



Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Ciencias Naturales

Caracterización de la proteína Enolasa en *Babesia bovis* e
identificación de epítomos B inmunogénicos.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ Alma Cárdenas Flores

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Co-director:

Dra. Minerva Camacho Nuez



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Caracterización de la proteína Enolasa en *Babesia bovis* e identificación de epítomos B inmunogénicos.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z Alma Cárdenas Flores

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Co-dirigido por:

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Minerva Camacho Nuez
Secretario

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Vocal

Dr. Mario Hidalgo Ruiz
Suplente

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero del 2021
México

Dedicatorias

A mis padres, por su permanente apoyo y su maravilloso ejemplo todos los días de mi vida. Los amo con todo lo que soy, pues soy lo que ustedes crearon para mí. Gracias por ser. Gracias por estar.

A mis profesores, por ser el ejemplo de que se puede tener excelencia profesional y humana. Gracias por todo el tiempo y experiencia que invirtieron en mi formación.

A mis amigos y compañeros de maestría, gracias por el apoyo personal y académico durante estos dos años que marcan el inicio de una vida de amistad.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca que permitió solventar los estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por aceptarme como estudiante de maestría y permitir desenvolverme en sus instalaciones.

A mis directores y asesores de tesis, por su apoyo incondicional, sus consejos y su exigencia. Todos son un ejemplo para mí.

A el Dr. Diego Josimar Hernández Silva y al Lic. Miguel Andrés Velazco Elizondo, por el apoyo brindando, su tiempo, paciencia y experiencia en los experimentos de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas, por compartir su experiencia y amistad, por su compañía en los días y noches de trabajo en conjunto.

Al área de cunicultura de la Facultad de Ciencias Naturales Campus Amazcala (ARCUN) y al Dr. José Guadalupe Gómez Soto, por permitir llevar parte de este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Un agradecimiento especial para el Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, quien me dio mi primera experiencia en la vida científica y sigue siendo el ejemplo de docente e investigador que quiero llegar a ser en el futuro. Gracias por todo su apoyo, personal y profesional.

Índice

	Página
Dedicatorias	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Resumen	ix
Abstract.....	x
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
2.1 Babesiosis bovina.....	3
2.1.1 Importancia de la babesiosis	3
2.1.2 Taxonomía de <i>Babesia bovis</i>	4
2.1.3 Morfología de <i>Babesia</i>	4
2.1.4 Ciclo de vida de <i>Babesia bovis</i>	6
2.1.5 Proceso de invasión	8
2.1.6 Signos clínicos y patogénia	8
2.1.7 Respuesta inmune a la babesiosis	10
2.1.8 Diagnóstico.....	11
2.1.9 Tratamiento y control.....	13
2.2 Enolasa	14
III. Hipótesis	17
IV. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
V. Metodología	18
5.1 Material biológico utilizado	18
5.2 Identificación y evaluación de la expresión del gen <i>enolasa</i> en <i>B. bovis</i> ...18	
5.2.5 Amplificación del gen <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> mediante PCR	22
5.2.5 Determinación de la expresión del gen mediante RT-PCR.	22

5.3 Obtención las secuencias predichas de péptidos con epítomos B.....	24
5.4 Determinación de la expresión de la proteína Enolasa de <i>B. bovis</i> con anticuerpos anti-péptidos.	27
VI. Resultados	30
6.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i>	30
6.2 Amplificación del gen <i>enoBbov</i> mediante PCR.	34
6.3 Determinación de la expresión del gen <i>enolasa</i> mediante RT-PCR.....	34
6.4 Clonación y secuenciación del gen <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i>	35
6.7 Generación y titulación de anticuerpos anti-péptidos	43
6.8 Determinación de la expresión de la proteína Enolasa de <i>B. bovis</i> con anticuerpos anti-péptidos.....	46
VII. Discusión	47
VIII. Conclusiones.....	50
IX. Bibliografía.....	51

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1	Taxonomía de <i>Babesia bovis</i> .	4
2	Características de oligonucleótidos diseñados.	21
3	Programa de termociclado para amplificar el gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> .	22
4	Programa de termociclado para amplificar la parte interna del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> .	23
5	Matriz de porcentaje de identidad entre las secuencias de la proteína <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> de la cepa T2Bo, los aislados de la misma especie de Tepic, Michoacán y la secuencia de la proteína <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i> .	39
6	Características de los péptidos de la proteína <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> seleccionados para síntesis.	41

