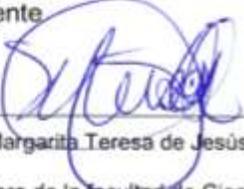

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Suplente


Firma

Dra. Rosa Martha Pérez Serrano
Suplente


Firma


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la facultad de Ciencias Naturales, UAQ


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

Noviembre 2017

Agradecimientos institucionales

Al CONACYT por otorgarme el apoyo de una beca para continuar mi crecimiento profesional.

A la facultad de Medicina de la UAQ por el apoyo técnico del citómetro de flujo, así como el acceso a sus instalaciones.

A la facultad de Ciencias Naturales por aceptarme en el programa de Maestría en Ciencia Biológicas de la UAQ.

Agradecimientos

A mis padres y hermanos por el apoyo que me dieron para venir a Querétaro a realizar mi posgrado.

A Miguel Mercado por todo su apoyo incondicional estos últimos tres años.

Al Dr. Juan Mosqueda por aceptarme desde un inicio en su laboratorio y sobre todo por confiar en mí, también le agradezco por ser una persona que incluye a todos sus integrantes para participar en actividades del laboratorio y por favor nunca pierda la fé.

A la Dra. Rosita Pérez por su apoyo técnico en este trabajo y apoyo personal.

Al Dr. Julio Castañeda por sus enseñanzas, aunque fueron breves, pero muy significativas para mí.

Al Dr. Alfredo Lagunas y la Dra. Carla Contreras del INSP, aunque no puede colaborar con ustedes en este proyecto, pero les agradezco por haberme enseñado los principios del cultivo celular y ser buenos profesionales, así como ser buenas personas con valores.

A la Dra. Guadalupe Zaldívar por tener la iniciativa y confianza de poder usar su citómetro e instalaciones.

I. RESUMEN

Babesia bovis es un hemoparásito de importancia económica que causa la babesiosis, los signos clínicos son pérdida de peso, anemia y muerte en animales jóvenes. Para el control de la babesiosis se emplean compuestos químicos como el imidocarb, sin embargo, se ha encontrado la presencia de estas drogas en la carne y leche, además de que causan graves daños al medio ambiente. Otra alternativa de control es la inmunización con vacunas vivas, que tienen la capacidad de generar respuesta inmune de protección caracterizada por células T CD4 + efectoras / memoria (CD4 + / CD45RO +). Sin embargo, los costos de producción de las vacunas vivas son elevados y tienen probabilidad de desarrollo de la enfermedad causada por la reversión de la virulencia del parásito atenuado. Por lo que se ha propuesto utilizar péptidos sintéticos de las proteínas de superficie de merozoíto *B. bovis* y que pueden generar una respuesta inmune de protección contra *B. bovis*. En este estudio se evaluó la respuesta inmune celular que generan péptidos que contienen epítomos B de las proteínas AMA-1, MSA2C y RAP1. Se inmunizaron dos bovinos jóvenes por cada péptido de siete meses de edad con 100 µg de péptido cada 21 días en cuatro ocasiones. Después de un año, se colectaron muestras de sangre de los bovinos inmunizados y se obtuvieron células mononucleares (PBMC) purificándolas en un gradiente de ficoll. Un total de 1×10^6 PBMC se estimularon con 5 µg / ml de cada péptido, 5 µg / ml de concanavalina A como control positivo y como control negativo se utilizaron células no estimuladas. Los cultivos en triplicados se incubaron durante 72 horas a 37 ° C con 5 % de CO₂. A las 18 horas de estimulación, se colectaron sobrenadantes de los cultivos para la cuantificación de la producción de citocinas (INF-γ, IL-10 e IL-4) por ELISA. Se identificaron poblaciones de linfocitos T CD4 +, células T efectoras (CD4 + / CD45RO +) y WC1 + gamma-delta por citometría de flujo con el fin de evaluar la respuesta inmune generada por los péptidos. Las células estimuladas con los péptidos P2AMA1 y P3MSA2c obtuvieron un porcentaje significativamente mayor de células T efectoras, observando las mismas diferencias en la producción de INF-gamma. Para los péptidos P4MSA2C, P3RAP1 y P5RAP1 se obtiene un alto porcentaje de células T CD4 +, pero un porcentaje menor de células T efectoras en comparación con las no estimuladas. El porcentaje de células T-γδ no mostraron diferencias significativas, por lo cual no regulan el proceso de reconocimiento de los péptidos. Para efectos de este estudio los péptidos P2AMA-1 y P3RAP-1 contienen epítomos T porque mostraron porcentajes significativos de células T efectoras, por lo cual se pueden emplear como futuros agentes inmunizantes contra *B. bovis*.

Palabras clave: *Babesia bovis*, citometría de flujo, péptidos, vacunas y células T.

II. SUMMARY

Babesia bovis is a hemiparasite of economic importance that cause babesiosis weight loss, anemia and young calves' dead. For the control of the babesiosis use chemical compounds as ivermectin, but this cause damage in final products obtained of bovine. Other control alternative is the immunization with from live vaccine, which have the capacity generate of protection immune response characterized for effector/memory CD4+ T cell (CD4+/CD45RO+). However, costs of production for live vaccines are expensive and which have probability of development babesiosis caused by reversal of virulence of attenuated parasite. For what have been proposed use synthetics peptide of merozoite surface proteins B. bovis and which can generate an immune response of protection against *B. bovis*. In this study was evaluated immune response that generates the synthetic peptides of B epitopes of proteins AMA-1, MSA2C and RAP1. Were immunize two young bovines per peptide seven months old age approximately whit 100 µg peptide each 21 day for four times, after one year were collected blood sample the immunized bovines and obtain mononuclear cells (PBMC) with ficoll gradient. Were stimulated 1x10⁶ PBMC with 5 µg/ml of peptide, 5 µg/ml Concanavalin A as positive control, as negative control used non-stimulated cells, during 72 hours, 37 °C with 5 % CO₂ and 18 hours of stimulated was collect supernatants of cultures for cytokines evaluation (INF-gamma, IL-10 e IL-4). They were identified population of CD4+ T cells, effector T cells (CD4+/CD45RO+) and WC1+ gamma-delta T cells by flow cytometry with the purpose of evaluation of immune response generated by the peptides. Cells stimulated with peptides P2AMA1 and P3RAP1Bov obtained a high percentage effectors T cells in comparison that non-stimulated. Cells stimulated with peptides P2AMA1 and P3RAP1Bov obtained a high percentage effectors T cells in comparison that non-stimulated, they were observing same differences in INF-gamma production. For peptides P4MSA2CBov, P3RAP1Bov and P5RAP1Bov obtain a high percentage CD4+ T cells, but a less percentage effectors T cells in comparison that non-stimulated.

Key words: *Babesia bovis*, flow cytometry, peptides, vaccine and T cells

III. ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Respuesta inmune celular protectora contra Babesia bovis.....	14
2.1.1. Importancia de las células T CD4+ en la respuesta inmunitaria protectora contra B. bovis.....	14
2.1.2. Importancia de las células T- $\gamma\delta$ en la respuesta inmune	15
2.1.3. Rol de las citocinas en la respuesta inmune contra B. bovis	16
2.2. Proteínas candidatas como agentes vacunales.....	17
2.2.1. Antígeno de Superficie de Merozoíto (MSA-2c)	17
2.2.2. Proteína Asociada a Roptrías (RAP-1).....	18
2.2.3. Antígeno de Membrana Apical (AMA-1).....	18
2.3. Inmunización contra Babesia bovis	19
2.3.1. Vacunas vivas.....	19
2.3.2. Exoantígenos.....	20
2.3.3. Proteínas recombinantes como agentes inmunizantes	20
2.3.4. Péptidos sintéticos	21
2.4. Evaluación de la respuesta inmune celular de agentes vacunales	22
2.4.1. Proliferación celular	22
2.4.2. Uso de clonas de células T CD4+	24
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. Hipótesis	25
5. Metodología	26
5.1. Diagrama de flujo	26
5.2. Inmunización de animales	27
5.3. Obtención de muestra	28
5.4. Citometría de flujo para identificación de poblaciones celulares (CD4+, CD45RO+ y WC1+.....	29
5.4.1. Fijación, tinción de células e identificación de linfocitos por citometría de flujo .	29
5.4.2. Titulación de anticuerpos	30
5.5. Reestimulación in vitro con péptidos de B. bovis	32

5.6. Evaluación de citocinas	33
6. Resultados	34
6.1. Tiempo de fijación de células	34
6.2. Titulación de anticuerpos.....	34
6.2.1. Titulación de anti-CD4.....	35
6.2.2. Titulación de anti-CD45RO	37
6.2.3. Titulación de anti-WC1.....	38
6.3. Identificación de poblaciones de células T CD4+/CD45RO+ y T WC1+ de cultivo celular por citometría de flujo	41
6.3.1. Expresión de células T CD4+ de PBMC's estimulados con péptidos de B. bovis	41
6.3.2. Expresión de células T efectoras (CD4+/CD45RO+)	42
6.3.3. Expresión de células T $\gamma\delta$ (WC1+).....	44
6.4. Evaluación de citocinas	45
6.4.1. Evaluación de INF- γ	45
6.4.2. Evaluación de IL-10	47
7. Discusión	48
8. Conclusión.....	50
9. Referencias Bibliográficas	52
10. Anexo	59

IV. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 5.1 Esquema de inmunización	27
Ilustración 5.2 Diseño de panel de citometría de flujo.	31
Ilustración 5.3 Diseño de panel para identificación de células T- $\gamma\delta$	32
Ilustración 6.1 Prueba de tiempo de fijación.....	34
Ilustración 6.2 Grafica de índice de tinción anti-CD4 de bovino	36
Ilustración 6.3 Histograma de titulación CD4 para identificación de células T efectoras	36
Ilustración 6.4 Grafica de índice de tinción de anti-CD45RO de bovino	38
Ilustración 6.5 Histograma de titulación CD45RO para identificación de células T efectoras.....	38
Ilustración 6.6 Grafica de índice de tinción de anti-WC1 de bovino.....	40
Ilustración 6.7 Histogramas titulación WC1 para identificación de células T- $\gamma\delta$	40
Ilustración 6.8 Grafica de porcentaje de células T CD4+	42
Ilustración 6.9 Grafica de porcentaje de células T efectoras	43
Ilustración 6.10 Grafica de porcentaje de células T- $\gamma\delta$ WC1+	45
Ilustración 6.11 Concentración de INF- en sobrenadantes de cultivo. Ilustración 6.10 Grafica de porcentaje de células T- $\gamma\delta$ WC1+	45
Ilustración 6.12 Concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo.....	47

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Péptidos de B. bovis	28
Tabla 5.2 Anticuerpos para citometría de flujo	30
Tabla 6.1 Índice de tinción anti-CD4	35
Tabla 6.2 Índice de tinción anti-CD45RO	37
Tabla 6.3 Índice de tinción anti-WC1	39
Tabla 6.4 Porcentaje de células T CD4+.....	42
Tabla 6.5 Porcentaje de células T efectoras CD4+/CD45RO+.....	43
Tabla 6.6 Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ WC1+	44

1. INTRODUCCIÓN

Babesia es un género de hemoparásitos causante de la babesiosis bovina, en México, es transmitida por garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus*. Los principales signos clínicos de esta enfermedad son: pérdida de peso, anemia e incluso la muerte del animal, lo cual causa pérdidas económicas a la industria ganadera. En regiones tropicales y subtropicales, las especies más comunes del género *Babesia* son *B. bigemina* y *B. bovis* (Schnittger *et al.*, 2012).

La inmunización es una medida de control que se ha propuesto para la protección inmune y de larga duración en bovinos contra la babesiosis. Se han empleado diferentes técnicas como; vacunas vivas atenuadas, exoantígenos, proteínas recombinantes de la superficie del merozoíto y péptidos sintéticos con epítomos B conservados de las proteínas involucradas en el proceso de invasión de este protozoario (De wall y Combrink, 2006).

Las vacunas vivas atenuadas, que se han caracterizado por favorecer la activación de células específicas del sistema inmune contra *B. bovis* (T CD4+) y favorecer la producción de anticuerpos específicos (IgG2) (Combrink *et al.*, 2010), las desventajas del uso de vacunas vivas son: el alto costo de producción, porque, para su producción es necesario un animal donador de eritrocitos infectados, personal capacitado para el cultivo y atenuación de *B. bovis* y una cadena fría para el mantenimiento de la vacuna. Otras desventajas son; que existe el riesgo de que se revierta la virulencia de la cepa utilizada, riesgo de contaminación por otros patógenos que provengan del animal donador (De Wall y Combrink 2006).

Con el propósito de desarrollar agentes vacunales, que fueran menos costosos de producir y al mismo tiempo generen una respuesta inmune contra *B. bovis*, se inició el desarrollo de proteínas recombinantes a partir de extractos de parásitos o proteínas de superficie de merozoitos de *B. bovis* (RAP-1, MSA-1), involucradas en la invasión al eritrocito (Wright *et al.*, 1992; Hines *et al.*, 1995; Norimine *et al.*, 2003).

Las proteínas recombinantes usadas como agentes vacunales MSA-1 y RAP-1, en ensayos *in vitro* se observó que los anticuerpos tienen actividad neutralizante, mayor población de células T efectoras CD4+, Sin embargo, estas proteínas no generaron respuestas inmunitarias de protección porque, los animales inmunizados con dichas proteínas no pudieron combatir la infección de una cepa de *B. bovis*. Por lo tanto, se ha observado que la inmunización contra una sola proteína no era suficiente para la inmunoprotección y que hay posibilidad de que exista más de un mecanismo de invasión al eritrocito (Hines *et al.*, 1995; Norimine *et al.*, 2005).

Con el propósito de desarrollar una vacuna comercial que no tenga los inconvenientes de las vacunas vivas atenuadas, se ha propuesto el uso de vacunas recombinantes que contengan epítomos B y T conservados e inmunogenico de las proteínas de la membrana de *Babesia* involucradas en el proceso de invasión a los eritrocitos. Se ha demostrado que estas proteínas de membrana pueden inducir una respuesta inmune contra *B. bovis* mediante la activación de células T CD4+ secretoras de INF- γ , involucradas en el desencadenamiento de la producción de anticuerpos opsonizantes y activadores del complemento como IgG2 (Brown *et al.*, 2006; Suarez & Noh, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

Babesia bovis es un hemoparásito intraeritrocítico que es transmitido por garrapatas y es de importancia veterinaria, ya que afecta a la industria ganadera debido a las pérdidas económicas que causa. Para su control, se han propuesto medidas preventivas como la vacunación. Actualmente, en unas partes del mundo, existen vacunas vivas atenuadas, que ofrecen inmunoprotección contra *B. bovis* (citas), sin embargo, su producción es costosa y en algunos casos se puede presentar riesgos de reversión de virulencia. Como alternativa se propone usar vacunas que contengan epítomos B y T, sean de proteínas de *B. bovis* involucradas en la invasión del eritrocito y se encuentren en regiones conservadas. Estas vacunas, además de estar diseñadas con las características antes mencionadas, también deben tener la capacidad de generar anticuerpos específicos contra los epítomos y una respuesta inmune celular

de tipo inmune protectora caracterizada por el aumento de células T CD4+/CD45RO+ o T efectoras, con capacidad para producir INF- γ . Hidalgo 2015, predijo péptidos que contiene epítomos B conservados de las proteínas AMA-1, RAP-1 y MSA-2c de *B. bovis*, los cuales se proponen como agentes vacunales, sin embargo, se desconoce si estos péptidos contienen epítomos T y si generan respuestas inmunitarias mediadas por células, por lo que en este trabajo se propone la evaluación inmune celular de dichos péptidos; para la identificación de epítomos T protectora mediante la inmunotipificación de células T efectoras por citometría de flujo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Respuesta inmune celular protectora contra *Babesia bovis*

El estudio de la respuesta inmune es indispensable para conocer los mecanismos por los cuales el hospedero combate la infección por patógenos, el mecanismo por el cual el patógeno evade el sistema inmune, y para el desarrollo de agentes vacunales. En *B. bovis* el estudio de la respuesta inmune mediada por células se inició para conocer los mecanismos de una respuesta inmunitaria contra este patógeno y para identificar posibles agentes vacunales (Brown *et al.*, 1994b).

2.1.1. Importancia de las células T CD4+ en la respuesta inmunitaria protectora contra *B. bovis*

El uso de clonas de células T hicieron posible el estudio de la respuesta inmune contra *B. bovis*. Uno de los primeros trabajos para dar a conocer específicamente que tipo de célula T era la principal en la respuesta inmune fue el trabajo de Brown y Logan (1991). En el cual infectaron bovinos con *B. bovis*, los bovinos que sobrevivieron a la infección se usaron para la obtención de células T, las cuales se usaron para obtener clonas. Las clonas de células T fueron estimuladas con merozoitos de *B. bovis*, con sobrenadantes de cultivo de eritrocitos infectados o con membranas de merozoitos durante siete semanas, durante el tiempo de cultivo, se analizó el fenotipo de las clonas T por citometría de flujo para determinar qué tipo de célula se estimulaba con los antígenos. El resultado fue que las clonas con fenotipo CD4+ aumentaban durante las siete semanas, mientras que las clonas con fenotipo CD8+ disminuían. Sin embargo, para las clonas de fenotipo T- $\gamma\delta$ incrementaron solo para un antígeno. Con estos resultados se confirmó que los antígenos de *B. bovis* estimulan las células T CD4+ y que estas células eran específicas contra el antígeno.

La participación de las T CD4+ requiere de otros factores que ayuden a mediar la respuesta inmune. El INF- γ es una citocina que tiene efecto sobre los

macrófagos. Cuando esta es secretada por la célula T CD4+ específica de antígeno de *B. bovis*, estimula directamente sobre los macrófagos para la producción de NO y que estos a su vez, ayuden a la opsonización con anticuerpos específicos (IgG2) de *B. bovis* (Stich *et al.*, 1998; Shoda *et al.*, 2000).

Otra característica de las células T CD4+ es que participan como células de memoria. Estas células cuentan con el fenotipo CD45RO+ en células de bovinos inmunizados con *Trypanosoma brucei*. Sin embargo, en clonas de células T CD4+ de bovinos infectados con *B. bovis*, se encontró la expresión de las moléculas CD45RO y CD62L, además este fenotipo influía en la producción de INF- γ y TNF- α (Howard *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1993b, Stich *et al.*, 1998). Se han encontrado transcritos de mRNA de INF- γ en células con fenotipos CD4+/CD45RO+ (Sopp y Howard, 2001).

2.1.2. Importancia de las células T- $\gamma\delta$ en la respuesta inmune

Las células T- $\gamma\delta$ son células que se encuentra en mayor proporción (30-60%) en la periferia de los rumiantes en comparación de otras especies. Estas células han sido poco estudiadas sobre su funcionamiento en la respuesta inmune, sin embargo, algunas de sus funciones son como célula T reguladora y tiene un papel en las infecciones intracelulares.

Las células T- $\gamma\delta$ de bovino estas divididas en tres subpoblaciones que están basadas en la molécula WC1 o conocida por sus siglas en ingles Workshop Cluster 1. Las tres subpoblaciones son WC1.1, WC1.2 y WC1.3 y cada subpoblación tiene una función distinta sobre la respuesta inmune (Rogers *et al.*, 2005).

Las células T- $\gamma\delta$ que fungen como células T reguladoras tienen actividad supresora sobre las células T- $\alpha\beta$ (CD4+ ó CD8+). Esta función está dada por el fenotipo WC1.2 + y la secreción de IL-10 de las mismas, de manera que influye directamente sobre la proliferación de células T CD4+ antígeno-específicas y las células T CD8+ antígeno-específicas y la secreción de interleucinas como INF- γ (Rogers *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2014). Por otra parte, las células T- $\gamma\delta$ tienen un

papel importante en la resistencia contra infecciones intracelulares como *Mycobacterium bovis*. En este caso las células T- $\gamma\delta$ WC1.1+ que se encuentran en la periferia se activan en presencia de células infectadas con *M. bovis*, en donde estas secretan interleucinas como IL-2, TNF- α y INF- γ , activan a las células T WC1+ que se encuentran en los tejidos y presenta el antígeno por otra vía alterna a la de las células T- $\alpha\beta$. También se ha encontrado que esta población de células puede fungir como células presentadoras de antígeno (Collings *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2002; Pollock y Wels, 2002; Rogers *et al.*, 2005).

2.1.3. Rol de las citocinas en la respuesta inmune contra *B. bovis*

Las citocinas juegan un papel importante ya que estas pueden potencializar, regular o suprimir otras citocinas que influyen sobre la activación celular. En estudios con *B. bovis* se ha demostrado que el INF- γ secretado por las células T CD4+ efectoras potencializan la producción de NO en macrófagos y la producción de IgG2 (Estes, 1996; Stich *et al.*, 1998).

La IL-4 juega un papel importante sobre la inhibición de producción de NO por macrófagos ante la presencia de INF- γ secretado en células NK, esto en una respuesta innata de *B. bovis* (Goff *et al.*, 2002 b). Sin embargo, en una respuesta adaptativa la IL-4 no tiene efecto negativo sobre INF- γ secretado por células T CD4+ para la producción de IgG2 (Estes, 1996).

La IL-10 es una citocina que en respuesta innata contra *B. bovis* tiene efecto supresor sobre IL-12 e INF- γ en células NK (Goff *et al.*, 2002 a). En respuesta adaptativa contra *B. bovis*, presenta un efecto supresor sobre las células presentadoras de antígeno (Brown *et al.*, 1994a)

En la respuesta innata contra *B. bovis*, la IL-12 secretada por los macrófagos, en sinergia con IL-18 (Shoda *et al.*, 1999) estimularan a las células NK del bazo para la producción de INF- γ . Y la producción de INF- γ incrementa la actividad en la célula dendrítica inmadura, la cual migra para iniciar con el proceso

de presentación de antígeno a la célula T virgen (Goff *et al.*, 2003; Goff *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2011).

2.2. Proteínas candidatas como agentes vacunales

Una de las estrategias para elegir proteínas como agentes vacunales, es identificar aquellas que inducen una respuesta efectora basada en células T CD4+ / secretoras de INF- γ y que, además, se encuentren en la superficie de la membrana de los merozoitos, o que participen en la invasión al eritrocito (Brown *et al.*, 2006; Suarez & Noh, 2011) algunas de estas proteínas se describen a continuación:

2.2.1. Antígeno de Superficie de Merozoíto (MSA-2c)

Es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de proteínas VMSA (Variable Merozoite Surface Antigen). Esta proteína se encuentra expresada en la superficie de merozoíto de *Babesia* y se encuentra implicada en la adhesión al eritrocito durante el proceso de invasión. La familia de proteínas de MSA incluye MSA-1 y MSA-2, la proteína de MSA-1 contiene un gen unicopia muy polimórfico, mientras que MSA-2 es una familia de cuatro genes polimórficos muy parecidos entre si (MSA-2a1, a2, b, c) (Suarez *et al.*, 2000). De las cuatro, la proteína MSA-2c es la proteína más conservada entre distintas cepas de *B. bovis* a nivel geográfico (México-Australia) a diferencia de las demás, lo cual es una característica que la acredita como una propuesta vacunal (Florin-Christensen *et al.*, 2002).

Otras características importantes de la proteína MSA-2c y por la cuales se ha propuesto como un agente vacunal, es por ser una proteína superficie en el merozoíto y esporozoíto de *B. bovis*, además contiene epítomos B que inducen anticuerpos neutralizantes (Mosqueda *et al.*, 2002; Wilkowsky *et al.*, 2003). Domínguez *et al.* (2010) realizaron predicciones de epítomos de células B de MSA-2c de *B. bovis in silico*, a partir de los cuales se sintetizaron péptidos. Posteriormente se inmunizaron ratones, los cuales produjeron anticuerpos contra los epítomos B.

2.2.2. Proteína Asociada a Roptrías (RAP-1)

La Proteína Asociada a Roptrías 1 (RAP-1) es una proteína que se localiza en las roptrías del merozoíto de *Babesia*, la cual es secretada durante el proceso de invasión al eritrocito, su función es modificar la membrana del eritrocito para la invasión del merozoíto. La proteína de RAP-1 es codificada por un gen que está en dos copias las cuales fueron generadas por duplicación a partir de un solo gen (Suarez *et al.*, 1998).

La proteína RAP-1 presenta epítomos T conservados entre distintas cepas de *B. bovis* provenientes de varias zonas geográficas (México, Texas, Australia e Israel). Sin embargo, la proteína RAP-1 en estado nativo induce inmunidad parcial en bovinos ya que se ha encontrado que reduce el porcentaje de parásitos después de un desafío, pero no se mostraron títulos de anticuerpos (Brown *et al.*, 1996; Yokoyama *et al.*, 2002).

Norimine *et al.*, (2002) analizaron las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína RAP-1, encontrando que la región amino terminal contiene residuos de cisteínas y es conservada estructuralmente entre diferentes especies de *Babesia*, mientras que la región carboxilo terminal contiene repeticiones en tandem de 23 aminoácidos. Produjeron proteínas recombinantes de ambas regiones y péptidos sintéticos y estimularon clonas de células T CD4+ de memoria de bovinos inmunizados con *B. bovis*. Las células estimuladas con regiones amino terminal mostraron ser epítomos T más inmunodominantes que las regiones carboxilo terminal.

2.2.3. Antígeno de Membrana Apical (AMA-1)

Es una proteína de las micronemas presente en todos los parásitos del género apicomplexa, la cual participa en la invasión al eritrocito (Narum y Thomas, 1994). Se ha observado que la exposición de péptidos amino terminal de una secuencia *Plasmodium falciparum* homologa a *B. bovis* inhibe la invasión de los eritrocitos por merozoitos de *B. bovis* hasta un 65 % (Gaffar *et al.*, 2004).

2.3. Inmunización contra *Babesia bovis*

Diversas estrategias de inmunización se han empleado en bovinos como medida preventiva, una vez que se ha inmunizado el bovino este será capaz de generar anticuerpos contra *Babesia*. Algunas de las estrategias de inmunización se mencionan a continuación:

2.3.1. Vacunas vivas

La base de las vacunas vivas atenuadas es a partir de un cultivo de sangre de animales esplenectomizados e infectados con *Babesia*. Este cultivo se logra realizando hasta 20 pases seriados (o hasta que los parásitos atenúen su virulencia) en bovinos esplenectomizados. La sangre se obtiene del bovino del último pase y con ella se preparan las dosis. Posteriormente los bovinos son vacunados con 10^7 parásitos atenuados (Callow *et al.*, 1997).

Las vacunas atenuadas vivas se caracterizan por favorecer la activación de células mediadoras de la respuesta inmunológica TH1 que secretan INF- γ y favorecer la producción de anticuerpos IgG2 específicos contra *Babesia* (Combrink *et al.*, 2010). La vacunación confiere protección inmune hasta por 4 años (Mahoney *et al.*, 1979). Sin embargo, los efectos adversos con vacunas vivas atenuadas son;

- Pérdida de la inmunoprotección de las cepas utilizadas para la vacuna, a causa de las variantes fenotípicas que surgen entre las cepas de *B. bovis*, por lo que es necesario aislar nuevas cepas de *B. bovis* (Bock *et al.*, 1992).
- Costo de producción elevados, incluyendo controles de calidad altamente estrictos para su elaboración, una cadena en frío para el mantenimiento de las vacunas (De Wall & Combrink 2006). Uso de fármacos después de la vacunación, con la finalidad de proteger a los bovinos de una infección natural por periodo de tiempo corto, el uso de fármacos limita el desarrollo de la inmunidad (Kuttler y Johnshon, 1986).