Índice de figuras

Figura		Página
1	Morfología del merozoito de <i>Babesia</i> .	5
2	<i>Ciclo de vida</i> de <i>Babesia bovis</i> .	7
3	Localización los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> y el tamaño esperado de cada amplicón.	21
4	Esquematación de la localización del gen <i>enolasa</i> en el cromosoma III de <i>B. bovis</i> .	31
5	Alineamiento realizado con Boxshade de los genes <i>enolasa</i> identificados <i>Babesia bigemina</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> y en el cromosoma III de <i>B. bovis</i> de la cepa T2Bo.	32-33
6	Amplicones obtenidos del gen <i>enolasa</i> en gel de agarosa al 1% con GelRed™.	34
7	Amplicones obtenidos del gen <i>enolasa</i> en gel de agarosa al 1% con GelRed™.	35
8	PCR de colonias en gel de agarosa al 1% con GelRed™.	35
9	Alineamiento de las secuencias del gen <i>enolasa</i> de <i>B. bovis</i> de los aislados de Tepic, Michoacán y de la cepa T2Bo (NCBI:AAXT01000001.1).	37-38
10	Análisis bioinformáticos de la proteína Enolasa de <i>B. bovis</i> .	40
11	Alineamiento de las secuencias de la proteína enolasa de <i>B. bovis</i> de los aislados de Tepic, Michoacán, la cepa T2Bo y de <i>B. bigemina</i> .	42
12	Graficas de determinación de generación de anticuerpos.	43
13	Graficas de titulación de anticuerpos contra péptido ENOL-1.	44
14	Graficas de titulación de anticuerpos contra el péptido ENOL-2.	45

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Resumen

La babesiosis bovina es la enfermedad transmitida por garrapatas más importante del ganado bovino a nivel mundial, siendo *Babesia bovis* la especie que causa el cuadro clínico más grave. Actualmente existen vacunas vivas contra esta enfermedad, sin embargo, aunque efectivas, representan un gran número de inconvenientes por ser elaboradas a partir de sangre infectada de bovino. El desarrollo de vacunas que involucren ingeniería genética representa una alternativa más viable, segura y sustentable para combatir esta enfermedad que genera grandes pérdidas económicas. La proteína Enolasa, una enzima del metabolismo intracelular de la glucosa que presenta funciones “Moonlight”, ha demostrado tener potencial como candidato vacunal en diversos patógenos, entre ellos, organismos del género *Babesia*, sin embargo, no ha sido caracterizada en *B. bovis*. En este estudio se demostró la presencia y funcionalidad del gen *enolasa* en *Babesia bovis* mediante técnicas de biología molecular; se obtuvo la secuencia del gen *enolasa* de dos aislados de *B. bovis* de diferentes estados de la república y mediante técnicas bioinformáticas se identificaron dos péptidos con epítomos B en la proteína Enolasa de este organismo (ENOL-1 y ENOL-2). Los péptidos se obtuvieron sintetizados en un sistema multi-antigénico de 8 brazos (MAPS-8) con los cuales se inmunizaron conejos, demostrando generar títulos de anticuerpos de hasta 1:256,000 en conejos inmunizados con el péptido ENOL-1 y de 1:512,000 en conejos inmunizados con el péptido ENOL-2. Los anticuerpos obtenidos fueron capaces de reconocer al parásito mediante inmunofluorescencia indirecta en eritrocitos bovinos infectados. Estos análisis representan el inicio de la caracterización de dos posibles candidatos vacunales.

Palabras clave: *Babesia bovis*, Enolasa, péptido, epítomo B, bioinformática, anticuerpo.

Abstract

Bovine babesiosis is the most important tick-borne disease of cattle worldwide, with *Babesia bovis* being the species that causes the most serious clinical signs. Currently there are live vaccines against this disease, however, although effective, they represent a large number of drawbacks because they are made from infected bovine blood. The development of vaccines that involve genetic engineering represents a more viable, safe and sustainable alternative to combat this disease that generates great economic losses. The Enolase protein, an enzyme of intracellular glucose metabolism that exhibits “Moonlight” functions, has shown potential as a vaccine candidate in various pathogens, including organisms of the *Babesia* genus, however, it has not been characterized in *B. bovis*. In this study, the presence and functionality of the enolase gene in *Babesia bovis* was demonstrated using molecular biology techniques; The sequence of the enolase gene of two isolates of *B. bovis* from different states of the republic was obtained and two peptides with B epitopes in the Enolase protein of this organism (ENOL-1 and ENOL-2) were identified using bioinformatics techniques. The peptides were obtained synthesized in an 8-arm multi-antigenic system (MAPS-8) with which rabbits were immunized, demonstrating to generate antibody titers of up to 1: 256,000 in rabbits immunized with the ENOL-1 peptide and of 1: 512,000. in rabbits immunized with the ENOL-2 peptide. The antibodies obtained were able to recognize the parasite by indirect immunofluorescence in infected bovine erythrocytes. These analyzes represent the beginning of the characterization of two possible vaccine candidates.

Keywords: *Babesia bovis*, Enolase, peptide, B epitope, bioinformatics, antibody.

I. Introducción.

Las pérdidas económicas derivadas de la infestación del ganado con garrapatas del género *Rhipicephalus* y las enfermedades que transmiten, como babesiosis y anaplasmosis bovina, se estiman en 573.61 millones de dólares a nivel mundial (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). En México se tiene registro de la presencia de la babesiosis bovina desde 1905, ya que las características climáticas del país hacen propicia la supervivencia del vector que transmite esta enfermedad (Tussaint, 1905; Mosqueda *et al.*, 2007).

El desarrollo de métodos efectivos y sustentables para abordar estas enfermedades debe ser una meta importante para la investigación en los países donde la babesiosis y anaplasmosis son endémicas. Desde finales del siglo pasado se ha incursionado en la búsqueda de una vacuna efectiva contra la babesiosis bovina, iniciando con vacunas basadas en parásitos vivos atenuados, que, a pesar de ser efectivas, su implementación viene acompañada de diversas desventajas como: el retorno a la virulencia, costos de producción elevados, contaminación con otros patógenos, entre otras (Bock, *et al.*, 1992; De Waal & Combrink, 2006; Mosqueda *et al.*, 2007). Actualmente, las investigaciones enfocadas a vacunas contra la babesiosis se dirigen a buscar nuevas alternativas que eviten las desventajas antes mencionadas, que presenten buena capacidad inmunogénica y especialmente, que actúen tanto en el ganado como en el artrópodo transmisor. Aunque no hay vacunas comerciales con esas características, para poder desarrollarlas es necesario profundizar en el entendimiento de los mecanismos involucrados en el ciclo de vida de estos patógenos tanto en el vector que los transmite como en el hospedero. Esto requiere el uso de diversas herramientas como: genómica, transcriptómica, proteómica, bioinformática, entre otras (Marcelino *et al.*, 2012; Ribas-Aparicio *et al.*, 2017); las cuales han avanzado enormemente en los últimos años y hacen posible la identificación *in silico* de genes que codifican a

proteínas que tengan péptidos con capacidad de inducir la generación de anticuerpos que neutralicen la invasión de *Babesia bovis* a sus células blanco

La Enolasa, una enzima glicolítica catalogada como proteína “moonlight”, pues se ha encontrado que lleva a cabo funciones más allá de su papel en la glicólisis, ha demostrado ser un llamativo candidato vacunal para diversos patógenos, incluyendo organismos aplicomplexas como *Babesia microti* y *Plasmodium falciparum* (Pal-Bhowmick *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2017), al inducir inmunidad humoral protectora en ratones inmunizados con enolasa recombinante de estos patógenos.

Este estudio tiene como meta la identificación de péptidos de la proteína Enolasa de *B. bovis* con epítomos B conservados y con capacidad de generar anticuerpos que, en un futuro, puedan ser incluidos en una vacuna contra este patógeno.

II. Revisión de literatura

2.1 Babesiosis bovina

La babesiosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, los cuales infectan eritrocitos de diversas especies, incluida el hombre. *Babesia* es considerado el segundo parásito sanguíneo más común en mamíferos, solo después de *Trypanosoma* (Schnittger *et al.*, 2012). Este organismo fue descrito por Víctor Babes en 1888 en ganado bovino de Rumania que presentaba hemoglobinuria, posteriormente describiría un parásito similar en sangre de ovejas. En 1893, Smith y Kilborne lo denominarían *Pyrosoma bigeminum* al descubrir su presencia en el ganado de Texas como un parásito intraeritrocítico transmitido por garrapatas. Este agente recibiría los nombres de *Babesia bovis*, *B. ovis* y *B. bigemina* (Levine, 1971; Bock *et al.*, 2004).

2.1.1 Importancia de la babesiosis

La babesiosis bovina, causada por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*, es una de las enfermedades transmitidas por artrópodos económicamente más importante del ganado en el mundo; en las áreas tropicales y subtropicales *B. bovis* y *B. bigemina* tienen especial importancia, pues es donde se ha reportado la presencia de garrapatas del género *Rhipicephalus*, que funcionan como el vector transmisor de *B. bovis* y *B. bigemina*. (Bock *et al.*, 2004; Schnittger *et al.*, 2012). Su importancia económica radica en pérdidas por: 1) mortalidad, que puede llegar a causar la muerte del 40-80% de los animales adultos infectados en zonas hiperenzooticas, 2) abortos, 3) disminución en la producción de carne y leche, así como 4) gastos en medidas de control como acaricidas, vacunas y tratamientos farmacológicos (Bock *et al.*, 2004; Gállego, 2007).

La ganadería es una de las principales actividades económicas de México, siendo la producción bovina una de las más importantes. Según el Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera, en 2018 había en el país un inventario de 34,820,271 bovinos (SIAP, 2018).