2.3.2. Exoantígenos

La vacunación con exoantígenos consiste en sobrenadantes de cultivos de *Babesia*. Los exoantígenos son proteínas secretadas o parcialmente con proteólisis que son liberadas al medio durante el proceso de invasión. La obtención de exoantígenos se obtiene del sobrenadante de cultivo de una cepa atenuada de *B. bovis* que inducen protección contra la exposición de infecciones heterólogas de diferentes especies de *Babesia*, sin embargo, los exoantígenos, no generan una respuesta inmune mediada por células *Babesia* (Patarroyo *et al.*, 1995).

2.3.3. Proteínas recombinantes como agentes inmunizantes

La propuesta de una vacuna recombinante surgió ante la necesidad de tener un agente inmunizante estable, barato, con actividad inmunoprotectora y reproducible (Wright *et al.*, 1992), características que las vacunas vivas atenuadas no pueden brindar.

Algunos de los primeros antígenos recombinantes fueron las proteínas 12D3, 11C5 y 21B4 obtenidas a partir de extractos de parásitos y separados por cromatografía. Wright *et al.*, en 1987 inmunizaron a bovinos con las subunidades 12D3 Y 11C5, posteriormente desafiaron a los bovinos con una cepa de *B. bovis*, se observó disminución de la parasitemia en los bovinos vacunados después del octavo día post-infección.

Otro trabajo con proteínas recombinantes se realizó con proteínas de la superficie de *Babesia*, como MSA-1. Hines *et al.*, en 1995 generaron la proteína recombinante MSA-1 de *B. bovis*, los bovinos inmunizados con dicha vacuna generaron anticuerpos que tenían la característica de inhibir la invasión de los merozoitos al eritrocito mediante ensayos *in vitro*. Una vez inmunizados los bovinos, estos fueron desafiados con una cepa mexicana de *B. bovis*, los anticuerpos generados no fueron suficientes para disminuir los niveles de parasitemia en los bovinos. Posteriormente se supo que MSA-1 es una proteína de superficie altamente

variable entre cepas que no induce protección cruzada (Borgonio *et al.*, 2008; Tattiyapong *et al.*, 2016).

En otro estudio en donde se utilizó la proteína RAP-1 recombinante, se mostró en los bovinos inmunizados tenían un incremento de proliferación de células T CD4+ y producción de INF- γ . Sin embargo, una vez que los bovinos inmunizados fueron desafiados a una infección con una cepa patógena de *B. bovis*, los animales tuvieron complicaciones y no resistieron a la infección. En este trabajo se concluyó que la inmunización con una sola proteína no es suficiente porque puede haber más de un mecanismo de infección en donde participe más de una proteína (Norimine *et al.*, 2003). Recientemente se han reportado que RAP-1 contiene epítomos conservados de células B, con lo cual se ha propuesto que una alternativa para inmunización es que las vacunas contra *B. bovis* estén dirigidas a producir anticuerpos contra estos epítomos (Suarez *et al.*, 1993; Norimine *et al.*, 2002)

2.3.4. Péptidos sintéticos

Hasta el momento no existe una vacuna comercial sin los inconvenientes de las vacunas vivas atenuadas. Recientemente, se ha propuesto el uso de péptidos conteniendo epítomos conservados e inmunogénos de proteínas de *Babesia*, con los cuales se puede inicialmente identificar a aquellos que confieren respuestas inmunitarias de tipo TH1 y que induzcan anticuerpos neutralizantes. Esto puede hacerse de forma muy específica utilizando péptidos sintetizados de forma química. Los péptidos sintéticos son herramientas muy útiles en este primer paso. Sin embargo, para poder desarrollar estas herramientas es necesario utilizar tecnologías que incluyan conocimientos de genómica, proteómica y bioinformática, apoyadas en la investigación de genes con potencial diagnóstico o vacunal, y el conocimiento sobre la respuesta inmune contra *B. bovis*. El objetivo a largo plazo sería, con los péptidos identificados que cumplan con las características necesarias, ensamblarlos en moléculas mutiepitópicas que incluyan solo estas secuencias conservadas y que sean evaluadas como vacunas de nueva generación (Brown *et al.*, 2006; Mosqueda *et al.*, 2012).

2.4. Evaluación de la respuesta inmune celular de agentes vacunales

La evaluación de la respuesta inmune mediada por células da información si un agente vacunal induce una respuesta inmune protectora. Con esta evaluación se puede determinar el fenotipo celular y con ello, si algún antígeno contiene epítomos T. La producción de citocinas corresponde a la respuesta celular, pero a pesar de la evaluación que se realice es importante tener en cuenta si la evaluación será de forma *in vitro* o *ex vivo*.

La evaluación de un candidato vacunal en *B. bovis* se puede llevar a cabo de manera *in vitro* o *ex vivo*. La evaluación *in vitro* da un panorama general de la manera en que se induce la respuesta inmune en un ambiente controlado en donde se analiza una variable de respuesta. La metodología consiste en la identificación de candidatos vacunales, los cuales contienen características como:

- Inmunogenicidad.
- Que sean proteínas de superficie del merozoíto.
- Que contengan epítomos T y B conservados.
- Que induzcan una respuesta inmune T CD4+ con producción de INF- γ .
- Que tengan capacidad para inducir la producción de anticuerpos, lo cuales inhiban la invasión del merozoíto al eritrocito (Brown y Palmer 1999; Brown *et al.*, 2006; Mosqueda *et al.*, 2012).

Para la evaluación de los agentes vacunales se han propuesto métodos y herramientas *in vitro*, de las cuales las más empleadas son: las clonas de células T, proliferación celular, inmunotipificación por citometría de flujo, evaluación de citocinas en sobrenadantes de cultivo (Brown y Rice-Ficht, 1994).

2.4.1. Proliferación celular

El ensayo de proliferación celular es una técnica que permite medir la tasa de duplicación de células en cultivo *in vitro* tras una estimulación, este ensayo nos permite identificar antígenos que tengan la capacidad de generar inmunidad mediada por células (Smits y Riemann, 1988)

El método de timidina tritiada consiste que la timidina ingrese a la membrana celular y sea fosforilada por la TdR quinasa y se incorpore a una cadena de DNA, este método es ideal para la cuantificación de la tasa de división celular, pero el inconveniente que presenta esta técnica son los residuos de la timidina que pueden ser agentes intercalantes (Smits y Riemann, 1988)

Otro método usado para medir proliferación celular es mediante el uso del MTT que es una solución acuosa de sales de 2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-, bromide 298-93-1, al cual las células activas lo metabolizan y el producto final son sales de formazan que precipitan. La precipitación entonces se puede cuantificar por densidad óptica (OD). La OD de las sales de formazan es proporcional a la cantidad de células (Mossman, 1983).

Otro método usado para medir proliferación celular es por CFSE. El CFSE es un colorante que no emite fluorescencia, hasta que es internalizado por las células en donde una esterasa intracelular remueve los dos grupos éster de la molécula CFSE, de manera que queda el grupo succinimidilo que reacciona con el pH neutro de los grupos amino de la membrana celular, formando el compuesto carboxifluoresceína (CF), el cual es fluorescente (Lyons y Parish, 1994). La cantidad de CF es medida por citometría de manera indirecta, es decir cuando mayor intensidad de fluorescencia menor número de divisiones (Quag *et al.*, 2007).

Los métodos anteriores permiten medir la división celular, sin embargo, solo el CFSE puede medir esta división de manera específica y sobre una determinada población, mientras que el método de timidina tritiada, permite medir la velocidad de duplicación de las células.

En la búsqueda de candidatos vacunales contra *B. bovis* la proliferación celular ha ayudado a identificar si los antígenos propuestos contienen epítomos T dominantes y si la respuesta inmune, inducida por los antígenos del parásito, es mediada por células (Brown, 1994).

2.4.2. Uso de clonas de células T CD4+

Una clona de célula T se define como aquella célula derivada de una célula progenitora la cual conserva una misma función y fenotipo a la célula original. El uso de clonas de células en *B. bovis* ha podido ayudar a determinar la respuesta adaptativa y cómo funciona el mecanismo de acción de las células T CD4+ sobre otras células como los macrófagos. También ha ayudado a identificar proteínas con epítopos T dominantes y al mismo tiempo identificar candidatos vacunales (Brown y Fitch, 1994).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* la respuesta inmune celular de bovinos inmunizados con péptidos de *B. bovis*

3.2. Objetivos específicos

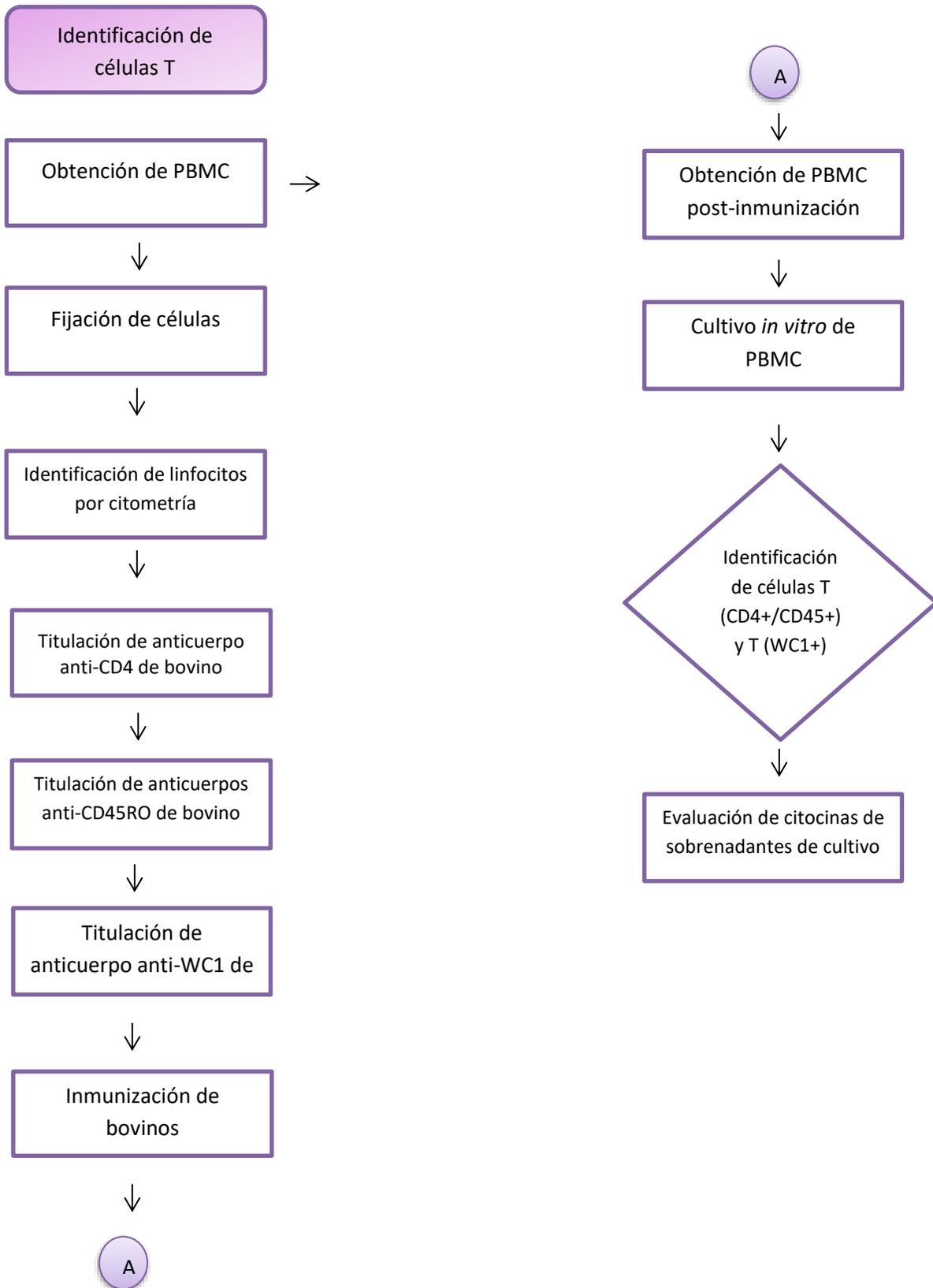
- I. Evaluar la producción de citocinas en cultivo *in vitro* de linfocitos estimulados con péptidos de *B. bovis*.
- II. Identificar poblaciones celulares de linfocitos T CD4+/secretoras de INF- γ , y T- $\gamma\delta$ estimuladas con péptidos de *B. bovis*.
- III. Estandarizar el protocolo de citometría de flujo

4. Hipótesis

Los péptidos con epítomos B conservados de las proteínas AMA-1, RAP-1 y MSA-2c de *B. bovis* también contienen epítomos T que inducen una respuesta inmune T efectora (CD4+/CD45RO+).

5. Metodología

5.1. Diagrama de flujo



5.2. Inmunización de animales

Los animales usados para la evaluación de los péptidos contaron con las siguientes características

- Bovinos Jóvenes de aproximadamente 7 meses.
- Libres de algún contacto con babesiosis o que se encontrarán en una zona libre de garrapatas.

Los animales usados para inmunizaciones se localizaron en el rancho san José de los Ríos, Municipio Abasolo, Guanajuato, México. Para la inmunización de los bovinos se siguió el esquema (ilustración 5.1).