2.1.2 Taxonomía de *Babesia bovis*

Babesia bovis se clasifica taxonómicamente desde 1980 como se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Taxonomía de *Babesia bovis* (Levine *et al*, 1980).

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

2.1.3 Morfología de *Babesia*

Los organismos del género *Babesia* son pleomórficos, esto significa que cambian su morfología según la etapa de su ciclo biológico y de su hospedero. Al ser organismos protozoarios apicomplexas poseen estructuras comunes entre especies. *Babesia bovis* en su forma endoglobular puede apreciarse en forma

ovalada (merozoíto), forma de anillo (trofozoíto) o formando parejas (merozoítos luego de la división) en ángulo obtuso con tamaño de 1 a 2.5µm (Muñoz, 2016; Petrich, 2010).

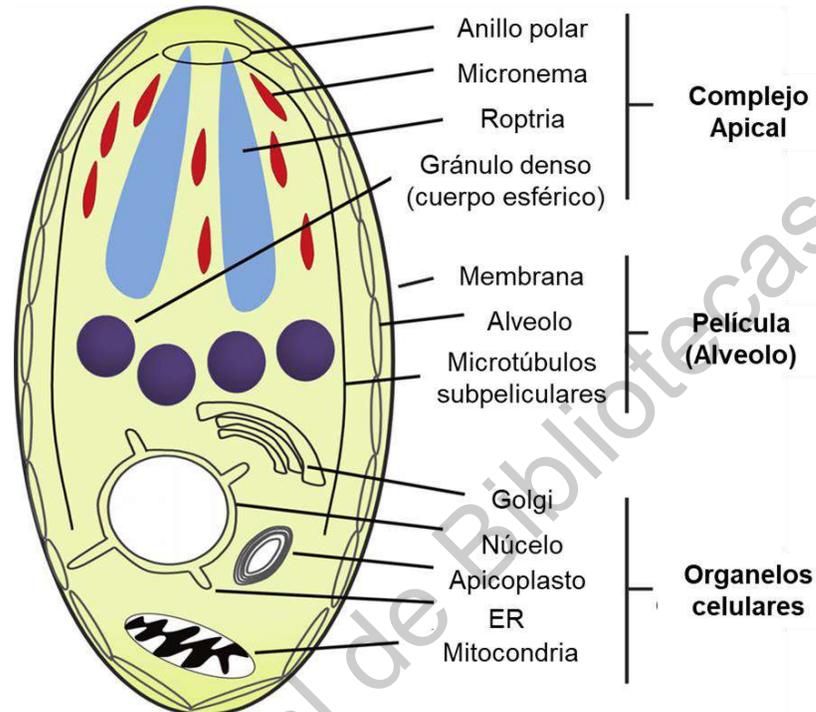


Figura 1. Morfología del merozoíto de Babesia. Tomado y modificado de Florin-christensen & Schnittger, 2018.

Cabe destacar en los merozoítos ciertas características microestructurales (Figura 1), tal es el caso del citoplasma, rodeado por una membrana citoplasmática y una doble membrana discontinua debajo de ella. La membrana está formada por proteínas rodeadas de un estrato lipídico. La parte interna es hidrofóbica y la externa está constituida por glucolípidos con grupos polisacáridos anclados a la membrana. Este glucocáliz interviene en la respuesta inmune y en el reconocimiento y fijación a ciertas estructuras. El complejo apical consta de diversas estructuras: los anillos polares, el conoide, roptrias, micronemas y microtúbulos. Se presentan proteínas que atraviesan la membrana plasmática que actúan como receptores moleculares de transporte enzimático y están unidas al citoesqueleto. Estos organelos son

esenciales para la invasión de *Babesia* al eritrocito (Figuroa, 2003; Gállego, 2007; Petrigh, 2010; Baruch & Louis, 2014).