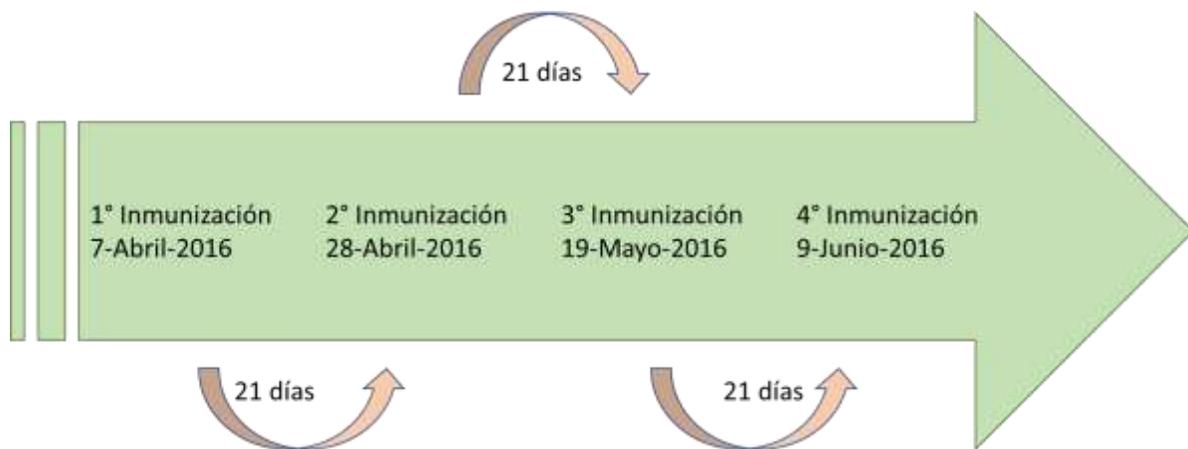


Ilustración 5.1 Esquema de inmunización

Se inmunizaron dos bovinos por péptido por vía subcutánea cada 21 días. La concentración de péptido usada para inmunizar fue de 100 µg de péptido (Tabla 5.1) con adyuvante comercial Montadine™ ISA 71 VG. Los péptidos fueron diseños a partir de secuencia de epítotos B conservados de las proteínas AMA-1, MSA-2c y RAP-1, por predicciones bioinformáticas (Barreda, 2014; Mosqueda, 2017)

Tabla 5.1. Péptidos de *B. bovis*

Proteína	Péptido	
AMA 1	1	Barreda, 2014
	2	
	3	
MSA-2C	P1MSA2CBov	Mosqueda <i>et al.</i> , 2017
	P2MSA2CBov	
	P3MSA2CBov	
	P4MSA2CBov	
RAP-1	P1RAP1Bov	Mosqueda <i>et al.</i> , 2017
	P2RAP1Bov	
	P3RAP1Bov	
	P4RAP1Bov	
	P5RAP1Bov	

5.3. Obtención de muestra

Se realizó la obtención de sangre periférica de la vena yugular del bovino con agujas en tubos con EDTA (BD vacutainer®), para la obtención de PBMC, siguiendo el protocolo:

1. Se vertieron los tubos con sangre periférica (15 ml) obtenida del bovino en un tubo cónico de 50 ml.
2. Se diluyo la sangre en solución salina amortiguada de fosfatos (PBS 1X) pH 7.4 (Anexo 1), proporción 1:1 (15 ml de sangre y 15 ml de PBS) y se homogenizo por inversión.
3. En un tubo cónico de 50 ml se vertió 15 ml de Lymphoprep (Axis-shield) y 15 ml de la mezcla de sangre: PBS, y se agregó con una pipeta serológica de 25 ml la sangre diluida dejándola fluir por la pared del tubo sin mezclar con Lymphoprep y obtener dos fases.
4. Se centrifugo a 800 G durante 20 min a temperatura ambiente (27 °C).
5. Al término de la centrifugación se recuperó la interfaz del gradiente donde se encontraban las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se transfirieron a un tubo cónico de 50.
6. Se lavaron las células con PBS pH 7.4 con 10 ml a 400 G, dos veces.
Se cuantifico el número de células con una cámara de Neubauer.

5.4. Citometría de flujo para identificación de poblaciones celulares (CD4+, CD45RO+ y WC1+

Para la identificación de poblaciones celulares, se usó la citometría de flujo, la cual es una técnica que permite la cuantificación de células e identificación de estas por marcaje con anticuerpos acoplados a un fluoróforo.

5.4.1. Fijación, tinción de células e identificación de linfocitos por citometría de flujo

La fijación y tuición de los PBMC con los anticuerpos se realizó siguiendo el protocolo:

1. Se centrifugaron las células en cultivo a 800 G durante 10 minutos.
2. Se agrego 120 µl de paraformaldehído al 2 %.

3. Se incubó a 4 °C a diferentes tiempos a 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos.
4. Las células fijadas con paraformaldehído se lavaron con PBS 1X pH 7.4 y se centrifugaron a 800 G durante 10 minutos a 4 ° C, por dos veces.
5. Se adicionaron 100 µl de buffer de bloquéo (anexo 3), las células se incubaron durante 15 minutos a 4 ° C.
6. Las células se lavaron con PBS 1X pH 7.4 y se centrifugaron a 800 G durante 10 minutos a 4 ° C, por dos veces.
7. Se adicionó 100 µl de volumen final de buffer de tinción (Anexo 4) y anticuerpos al botón celular y se incubó 30 minutos a 4 ° C en total oscuridad.
8. Se adicionó 900 µl de buffer de tinción.
9. Se centrifugo a 800 G durante 5 minutos a 4 °C, repetir dos veces
10. El botón celular se resuspendió con 500 µl con PBS 1X pH 7.4.

5.4.2. Titulación de anticuerpos

Se realizó la titulación de anticuerpos en la cual consiste en obtener la dilución que marque una población celular y sea específico. Para la titulación de anticuerpos se usaron 5 diluciones distintas (1:10, 1:25, 1:50, 1:75 y 1:100) en un volumen final de 100 µl, esto se realizó para los anticuerpos que se presentan en la tabla 2, siguiendo el protocolo de abajo después de fijar las células con paraformaldehído 2 %.

Tabla 5.2 Anticuerpos para citometría de flujo

Descripción	Fluorocromo	Marca	Clona
Mouse anti Bovine CD4	Alexa Fluor 647®	AbdSerotec, Bio-rad	CC8
Mouse anti Bovine CD45RO	RPE®	AbdSerotec, Bio-rad	IL-A116
Mouse anti Bovine WC1	FITC®	AbdSerotec, Bio-rad	CC101

Se realizó el diseño de panel para identificación de poblaciones de células T CD4+/CD45RO+ y T WC1+, este diseño se basó en base a estos los siguientes pasos, basdos en el current protocol cytometry (2010) para una citometría directa y en base al equipo usado para este ensayo FACSVERSE DB.

- Anticuerpos primarios conjugados y específicos para la identificación de moléculas de interés.
- Los anticuerpos que están conjugados deben poder tener un marco de lectura.

En la ilustración 5.2 se muestra la estrategia de gates para la identificación poblaciones de células T efectoras (CD4+/CD45RO+) y las células T CD4+; 1) se identificó la población de linfocitos de PBMC, 2) histogramas para la identificación de células marcadas con CD4+ y CD45RO+, 3) a partir de la identificación de las células marcadas positivas con CD4 y CD45RO se hizo un gráfico (dot plot) para identificar las poblaciones positivas a CD4+/CD45RO+.

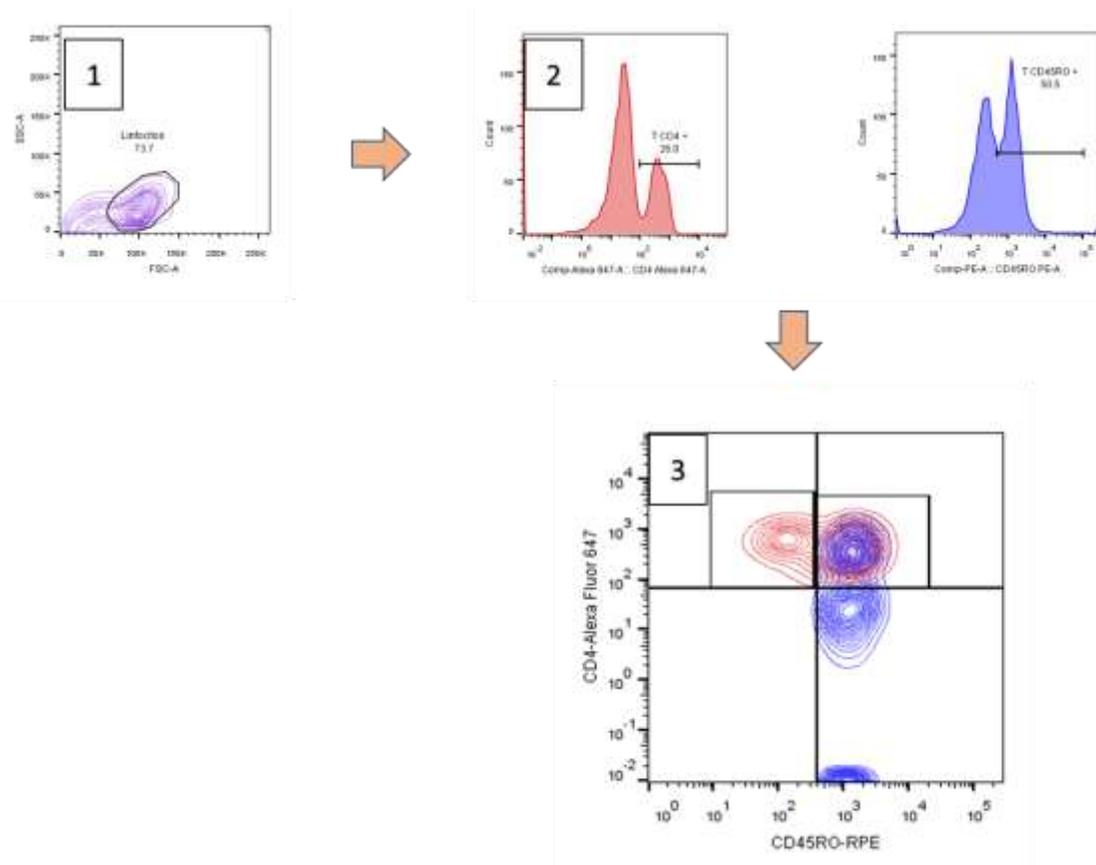


Ilustración 5.2 Diseño de panel de citometría de flujo.

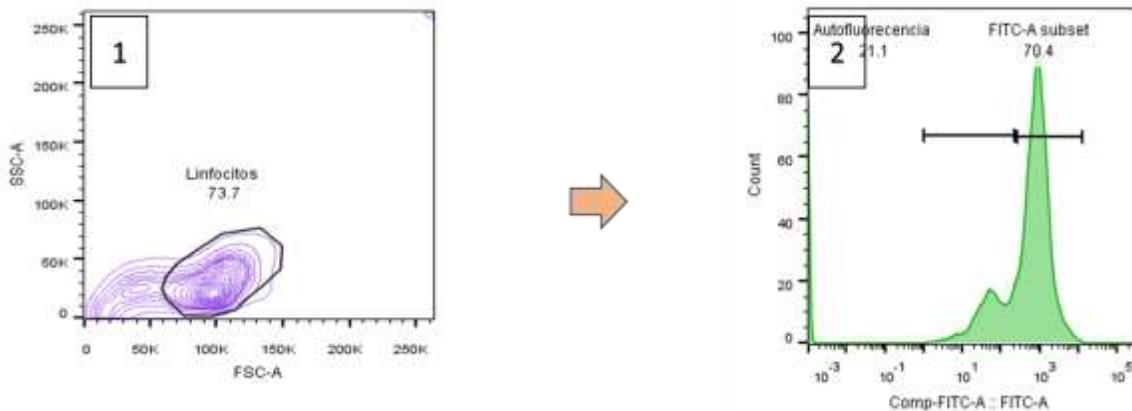


Ilustración 5.3 Diseño de panel para identificación de células T- $\gamma\delta$.

5.5. Reestimulación *in vitro* con péptidos de *B. bovis*

La estimulación *in vitro* de los péptidos se llevó a cabo después de 8 meses de la última inmunización que se aplicó a los bovinos, se obtuvieron muestras de sangre periférica de la vena yugular para la obtención de PBMC de los bovinos inmunizados, los PBMC's fueron estimulados con concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como control positivo, péptidos correspondientes (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tratamientos y como control negativo PBMC sin estimular, durante 72 horas de incubación a 37 °C con 5 % CO_2 cultivados en medio RPMI con 5 % de CO_2 .

Se colectaron sobrenadantes de cultivo a las 18 horas de incubación para medir citocinas. Después del periodo de incubación (72 horas) se hizo el marcaje con los anticuerpos (CD4, CD45RO y WC1) para identificación de poblaciones de células T que fueron estimuladas con los péptidos y compara contra las células no estimuladas.

5.6. Evaluación de citocinas

Se evaluó la concentración de citocinas que están implicadas en la respuesta inmune contra *B. bovis* (INF- γ e IL-10) en sobrenadante de cultivo celular de PBMC's mediante la técnica de ELISA indirecta tipo sándwich (INF- γ , IL-12, IL-10) y ELSA competitiva (IL-10), siguiendo el protocolo de fabricante MyBiosource® (Anexo 5).

6. Resultados

Se realizó el diseño de panel para identificación de poblaciones de células T CD4+/CD45RO+ y T WC1+, el primer paso para el diseño de panel fue

6.1. Tiempo de fijación de células

Los PBMC's fueron fijados con Paraformaldehído al 2 % con tiempos de incubación de 30, 45 y 60 minutos, en la ilustración 6.1 se muestra la población de linfocitos rodeada por el gate, se observa que no hay cambio ni distinción en la morfología y tamaño entre los diferentes tiempos, por la cual se optó por usar 30 minutos de incubación para la fijación.

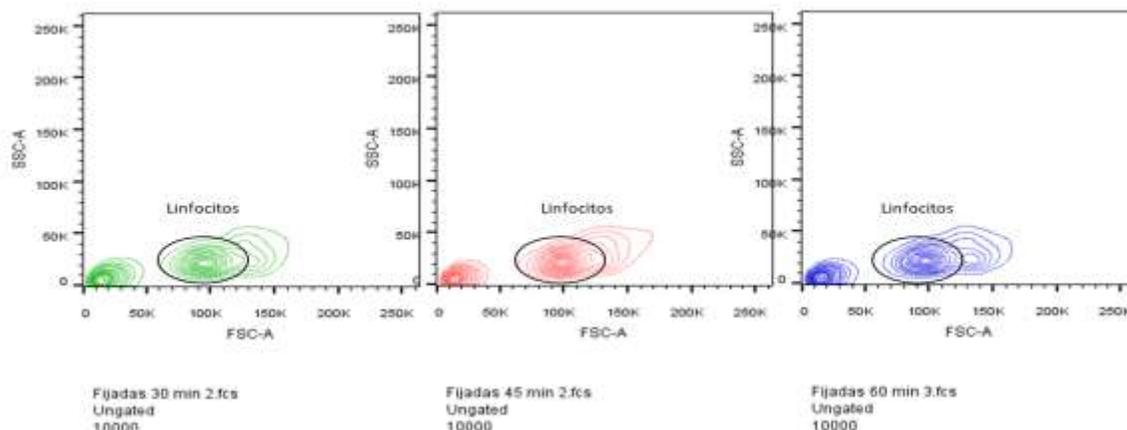


Ilustración 6.1 Prueba de tiempo de fijación

6.2. Titulación de anticuerpos

Se titularon los anticuerpos anti-CD4, anti-CD45RO y anti-WC1 para conocer la concentración mínima de anticuerpo que se pueda usar para la identificación de poblaciones población y distinguir la emisión de fluorescencia de las células marcadas y las células no marcadas. Para cuantificar la emisión de fluorescencia se usó el índice de tinción o Stain Index (SI) que es una medida

adimensional que cuantifica la separación con respecto a distancia entre una población sin marcar con anticuerpos conjugados (autofluorescencia) y una población de células con marcada por anticuerpos conjugados (Bigos, 2007).

6.2.1. Titulación de anti-CD4

Los resultados obtenidos para el anti-CD4 se observa en la gráfica (ilustración 6.2), en la que se observa que el SI desde la concentración indicada por el fabricante 0.05 mg/ml de anti-CD4 hasta la dilución 0.005 mg/ml anti-CD4, hay un incremento en el SI en las concentración 0.002 mg/ml y este incrementó se mantiene hasta la concentración 0.001 mg/ml, después en las siguientes concentraciones 0.006 y 0.005 mg/ml disminuye el SI, lo cual nos inca que en las concentraciones 0.002 y 0.001 mg/ml se pueden usar para marcar células T CD4, para este experimento se usó la concentración de 0.002 mg/ml de anti-CD4 para la fenotipificación celular.

Tabla 6.1 Índice de tinción anti-CD4

Titulación de anti-CD4-Alexa 647					
Concentración mg/ml	SI 1	SI 2	SI 3	Promedio SI	Desviación estándar
0.05	30.00	31.70	32.10	31.27	1.12
0.002	37.50	39.00	37.20	37.90	0.96
0.001	34.00	39.00	39.50	37.50	3.04
0.0066	29.50	32.80	33.70	32.00	2.21
0.005	36.60	32.50	31.20	33.43	2.82

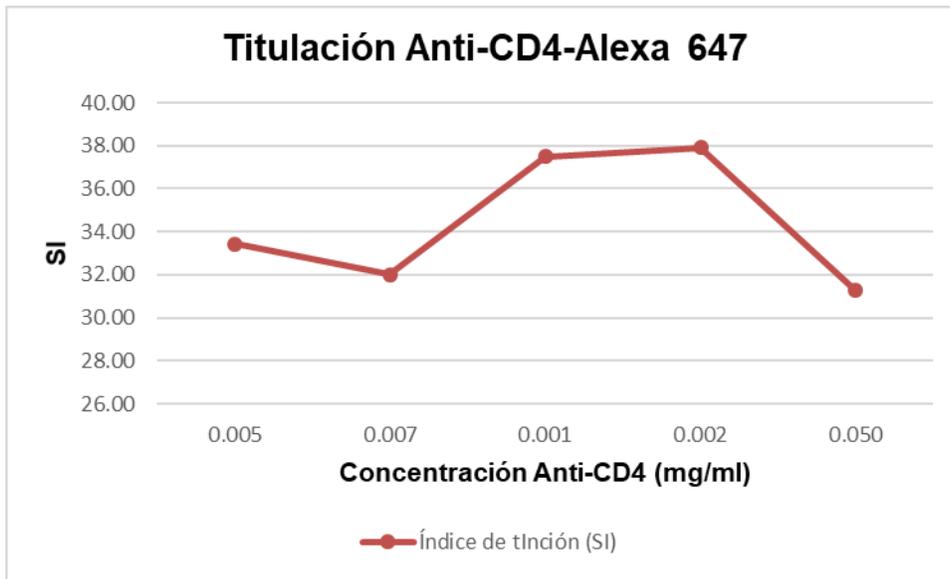


Ilustración 6.2 Grafica de índice de tinción anti-CD4 de bovino

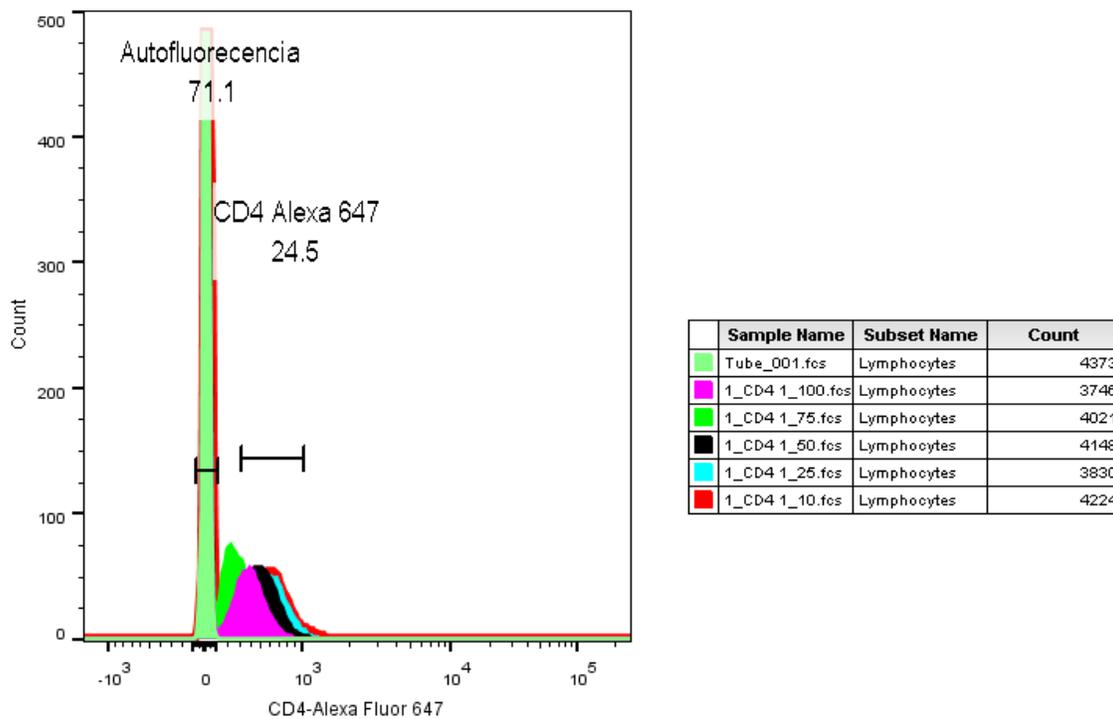


Ilustración 6.3 Histograma de titulación CD4 para identificación de células T efectoras

6.2.2. Titulación de anti-CD45RO

Los resultados obtenidos para el anti-CD45RO se observa en la gráfica (ilustración 6.4), en la que se observa que el SI desde la concentración indicada por el fabricante 0.01 mg/ml hasta la dilución 0.001 mg/ml de anti-CD45RO, en este grafico se observa que no hay un incremento en el SI en las concentraciones posteriores (0.004 - 0.001 mg/ml) y se puede observar una disminución del SI con respecto a la concentración de anti-CD45RO. Este comportamiento se debe a que el anticuerpo tiene poca afinidad, aunque sea específico para la molécula CD45RO.

Con base a los resultados obtenidos se tomó la decisión de usar la concentración de 0.01 mg/ml para análisis posteriores sobre la evaluación del porcentaje de CD4+/CD45RO+ en células estimuladas con péptidos de *B. bovis*.

Tabla 6.2 Índice de tinción anti-CD45RO

Titulación anti-CD45RO-PE					
Concentración (mg/ml)	SI (1)	SI (2)	SI (3)	Promedio SI	Desviación Estándar
0.0100	6.52	6.65	6.74	6.64	0.11
0.0040	2.65	2.59	2.56	2.60	0.05
0.0020	2.08	2.05	2.12	2.08	0.04
0.0013	2.06	2.02	2.08	2.05	0.03
0.0010	2.07	2.15	2.10	2.11	0.04

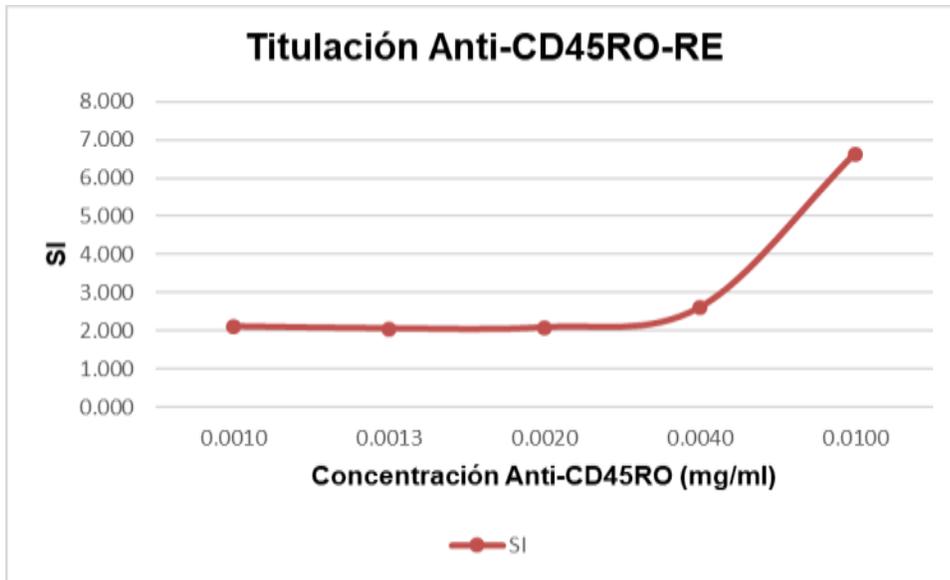


Ilustración 6.4 Grafica de índice de tinción de anti-CD45RO de bovino

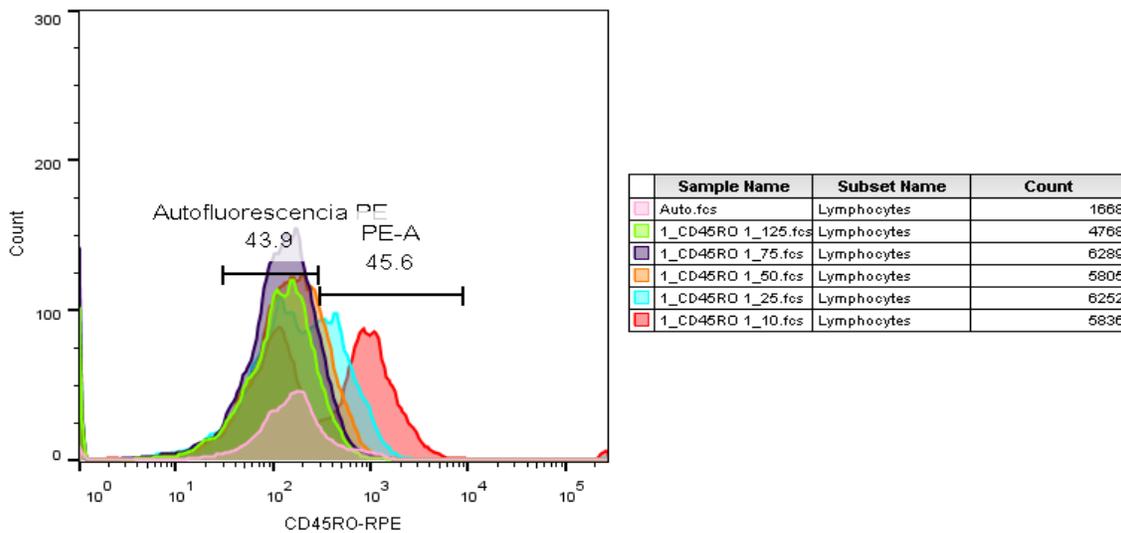


Ilustración 6.5 Histograma de titulación CD45RO para identificación de células T efectoras

6.2.3. Titulación de anti-WC1

Los resultados obtenidos para el anti-WC1 se observa en la gráfica (ilustración 6.6), en la que se observa que el SI desde la concentración indicada por el fabricante 0.01 mg/ml hasta la dilución 0.001 mg/ml de anti-WC1, en este grafico

se observa que no hay un incremento en el SI en las concentraciones posteriores (0.004 - 0.001 mg/ml) y se puede observar una disminución del SI con respecto a la concentración de anti-WC1. Este comportamiento se debe a que el anticuerpo tiene poca afinidad, aunque sea específico para la molécula WC1.

Con base a los resultados obtenidos se tomó la decisión de usar la concentración de 0.01 mg/ml para determinar el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ estimuladas con péptidos de *B. bovis*.