2.1.4 Ciclo de vida de *Babesia bovis*

El ciclo biológico de *Babesia* spp involucra un complejo sistema de interacciones entre el parásito, la garrapata vector y su hospedero vertebrado, tal como se representa en la Figura 2. El esporozoíto de *B. bovis*, que es la forma infectiva de este parásito apicomplexa, ingresa al sistema circulatorio del bovino por la saliva del vector e invade únicamente eritrocitos con ayuda del complejo apical, transformándose en trofozoítos que al microscopio se aprecian como una forma redondeada o de anillo. Cada trofozoíto, una vez dentro del eritrocito, por fisión binaria genera dos merozoítos, los cuales inicialmente se encuentran unidos en ángulo agudo dando la apariencia de dos peras. Al madurar los merozoítos, estos se separan y salen de los eritrocitos para invadir otros eritrocitos y desarrollarse a trofozoítos o ser ingeridos por la garrapata vector continuando su ciclo en el hospedador invertebrado (Bock *et al.*, 2004; Petrigh, 2010; Mosqueda *et al.*, 2012). Debido a las condiciones de temperatura y pH propias del intestino de la garrapata, los merozoítos salen de los eritrocitos al lumen intestinal dando lugar al origen de las fases sexuales convirtiéndose en gametocitos, los cuales se transforman en gametos masculinos y femeninos que forman un cigoto al fusionarse. El cigoto desarrolla una fase infectiva que penetra en las células intestinales de la garrapata, ahí se forman los cuerpos de fisión que dan lugar a los kinetos. Los cuales son estructuras móviles que escapan del epitelio intestinal y viajan por la hemolinfa para invadir otros tejidos de la garrapata como los ovarios. En este proceso se genera una transmisión transovárica, por lo que al ovipositar las garrapatas que procederán de esos huevecillos ya se encontrarán infectadas por *B. bovis* (Chauvin *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012, Hussein *et al.*, 2017).

En las larvas de garrapatas infectadas, al parasitar al bovino, los kinetos migran a las glándulas salivales donde forman esporoblastos. Cada esporoblasto desarrolla cientos de esporozoítos que, al alimentarse la larva del bovino, son liberados en el torrente sanguíneo del hospedero y pueden infestar eritrocitos (Chauvin *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012).

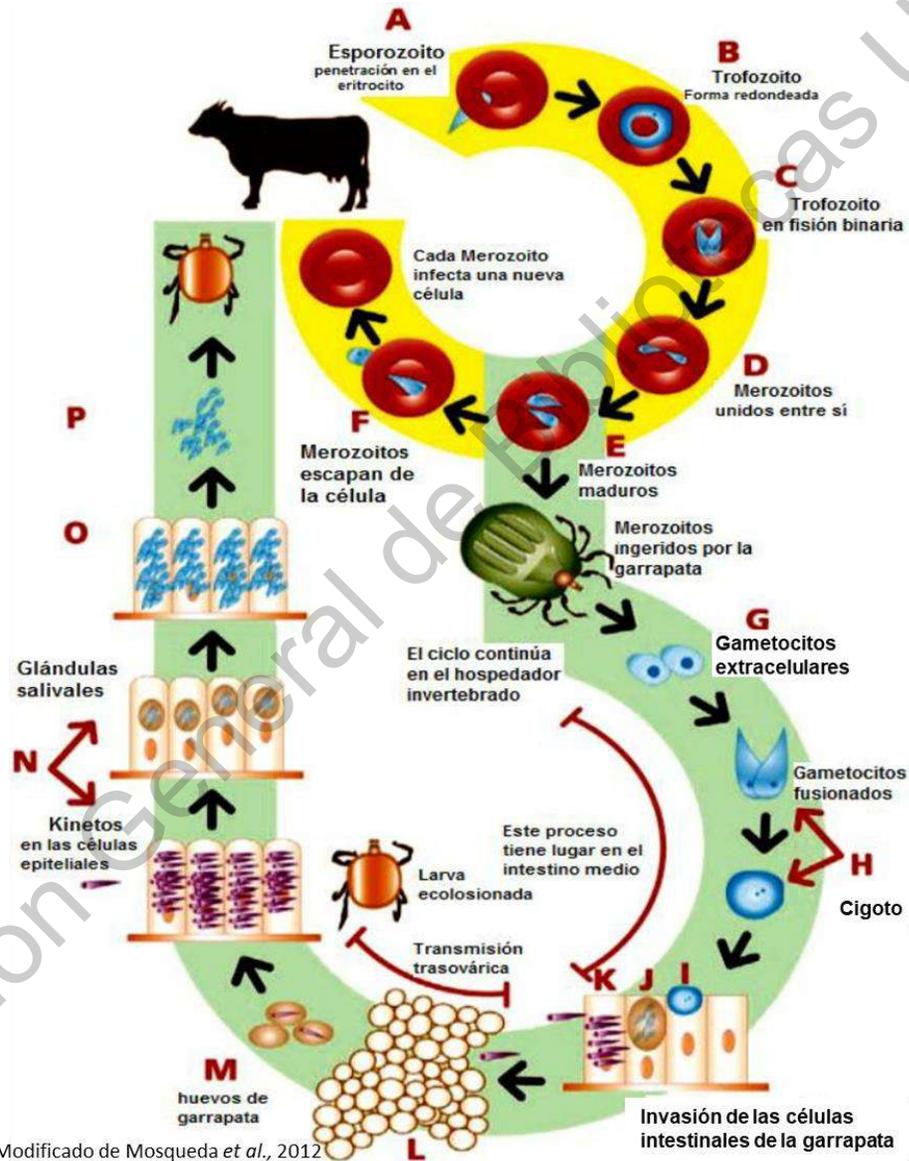


Figura 2. Ciclo de vida de *Babesia bovis*. Tomado y modificado de Mosqueda *et al.*, 2012