Tabla 6.3 Índice de tinción anti-WC1

Titulación anti-WC1-FITC					
Concentración (mg/ml)	SI (1)	SI (2)	SI (3)	Promedio SI	Desviación Estándar
0.0100	11.40	10.50	10.50	10.80	0.52
0.0040	7.22	5.87	6.38	6.49	0.68
0.0020	3.60	3.38	3.28	3.42	0.16
0.0013	2.07	2.24	2.02	2.11	0.12
0.0010	2.27	2.12	2.23	2.21	0.08

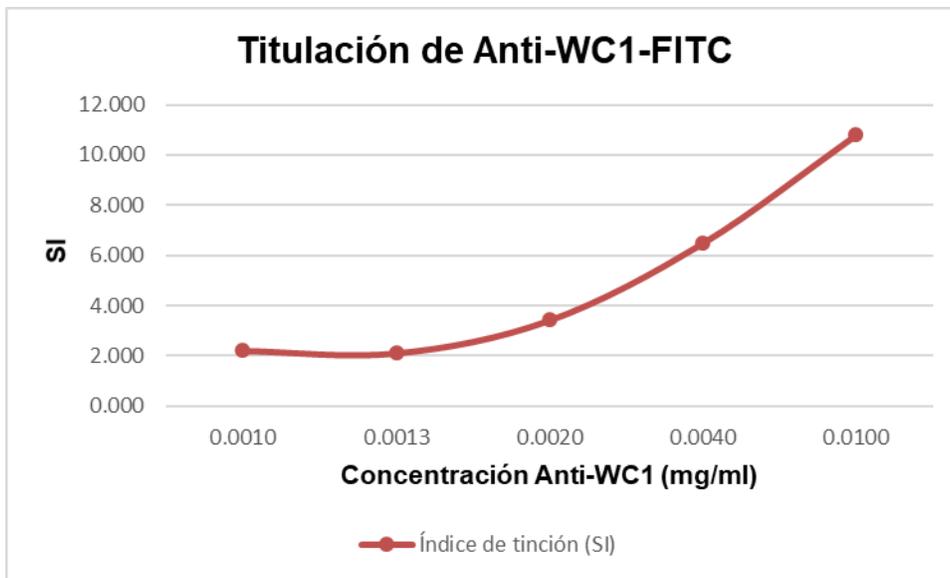


Ilustración 6.6 Grafica de índice de tinción de anti-WC1 de bovino

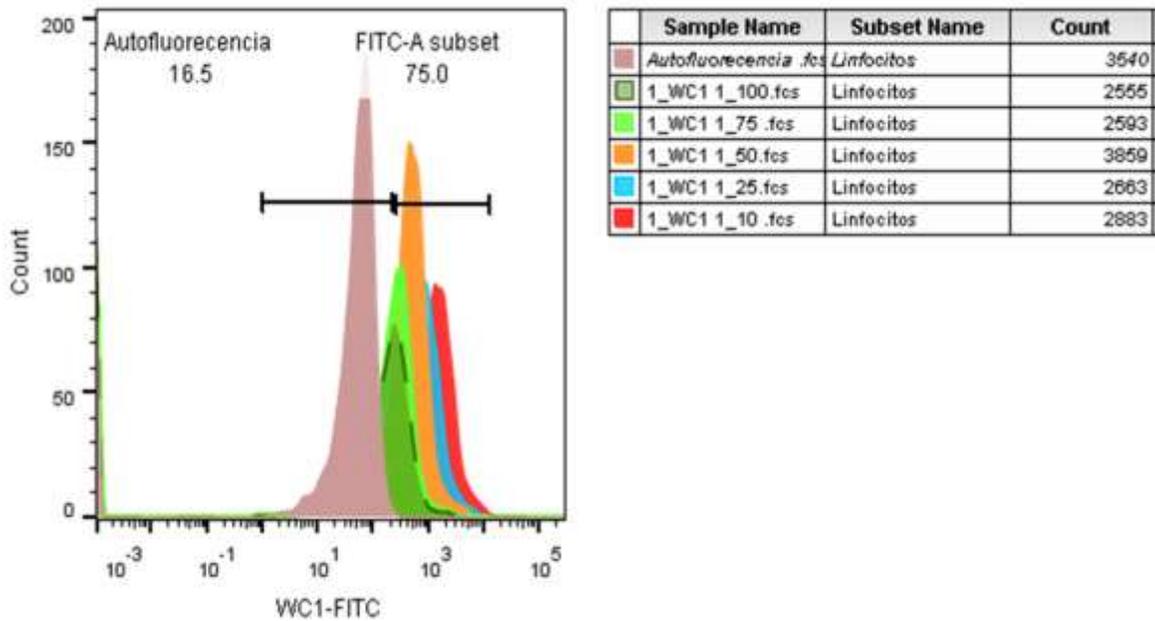


Ilustración 6.7 Histogramas titulación WC1 para identificación de células T- $\gamma\delta$

6.3. Identificación de poblaciones de células T CD4+/CD45RO+ y T WC1+ de cultivo celular por citometría de flujo

Después de un año de la última inmunización con los péptidos de *B. bovis* que se les aplico a los bovinos, se evaluó la respuesta inmune celular, identificando poblaciones de células T efectoras que expresan en sus superficies las moléculas CD4 y CD45RO y poblaciones de células T $\gamma\delta$ que expresan en sus superficies las moléculas WC1, esta evaluación se realizó por citometría de flujo, Los péptidos que fueron evaluados son los siguientes; P3RAP1Bov, P4RAP1Bov, P5RAP1Bov, P3MSA2CBov, P4MSA2CBov y P2AMA1, esto es un péptido por bovino, debido a causas externas que no se podían controlar, la mayoría de los animales inmunizados no se encontraban en el rancho. Se analizaron las células estimulas con el péptido (EP) y no estimuladas (SE) que corresponde al animal inmunizado y los resultados obtenidos se compararon entre ambos.

6.3.1. Expresión de células T CD4+ de PBMC's estimulados con péptidos de *B. bovis*

En la tabla 6-4 y la gráfica (Ilustración 6.8) se muestran los porcentajes de las poblaciones de células T CD4+ por péptido. Se observa que los péptido P3RAP1Bov y P2AMA1 tienen diferencia numérica de células TCD4+ de células de cultivos no estimulados (SE) en comparación que las células en cultivos estimulados (EP).

Los péptidos P4RAP1Bov y P3MSA2CBov, tienen diferencia numérica en células T CD4+ de cultivos no estimulados en comparación a los cultivos estimulados por los péptidos, mientras que en los péptidos P5RAP1Bov y P4MSA2CBov se muestra diferencia significativa en los cultivos estimulados en comparación de los cultivos no estimulados.

Tabla 6.4 Porcentaje de células T CD4+

Péptido	SE	EP	Valor t	Valor p
	Promedio ± DE	Promedio ± DE		
P3RAP1Bov	20.56 ± 1.02	18.60 ± 2.10	1.46	0.218
P4RAP1Bov	25.77 ± 0.45	27.37 ± 1.27	-2.06	0.108
P5RAP1Bov	25.77 ± 0.91	28.10 ± 0.10	-4.43	*0.011
P3MSA2CBov	15.23 ± 0.49	16.57 ± 1.05	-1.99	0.117
P4MSA2CBov	35.70 ± 0.87	38.07 ± 0.59	-3.90	*0.018
P2AMA1	44.30 ± 3.73	41.63 ± 0.42	1.23	0.286

*Datos con diferencia significativa $p < 0.05$

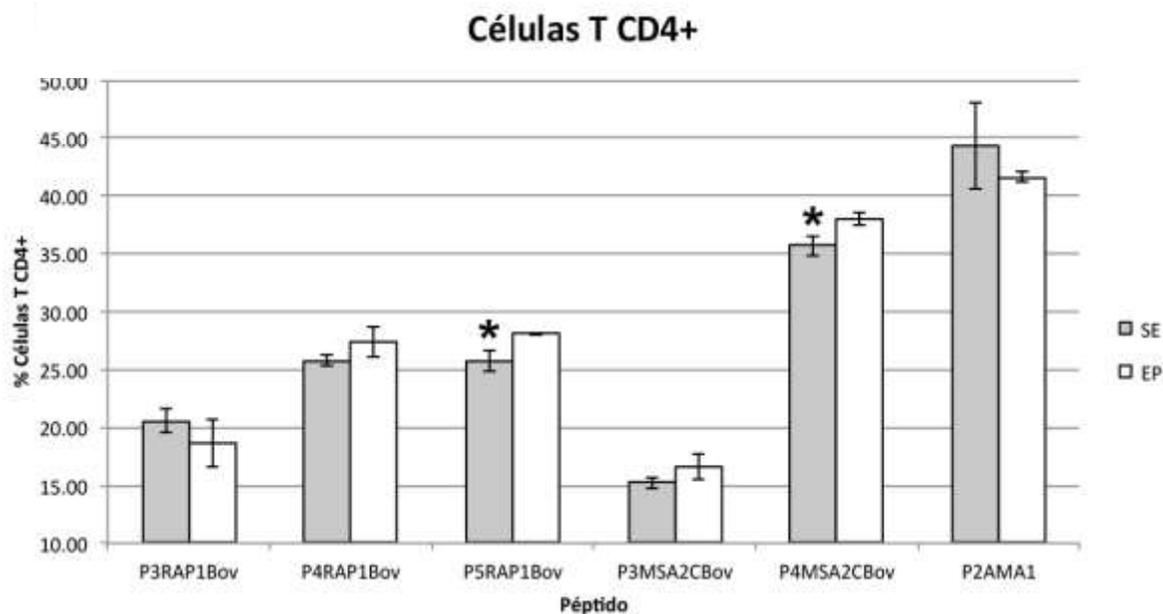


Ilustración 6.8 Grafica de porcentaje de células T CD4+ .

*Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con la prueba t-studen

6.3.2. Expresión de células T efectoras (CD4+/CD45RO+)

Se obtuvieron los siguientes resultados para las poblaciones de las células T efectoras (CD4+/CD45RO+) que se muestran en la gráfica (Ilustración 6.9) y tabla 6-5 para cada uno de los péptidos. Para los péptidos P3RAP1Bov, P3MSA2CBov y

P2AMA1 los resultados del análisis de citometría fueron significativamente diferentes de esta población celular en los cultivos estimulados en comparación de los cultivos no estimulados.

Los resultados de los péptidos P4RAP1Bov, P5RAP1Bov muestran diferencia numérica de células T efectoras en cultivos estimulados en comparación de los cultivos no estimulados.

Tabla 6.5 Porcentaje de células T efectoras CD4+/CD45RO+

Péptido	SE	EP	Valor t	Valor p
	Promedio ± DE	Promedio ± DE		
P3RAP1Bov	65.23 ± 0.81	77.43 ± 0.83	-18.21	*0.000
P4RAP1Bov	68.80 ± 1.30	69.83 ± 0.97	-1.10	0.332
P5RAP1Bov	70.13 ± 1.05	72.4 ± 2.10	-1.67	0.170
P3MSA2CBov	67.37 ± 1.52	72.93 ± 0.58	-5.94	*0.004
P4MSA2CBov	73.73 ± 0.42	72.27 ± 0.70	3.11	*0.036
P2AMA1	51.20 ± 4-60	75.00 ± 0.46	-8.91	*0.001

*Datos con diferencia significativa $p < 0.05$

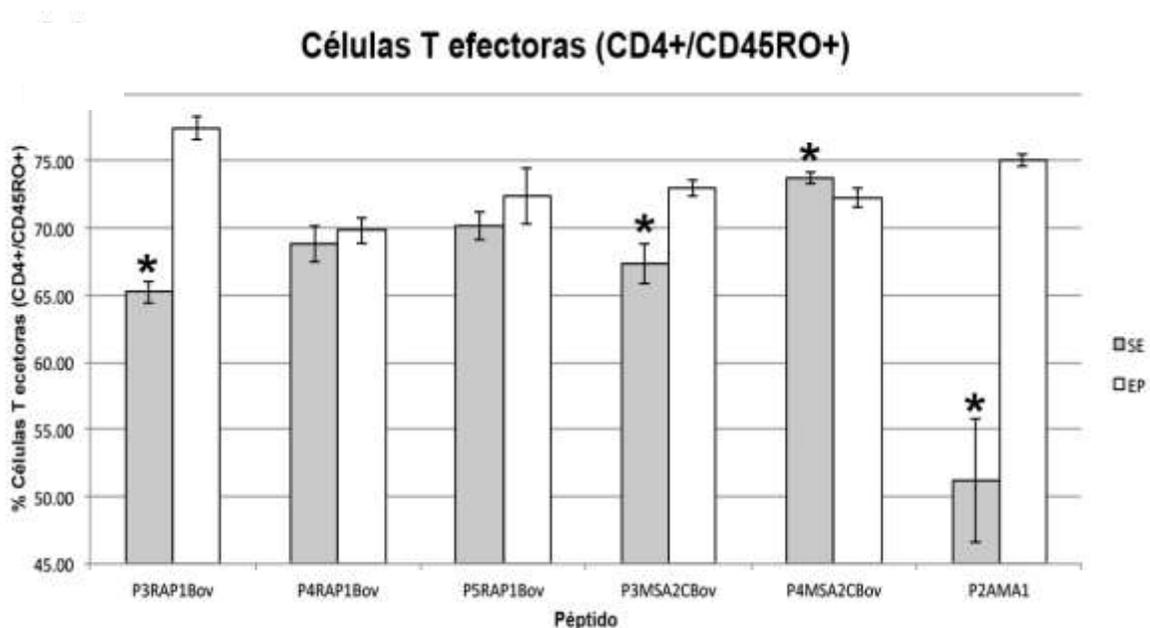


Ilustración 6.9 Grafica de porcentaje de células T efectoras

*Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con la prueba t-student

6.3.3. Expresión de células T $\gamma\delta$ (WC1+)

Los resultados los porcentajes de células T- $\gamma\delta$ que expresan la molécula WC1 (ilustración 6.10) obtenidos por citometría no tienen diferencia significativa estadísticamente entre las células de los cultivos estimulados y las células de los cultivos no estimulados.