2.1.5 Proceso de invasión

Los apicomplexas emplean una estrategia altamente eficiente para el ingreso a sus células hospederas, mediante un proceso activo mediado por el citoesqueleto del parásito y en el cual la célula hospedera no juega un rol activo en la recepción (Gaffar et al., 2004; Sibley, 2004). Para completar su ciclo y poder invadir las células requeridas en cada uno de sus hospederos, *Babesia* spp requiere de la estricta regulación de ciertos genes y la consecuente expresión de ciertas proteínas para poder invadir, replicarse y sobrevivir (Hussein et al., 2017).

Estos parásitos emplean moléculas localizadas en la superficie celular y en los organelos secretores apicales llamados micronemas, roptrias y gránulos densos. Estos organelos están localizados en la prominencia apical de las etapas invasivas y son una característica morfológica del filio Apicomplexa (Gaffar et al., 2004; Moharan et al., 2008). Todos los miembros de este filio invaden al hospedero mediante una forma de locomoción sustrato-dependiente llamada “motilidad deslizante” accionada por el motor actina-miosina del parásito, localizado entre la membrana plasmática del parásito y la membrana interna del complejo, este mecanismo es altamente conservado entre apicomplexas (Sibley, 2004).

2.1.6 Signos clínicos y patogénia

Los signos clínicos de la babesiosis aparecen generalmente 2 a 3 semanas tras la infestación con garrapatas, sin embargo, cuando se trata de una inoculación directa el periodo de incubación se reduce a solo 4-5 días para *B. bigemina* y 10-12 días para *B. bovis*. Los signos varían según la presentación de la enfermedad que puede ser aguda, subaguda y crónica. La presentación crónica generalmente se da en animales jóvenes, menores a 9 meses y rara vez presentan signos clínicos. Cuando se presenta en forma subaguda y aguda hay fiebre, depresión, anorexia,

palidez de membranas mucosas, hemoglobinuria, hemoglobinemia y anemia hemolítica de tipo hipocrómica y macrolítica. En casos subagudos puede presentarse ictericia. La fiebre puede ocasionar abortos en hembras y disminución de la fertilidad en machos (Quiroz, 2005; Center for Food Security & Public Health, 2008).

Todos los parásitos babesiales causan anemia, pero *B. bovis* causa el cuadro clínico más grave como resultado del secuestro de eritrocitos en microcapilares del cerebro, riñones, pulmones e inclusive músculo cardíaco y esquelético, causando una disfunción o falla en estos órganos. La infección produce un síndrome de estrés respiratorio, el cual se cree es la principal causa de mortalidad por *B. bovis* (Wright et al., 1988; Bock et al., 2004). Las infecciones con esta especie de *Babesia* tienen un comienzo rápido y en ganado susceptible las infecciones primarias suelen ser mortales (Brown, 2006) .

La anemia es atribuida a procesos inmunomediados, tales como: anticuerpos dirigidos a los componentes de la membrana de eritrocitos, factores hemolíticos propios del parásito, daño mecánico por la fisión binaria de los trofozoítos, eritrofagocitosis y la producción de moléculas vasoactivas como la calicreína (Hamoda et al., 2014).

La sobreproducción de citocinas y otros agentes activos propios de la respuesta inmune durante la infección por *B. bovis* causa vasodilatación, hipotensión, incremento de la permeabilidad vascular, trastornos de la coagulación, daño endotelial y éstasis circulatoria. La éstasis se da en la circulación microcapilar, por la fuerte adhesión de eritrocitos infectados al endotelio de estos pequeños vasos, que hacen difícil su remoción. Estudios inmunohistoquímicos demostraron que el secuestro de eritrocitos en la babesiosis cerebral está asociado con algunos factores como: la fibronectina, el tercer componente del complemento, la conglutinina, antígenos parasitarios, IgG y criofibrinógeno (Wright et al., 1988; Bock et al., 2004).

Debido a la activación del sistema complemento el organismo afectado libera grandes cantidades de trombina, enzimas similares a la trombina, enzimas similares a la tripsina y fibronectina. Adicional a esto, *B. bovis* libera diversas proteasas causando la acumulación de polimorfonucleares adheridos al endotelio de pulmones y cerebro (Wright *et al.*, 1988).

2.1.7 Respuesta inmune a la babesiosis

El ganado joven es relativamente resistente al desarrollo de la enfermedad aguda, al contrario de lo que se observa en adultos cuando se presenta en ellos por primera vez la infección por *B. bovis*. Esta resistencia relacionada con la edad no se debe únicamente a la acción de los anticuerpos maternos, pues se ha demostrado que esta resistencia existe aun después de la transferencia de anticuerpos maternos de forma pasiva, así como en becerros infectados experimentalmente en zonas libres del patógeno (Brown *et al.*, 2006).

Se cree que la patogénesis severa está parcialmente inmunomediada, pues se estimula a los macrófagos a la producción de ciertas citocinas como INF γ , INF α y Óxido nítrico (NO) (Shoda *et al.*, 2000). Esta respuesta esta asociada a la protección inmune innata en muchos patógenos intracelulares (Brown, 2006).

Al ser los eritrocitos las únicas células que infecta *Babesia* en su hospedero mamífero, la respuesta inmune adaptativa contra infecciones posteriores y la protección contra la enfermedad crítica depende de la presentación de antígenos del parásito por células T CD4+. El control de la infección se da por la destrucción de los eritrocitos infectados mediada por la activación de macrófagos esplénicos y por la acción neutralizante de anticuerpos dirigidos tanto a la membrana de estas células como a los merozoitos extracelulares. Ambos mecanismos dependen de las células T CD4+, lo que resalta la importancia del bazo en el control de la infección (Brown *et al.*, 2006).

La respuesta a la infección aguda con una cepa de *B. bovis* depende de mecanismos de inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La respuesta innata debe ser lo suficientemente fuerte como para activar macrófagos vía INF γ , al activarse estos macrófagos se presenta la producción de mediadores solubles tóxicos como NO, peroxinitrito y superóxido, que resultan en la muerte del patógeno. En animales persistentemente infectados que mantienen bajo control la parasitemia o que fue inmunizado eficientemente, las células T CD4+ antígeno-específicas son esenciales para la producción de INF γ . Esta citocina es promueve la activación de macrófagos e incrementa la producción de anticuerpos neutralizantes tipo IgG2 propiciando una eliminación eficiente del parásito. Macrófagos y células dendríticas producen citocinas reguladoras como IL-12 e IL-18, que contribuyen en conjunto para inducir a la producción de INF γ (Shoda *et al.*, 2000; Goff *et al.*, 2006).

2.1.8 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la babesiosis existen diversas metodologías, sin embargo, para un diagnóstico apropiado se deben considerar diversos factores como: el estadio de la enfermedad, las herramientas con las que se cuenta para llevar a cabo el diagnóstico y el tipo de moléculas que se espera identificar.

El diagnóstico clínico se basa en la interpretación de los signos clínicos y la presencia de la garrapata vector en el paciente o en el hato. Sin embargo, puede confundirse con otras enfermedades tales como: anaplasmosis, tripanosomiasis, teileriosis, hemoglobinuria bacilar, leptospirosis, eperitrozonosis, hematuria enzoótica bovina e intoxicación crónica por cobre. Los síntomas clínicos del sistema nervioso central pueden hacer que la enfermedad se confunda con rabia (Center for Food Security & Public Health, 2008).

Los diagnósticos por visualización de *Babesia* en microscopía pueden realizarse a partir de laminillas preparadas con muestras de cortes histológicos cerebrales,

sangre bovina o hemolinfa de las garrapatas en frotis teñidos con Giemsa u otras tinciones. Las muestras deben de provenir de animales con parasitemias elevadas, de lo contrario pueden obtenerse resultados falsos negativos. Este tipo de diagnóstico es definitivo, sin embargo, para una correcta interpretación de las laminillas se requiere de personal capacitado y con experiencia, por lo que los resultados obtenidos siempre serán subjetivos además de no garantizar una diferenciación entre especies de *Babesia* confiable (Center for Food Security & Public Health, 2008; Mosqueda *et al.*, 2012).

Los métodos de diagnóstico inmunológicos se pueden utilizar cuando la cantidad de parásitos en sangre es baja y se basa en la detección de anticuerpos contra el patógeno. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) ha demostrado tener un buen nivel de especificidad y sensibilidad, además de ser una técnica relativamente sencilla, no obstante, se requiere de una buena calidad de antígeno, personal altamente capacitado (pues la interpretación suele ser subjetiva) y equipo especializado como el microscopio de fluorescencia. Una prueba inmunológica no subjetiva es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite procesar un gran número de muestras al mismo tiempo con una especificidad mayor que la IFI, pero al igual que la mayoría de las pruebas laboratoriales, requieren de equipo y personal especializado (Center for Food Security & Public Health, 2008; Mosqueda *et al.*, 2012).