Tabla 6.6 Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ WC1+

Péptido	SE	EP	Valor t	Valor p
	Promedio	Promedio		
P3-RAP-1	36.30 \pm 3.03	38.33 \pm 2.96	-0.83	0.452
P4-RAP-1	24.83 \pm 0.93	24.20 \pm 1.67	0.57	0.597
P5-RAP-1	20.93 \pm 0.15	22.17 \pm 0.83	-2.52	0.065
P3-MSA 2c	27.37 \pm 2.34	27.53 \pm 3.81	-0.06	0.952
P4-MSA 2c	34.57 \pm 1.97	36.27 \pm 3.81	-0.69	0.530
P2-AMA-1	28.73 \pm 3.33	24.10 \pm 2.69	1.88	0.134

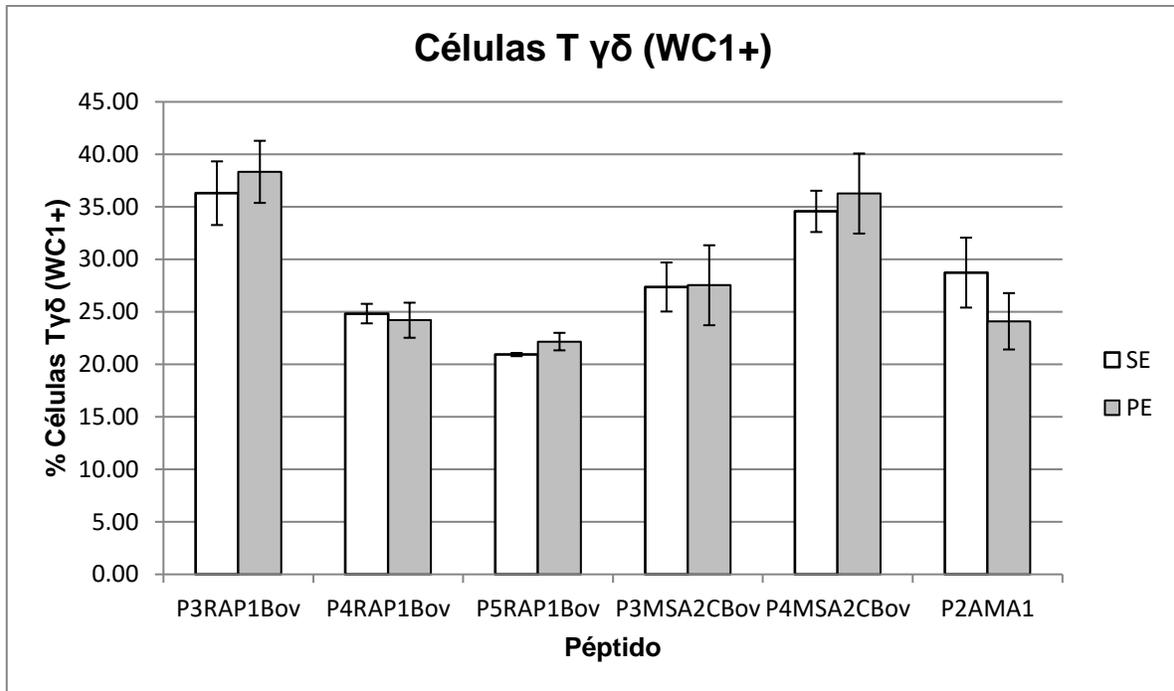


Ilustración 6.10 Grafica de porcentaje de células T- $\gamma\delta$ WC1+

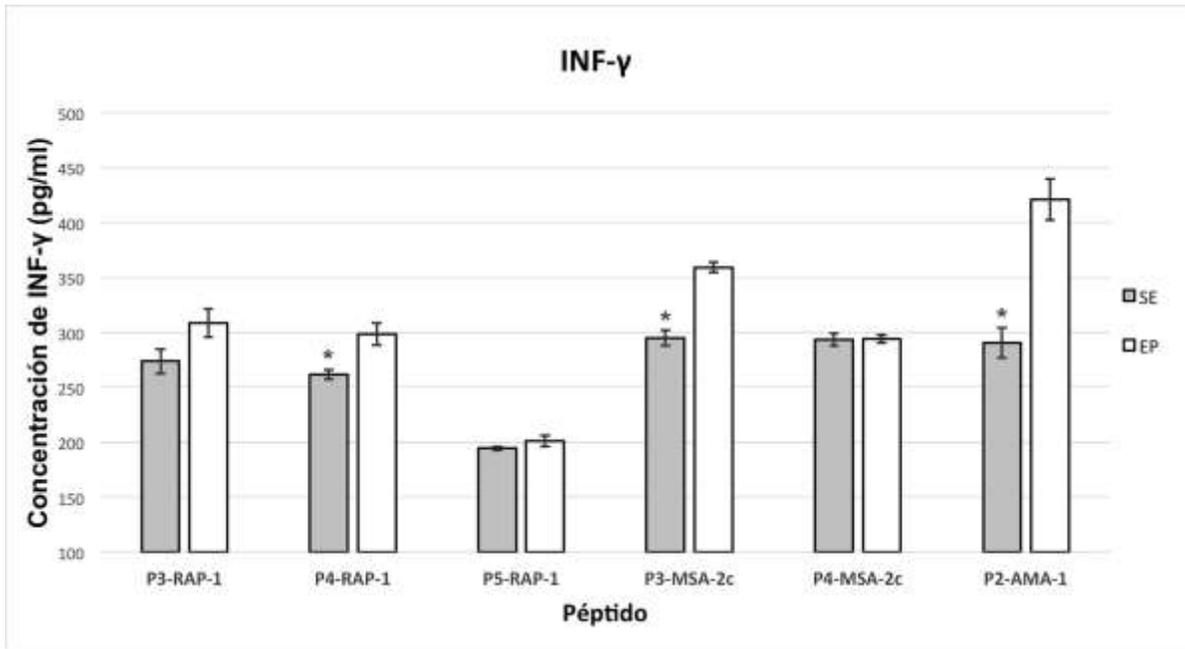
*Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con la prueba t-student

6.4. Evaluación de citocinas

La evaluación de citocinas se realizó con la técnica de ELISA de sándwich semicuantitativa para las interleucinas IL-4 e INF- γ y para IL-10 se usó una ELISA competitiva, y para cuantificar la concentración de cada interleucina se empleó los sobrenadantes de cultivo celular para la determinación de las mismas, los cuales fueron obtenidos a las 18 horas después de la estimulación.

6.4.1. Evaluación de INF- γ

El resultado obtenido para esta citocina en sobrenadantes de cultivo se observa en la gráfica (Ilustración 6.11). en los péptidos. Los sobrenadantes de cultivo de los péptidos P4RAP1Bov, P3MSA2CBov y P2AMA1 muestran mayor diferencia significativa de INF- γ , en sobrenadantes de cultivos estimulados en comparación con los cultivos no estimulados.



6.4.2. Evaluación de IL-10

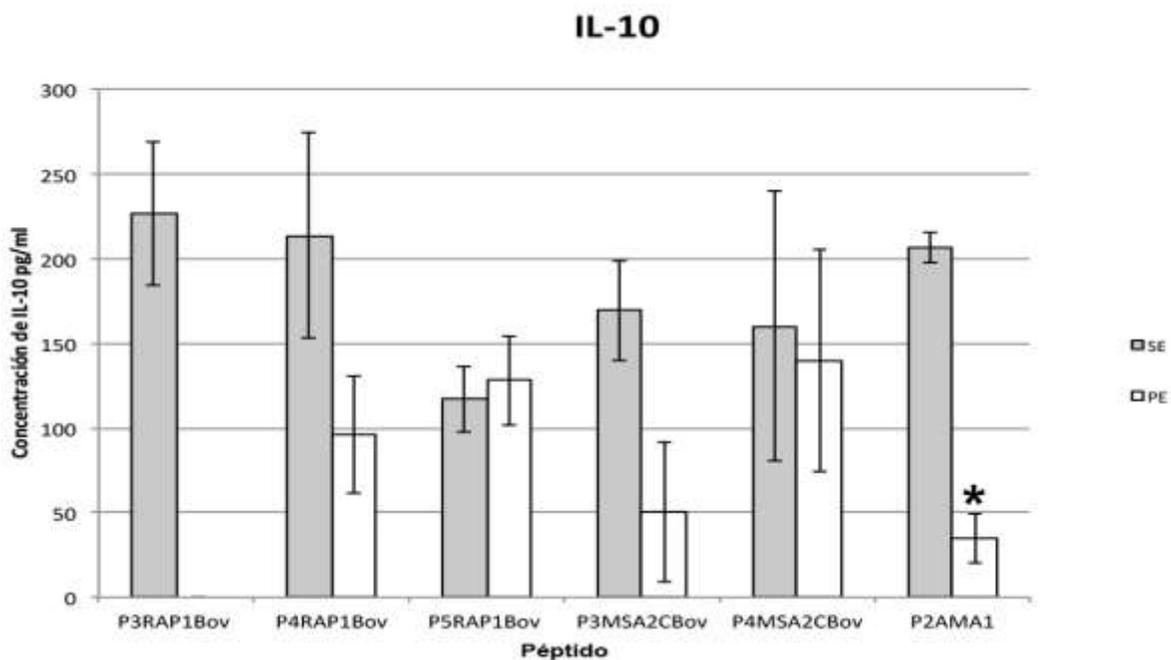


Ilustración 6.17 Concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo

*Resultados con diferencia significativa $p < 0.05$ con la prueba t-student

Los resultados obtenidos de la cuantificación de IL-10 se observan en la gráfica (ilustración 6.12). El péptido P2AMA1 fue significativamente estadísticamente en las células de cultivos no estimulados en comparación de las células de los cultivos no estimulados.

7. Discusión

Brown *et al.*, (1994), caracterizaron y analizaron por citometría de flujo el perfil celular tras estimular cultivos *in vitro* de clonas de células T CD4+ procedentes de bovinos infectados con *B. bovis*, además Brown *et al.*, (1996) identificaron epítomos T y B inmunodominantes en secuencias de la proteína RAP-1 de *B. bovis*.

Por lo que en el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune celular que generan los péptidos de epítomos B de P3RAP1Bov, P4RAP1Bov, P5RAP1Bov, P3MSA2CBov, P4MSA2CBov y P2AMA1, como agentes vacunales y para identificar la presencia de epítomos T y caracterizar que poblaciones celulares se estimulan por los péptidos, realizando una inmunotipificación de células T por citometría de flujo.

La identificación de las poblaciones celulares se realizó utilizando el índice de separación (SI) de emisión de fluorescencia por citometría de flujo como lo hizo Bigos (2007), encontrando índices de separación similares.

Los porcentajes de las poblaciones de linfocitos totales encontrados en el presente estudio a los encontrados por (2013) obtenidos por una estrategia de identificación de poblaciones diferente.

En el presente trabajo se encontró que en cultivos de PBMC de bovinos estimulados con los péptidos P5RAP1Bov, P4MSA2CBov (por separado) mostraron diferencias significativas en las poblaciones de células T CD4+ comparadas con cultivos no estimulados, los resultados fueron similares a los reportados por Brown y Flisher (1992), cuando estimularon células clonas de T CD4+ de bovinos con antígenos crudos de *B. bovis*. Sin embargo, los cultivos estimulados con los péptidos P3RAP1Bov, P4RAP1Bov, P3MSA2CBov y P2AMA1 no mostraron diferencias significativas comparados con cultivo no estimulados.

Los cultivos de PBMC estimulados con los péptidos P3RAP1Bov, P3MSA2CBov y P2AMA1, mostraron diferencias significativas en las poblaciones de células T CD4+/CD45RO+ comparados con los cultivos no estimulados, mostrando

similitud con los resultados obtenidos por Brown *et al.*, (1993 b) donde reportaron que las clonas de células T CD4+ expresaban en la superficie la isoforma CD45RO.

La expresión de la molécula CD45RO sobre las células T CD4+ también se encuentra asociada con células T CD4 de memoria en bovinos con fenotipo CD45RO+/CD62L+ (MacHugh *et al.*, 1992), los resultados de los péptidos P3RAP1Bov, P3MSA2CBov y P2AMA1 pueden estar asociados con una respuesta inmune T de memoria, debido a que la evaluación *in vitro* se realizó después de un año de la última inmunización con los péptidos. Sin embargo, para determinar si hay una respuesta de memoria generada por los péptidos se debería analizar la expresión de la molécula CD62L.

McGill *et al.*, (2014) encontraron que las células T- $\gamma\delta$ (WC1) de bovinos reconocían péptidos sintéticos de *Mycobacterium bovis*, además de encontrar que las células T- $\gamma\delta$ se activan por los péptidos para la producción de INF- γ , sin embargo, en el presente trabajo los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran que no hay diferencia significativa en las poblaciones células T- $\gamma\delta$ estimuladas y no estimuladas con péptidos sintéticos de *B. bovis* de las proteínas RAP-1, MSA-2c y AMA-1

Se determino la concentración de INF- γ por ELISA indirecta tipo sándwich, en sobrenadantes de los cultivos estimulados y no estimulados por péptidos de *B. bovis*, donde se encontró que los sobrenadantes de los cultivos estimulados con los péptidos P4RAP1Bov, P3MSA2cBov y P2AMA1 mostraron diferencia significativa en comparación con los sobrenadantes de cultivos no estimulados, los resultados obtenidos de P3MSA2cBov y P1AMA1 son similares con los de Sopp y Howard (2001) donde reportaron que células con fenotipo TCD4+/CD45RO+ contenían transcritos de INF- γ .

La IL-10 es una citocina que inhibe la producción de INF- γ en células T de bovinos con infecciones crónicas de *B. bovis* (Chitko-McKknown *et al.*, 1995), en este trabajo la producción de IL10 fue cuantificada por ELISA competitiva, los resultados obtenidos muestran que la cantidad de IL-10 en sobrenadantes de cultivos no

estimulados es mayor que en los cultivos estimulados por los péptido, como reportaron Tuo *et al.*, (1999), en clonas de células TCD4+ estimuladas con antígenos de *B. bovis* productoras de IL-12 inhiben la producción de IL-10. En este trabajo no se evaluó la concentración de IL-12.

Los péptidos P3MSA2cBov y P2AMA1 se caracterizan por activar células T CD4+/CD45RO+ secretoras de INF-gamma similar al perfil inmunológico de la proteína quimérica expresada en un poxvirus (rMABbo) reportado por Jaramillo *et al.*, 2014. Recientemente se reportó que para esta misma proteína tiene epítomos B y T, mediante un análisis por citometría (Jaramillo *et al.*, 2016)

Los péptidos P5RAP1Bov y P4MSA2cBov, no activan células TCD4+/CD45RO+, ni poblaciones de células T-gamma-delta, pero activan células T CD4+, los péptidos tienen epítomos T, pero estos no son específico de para activar células T efectoras contra *B. bovis* (Brown y Fitch, 1994).

El péptido P3RAP1Bov activa células TCD4+/CD45RO+, sin embargo, la concentración de INF-gamma en sobrenadantes de cultivos estimulados es mayor numéricamente que, en los sobrenadantes de cultivos no estimulados, sin embargo, este péptido se tendría que volver a analizar, debido a que la evaluación no se realizó con periodos de post-inmunización más cortos.

8. Conclusión

Los resultados obtenidos concluyen que:

- Los péptidos P3MSA2C y P2AMA1 son buenos candidatos vacunales porque activan células T efectoras (CD4+/CD45RO+) y en los

sobrenadantes de cultivos estimulados por los péptidos hay mayor concentración de INF-gamma.

- Los péptidos P5RAP1Bov y P4MSA2cBov, tienen epítomos T, sin embargo, estos epítomos no activan a células T efectoras (CD4+/CD45RO+).

9. Referencias Bibliográficas

1. Bembridge, G. P., MacHugh, N. D., McKeever, D., Awino, E., Sopp, P., Collins, R. a, ... Howard, C. J. (1995). CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function. *Immunology*, 86, 537–544.
2. Bigos, M. (2007). Separation Index: An Easy- to- Use Metric for Evaluation of Different Configurations on the Same Flow Cytometer. *Current protocols in cytometry*, 1-21.
3. Borgonio, V., Mosqueda, J., Genis, A. D., Falcon, A., Alvarez, J. A., Camacho, M., & Figueroa, J. V. (2008). msa- 1 and msa- 2c Gene Analysis and Common Epitopes Assessment in Mexican *Babesia bovis* Isolates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 145-148.
4. Brown, W. C., & Rice-Ficht, A. C. (1994). Use of Helper T Cells to Identify Potential Vaccine Antigens of *Babesia bovis*. *Parasitology Today*, 1(4), 145–149.
5. Brown, W. C., Logan, K. S., Wagner, G. G., & Tetzlaff, C. L. (1991). Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infection and Immunity*, 59(7), 2418–2426.
6. Brown, W. C., McElwain, T. F., Ruef, B. J., Suarez, C. E., Shkap, V., Chitko-McKown, C. G., ... & Palmer, G. H. (1996). *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *Babesia bovis* strains. *Infection and immunity*, 64(8), 3341-3350.
7. Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041>
8. Brown, W. C., Palmer, G. H., McElwain, T. F., Hines, S. A., & Dobbelaere, D. A. E. (1993 a). *Babesia bovis*: characterization of the T helper cell response against the 42-kDa merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. *Experimental parasitology*, 77(1), 97-110.

9. Brown, W. C., Woods, V. M., Dobbelaere, D. A. E., & Logan, K. S. (1993b). Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis*-specific bovine CD4+ T cell clones activated *in vitro*. *Infection and Immunity*, 61(8), 3273–3281.
10. Chitko-McKown, C. G., Ruef, B. J., Rice-Ficht, A. C., & Brown, W. C. (1995). Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 chain and interferon-gamma, but not interleukin-2 or interleukin-4, by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 15(10), 915–922. <https://doi.org/10.1089/jir.1995.15.915>
11. Collins, R. A., Sopp, P., Gelder, K. I., Morrison, W. I., & Howard, C. J. (1996). Bovine γ/δ TcR+ T Lymphocytes are Stimulated to Proliferate by Autologous *Theileria annulata*- Infected Cells in the Presence of Interleukin-2. *Scandinavian journal of immunology*, 44(5), 444-452.
12. Combrink, M. P., Troskie, P. C., Plessis, F. D., & Latif, A. A. (2010). Serological responses to *Babesia bovis* vaccination in cattle previously infected with *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 30–36.
13. de Waal, D. T., & Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 88–96.
14. Dominguez, M., Echaide, I., Echaide, S. T. de, Mosqueda, J., Cetrá, B., Suarez, C. E., & Florin-Christensen, M. (2010). In silico predicted conserved B-cell epitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 216–226.
15. Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C., & McElwain, T. F. (2002). The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infection and immunity*, 70(7), 3566-3575.
16. Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563-1592.
17. Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J., & De Vries, E. (2004). Erythrocyte Invasion by *Babesia bovis* Merozoites Is Inhibited by Polyclonal

- Antisera Directed against Peptides Derived from a Homologue of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1. *Infection and Immunity*, 72(5), 2947–2955.
18. Goff, W. L., Johnson, W. C., & Cluff, C. W. (1998). *Babesia bovis* Immunity: *In Vitro* and *in Vivo* Evidence for IL-10 Regulation of IFN- γ and iNOS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849(1), 161-180.
 19. Goff, W. L., Johnson, W. C., Horn, R. H., Barrington, G. M., & Knowles, D. P. (2003). The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunology*, 25(4), 185–188.
 20. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Elsasser, T. H., Davis, W. C., & Valdéz, R. A. (2002). IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- γ - and TNF- α -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 84(3–4), 237–251.
 21. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., & Valdéz, R. A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunology*, 23(9), 463–471.
 22. Goff, W. L., Johnson, W. C., Tuo, W., Valdéz, R. A., Parish, S. M., Barrington, G. M., & Davis, W. C. (2002). Age-Related Innate Immune Response in Calves to *Babesia bovis* Involves IL-12 Induction and IL-10 Modulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969(1), 164-168.
 23. Goff, W. L., Storset, A. K., Johnson, W. C., & Brown, W. C. (2006). Bovine splenic NK cells synthesize IFN- γ in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunology*, 28(5), 221–228.
 24. Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A. L., Cubillos-Zapata, C., & Charleston, B. (2014). Bovine T Cells Are a Major Regulatory T Cell Subset. *The Journal of Immunology*, 193(1), 208–222.

25. Hines, S. A., Palmer, G. H., Jasmer, D. P., Goff, W. L., & McElwain, T. F. (1995). Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infection and immunity*, 63(1), 349-352.
26. Howard, C. J., Sopp, P., Parsons, K. R., McKeever, D. J., Taracha, E. L. N., Jones, B. V., ... & Morrison, W. I. (1991). Distinction of naive and memory BoCD4 lymphocytes in calves with a monoclonal antibody, CC76, to a restricted determinant of the bovine leukocyte-common antigen, CD45. *European journal of immunology*, 21(9), 2219-2226.
27. Kennedy, H. E., Welsh, M. D., Bryson, D. G., Cassidy, J. P., Forster, F. I., Howard, C. J., Pollock, J. M. (2002). Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infection and Immunity*, 70(3), 1488–500.
28. Kuttler, K. L., & Johnson, L. W. (1986). Chemoprophylactic activity of imidocarb, diminazene and oxytetracycline againsts *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary parasitology*, 21(2), 107-118.
29. Lyons, A. B., & Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 171(1), 131–137.
30. Mark Estes, D. (1996). Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression. *In Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 54, pp. 61–67).
31. McGill, J. L., Sacco, R. E., Baldwin, C. L., Telfer, J. C., Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2014). Specific Recognition of Mycobacterial Protein and Peptide Antigens by T Cell Subsets following Infection with Virulent *Mycobacterium bovis*. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2756–2769.
32. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
33. Mosqueda, J., McElwain, T. F., & Palmer, G. H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(11), 6448–6455.

34. Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G. H., McElwain, T. F., Mbassa, G., & Brown, W. C. (2003). Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* Challenge. *Infection and Immunity*, 71(9), 5021–5032.
35. Norimine, J., Suarez, C. E., McElwain, T. F., Florin-Christensen, M., & Brown, W. C. (2002). Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4⁺-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infection and immunity*, 70(4), 2039-2048.
36. Norimine, J., Suarez, C. E., McElwain, T. F., Florin-Christensen, M., & Brown, W. C. (2002). Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4⁺-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infection and immunity*, 70(4), 2039-2048.
37. Patarroyo, J. H., Prates, A. A., Tavares, C. A. P., Mafra, C. L., & Vargas, M. I. (1995). Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 59(3–4), 189–199.
38. Pipano, E. (1995). Live vaccine against hemoparasitic disease in livestock. *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), 213–231.
39. Pollock, J. M., & Welsh, M. D. (2002). The WC1⁺ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 89(3), 105-114.
40. Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, 2(9), 2049–2056.
41. Rogers, A. N., VanBuren, D. G., Hedblom, E., Tilahun, M. E., Telfer, J. C., & Baldwin, C. L. (2005). Function of ruminant $\gamma\delta$ T cells is defined by WC1. 1 or

- WC1. 2 isoform expression. *Veterinary immunology and immunopathology*, 108(1), 211-217.
42. Schneider, D. A., Yan, H., Bastos, R. G., Johnson, W. C., Gavin, P. R., Allen, A. J., Barrington, G. M., Herrmann-Hoesing, L. M., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2011). Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: An immunohistological study. *Parasite Immunology*, 33(1), 34–44.
43. Shoda, L. K., Palmer, G. H., Florin-Christensen, J., M., Godson, D. L., & Brown, W. C. (2000). *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and immunity*, 68(9), 5139-5145..
44. Shoda, L. K., Zarlenga, D. S., Hirano, A., & Brown, W. C. (1999). Cloning of a cDNA encoding bovine interleukin-18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN- γ -inducing activity. *Journal of interferon & cytokine research*, 19(10), 1169-1177.
45. Smits, J. D., & Riemann, B. (1988). Calculation of cell production from [3H] thymidine incorporation with freshwater bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(9), 2213-2219.
46. Smyth, A. J., Welsh, M. D., Girvin, R. M., & Pollock, J. M. (2001). In Vitro Responsiveness of $\gamma\delta$ T Cells from Mycobacterium bovis-Infected Cattle to Mycobacterial Antigens: Predominant Involvement of WC1+ Cells. *Infection and immunity*, 69(1), 89-96.
47. Stich, R. W., Shoda, L. K., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T. W., & Brown, W. C. (1998). Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infection and Immunity*, 66(9), 4130–4136.
48. Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology*, 180(1), 109-125.
49. Suarez, C. E., Palmer, G. H., Hines, S. A., & McElwain, T. F. (1993). Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1

- are distinct from sequences conserved between species. *Infection and immunity*, 61(8), 3511-3517.
50. Suarez, C. E., Palmer, G. H., Hötzel, I., & McElwain, T. F. (1998). Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Molecular and biochemical parasitology*, 93(2), 215-224.
51. Tattiyapong, M., Sivakumar, T., Takemae, H., Simking, P., Jittapalapong, S., Igarashi, I., & Yokoyama, N. (2016). Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 255-261.
52. Tuo, W., Estes, D. M., & Brown, W. C. (1999). Comparative Effects of Interleukin-12 and Interleukin-4 on Cytokine Responses by Antigen-Stimulated Memory CD4⁺ T Cells of Cattle: IL-12 Enhances IFN-gamma Production, Whereas IL-4 Has Marginal Effects on Cytokine Expression. *Journal of interferon and cytokine research*, 19, 741–749.
53. Wilkowsky, S. E., Farber, M., Echaide, I., Torioni De Echaide, S., Zamorano, P. I., Dominguez, M., Suarez, C. E., & Florin-Christensen, M. (2003). *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(2), 133–141.
54. Wright, I. G., Casu, R., Commins, M. A., Dalrymple, B. P., Gale, K. R., Goodger, B. V., ... White, M. A. (1992). The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Veterinary Parasitology*, 44(1–2), 3–13.
55. Wright, I. G., Goodger, B. V., Leatch, G., Aylward, J. H., Rode-Bramanis, K., & Waltisbuhl, D. J. (1987). Protection of *Babesia bigemina*-immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. *Infection and Immunity*, 55(2), 364–368.
56. Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., & Igarashi, I. (2002). Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infection and Immunity*, 70(10), 5822–5826.

10. Anexo

Anexo 1

PBS 10 X

Cloruro de sodio NaCl	87.7 g
Fosfato de sodio monobásico NaH ₂ PO ₄	1.5 g
Fosfato de sodio dibásico Na ₂ HPO ₄	13 g
Agua destilada dH ₂ O	cbp 1000 ml

pH 7.4

Esterilizar por filtrado en poro 0.22 µm

Anexo 2

RPMI (Sigma R4130-10 L)

RPMI 1640	8.2 g
Bicarbonato de sodio NaHCO ₃ al 7.5 %	1 g
Agua destilada dH ₂ O	500 ml

Ajustar pH 7.4

Esterilizar por filtrado en poro 0.22 µm

Anexo 3

Buffer de bloqueo 10%

PBS 1X pH 7.4	90 ml
Suero de bovino autólogo	10 ml

Anexo 4

Buffer de tinción

PBS 1X pH 7.4	90 ml
Azida de sodio 0.05 %	0.005 g

Disolver la azida de sodio un una campana de extracción

Anexo 5

Protocolo de cuantificación de IL-4 por ELISA. Bovine Interleukin 4 (IL-4) ELISA Kit MBS740126

1. Tomar las celdas a usar con guantes, adicionar 50 µl de cada estándar (A-F), los estándares ponerlos en duplicados. Adicionar 50 µl de muestras en los pozos siguientes. Como blanco adicionar 50 µl de PBS pH 7.4.
2. Adicionar 5µl de Balance Solution solo a los pozos con muestra que sean sobrenadantes de cultivo, en caso de usar suero o plasma omitir este paso.
3. Adicionar 100 µl de conjugado a todos los pozos, excepto al blanco. Mezclar en cada pozo. cubrir e incubar la placa por una hora a 37°C.
4. Lavar la placa con 200 µl de Buffer, realizar esto 5 veces, en el último lavado cerciorarse de dejar seca la placa.
5. Adicionar 50 µl de Subtrate A y 50 µl de Subtrate B para cada pozo incluyendo el blanco. Cubrir e incubar por 15 minutos a 37 °C.
6. Adicionar 50 µl de Stop Solution a todos los pozos incluyendo al blanco.
7. Determinar la Densidad Óptica (OD).