Las pruebas de diagnóstico moleculares se basan en la detección del ADN específico del patógeno en muestras que pueden ser tanto del bovino como de garrapatas. La prueba de esta naturaleza más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. A diferencia de otros métodos, esta prueba de diagnóstico permite diferenciar entre especies de *Babesia*, sin embargo, el desarrollo de esta técnica requiere de varias horas de trabajo, de personal altamente capacitado e instalaciones especiales, haciéndola una técnica costosa (Center for Food Security & Public Health, 2008; Mosqueda *et al.*, 2012).

2.1.9 Tratamiento y control

Numerosas babesias se han reportado, pero su disponibilidad varía entre países. Los más usados son el acetato de diminazeno en dosis de 3 a 5 mg/kg vía intramuscular, que brinda protección tanto para *B. bovis* y *B. bigemina* por dos a cuatro semanas, y el dipropionato de imidocarb en dosis de 1 a 2 mg/kg subcutáneo para tratar la enfermedad aguda, mientras que 3 mg/kg proporciona protección por 4 semanas para *B. bovis* y hasta por 2 meses para *B. bigemina* (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012).

El control de la babesiosis bovina implica el manejo del parásito vector, la disminución de la población de garrapatas puede ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, el desarrollo de resistencia contra acaricidas por el excesivo uso de estos representa un problema en la actualidad (Center for Food Security & Public Health, 2008; Abbas *et al.*, 2014).

El bovino por naturaleza desarrolla una inmunidad de larga duración tras sobrevivir a la infección de *Babesia*, por lo cual, algunos países han desarrollado vacunas vivas con cepas atenuadas contra babesiosis para inmunizar al ganado. Aunque este tipo de vacunas son altamente efectivas, se sabe que tienen potencial de retornar a la virulencia, provocar reacciones de hipersensibilidad a las proteínas sanguíneas y si no se tiene un control de calidad sumamente estricto pueden estar contaminadas con otros patógenos además de que necesita un riguroso cuidado de la cadena fría para asegurar su viabilidad, lo que hace difícil su correcto manejo en situaciones de campo (Bock *et al.*, 2004).

Para desarrollar una nueva generación de vacunas contra la babesiosis más económicas, seguras y eficientes es necesario comprender los mecanismos por los cuales el patógeno se transmite, multiplica y causa enfermedad; en la actualidad esto es más viable debido a los conocimientos actuales en bioinformática, genómica, proteómica, metabolómica, entre otras ciencias, que nos facilitan el

entendimiento de la biología de diversos patógenos (Marcelino *et al.*, 2012; Ribas-Aparicio *et al.*, 2017).

Actualmente, se tiene conocimiento de que ciertas proteínas con actividad enzimática esenciales para la vida de los organismos, fungen también como herramientas usadas por los patógenos para lograr invadir a sus hospederos y causar enfermedad (Henderson & Martin, 2011), por lo cual éstas proteínas se estudian para ser propuestas como candidatos vacunales.

2.2 Enolasa

La enolasa es una enzima de la ruta de la glucólisis encargada de catalizar la conversión reversible de ácido 2- fosfoglicérico (2- fosfoglicerato) a fosfoenolpiruvato; éste es un paso esencial tanto en la glicolisis como en la gluconeogénesis. Esta es una de las enzimas citosólicas más abundantemente expresadas en los organismos que requieren del uso de la fermentación y/o glucólisis para subsistir. Sin embargo, a diferencia de otras enzimas con importancia metabólica similar como es el caso de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) la enolasa no es considerada enzima “housekeeping” debido a que su expresión varía según las condiciones fisiopatológicas, metabólicas o de desarrollo en las que se encuentre el organismo (Pancholi, 2001).

A partir de su descubrimiento como enzima glucolítica por Lohman y Mayerhof en 1934, se ha encontrado que en mamíferos existen tres isoformas de la enolasa codificadas por loci independientes y su expresión es regulada de forma tejido-específicas: a) la α -enolasa, presente en prácticamente todos los tejidos, b) la β -enolasa, expresada mayormente en tejido muscular y c) la γ -enolasa, expresada en tejidos nerviosos y neuroendocrinos.

Se ha demostrado que la enolasa es una proteína “moonlight” como otras enzimas metabólicas, pues posee la capacidad de funcionar en diferentes procesos

biológicos y fisiológicos. Se tiene el conocimiento de que, en situaciones de hipoxia, la enolasa actúa como proteína de estrés protegiendo a la célula promoviendo el metabolismo anaeróbico e incrementando su producción por la activación del factor hipoxia-inducido 1 (HIF-1 por sus siglas en inglés). También, usando un codón de inicio alternativo da origen a una proteína de 37 kDa similar a la α -enolasa, la MBP1 (proteína de unión a Myc-1) que se localiza en el núcleo como proteína de unión a DNA actuando como represor transcripcional. Además, se ha encontrado que la enolasa también se expresa en la superficie de diversas células eucariotas actuando como un fuerte receptor de unión a plasminógeno. El mecanismo por el cual la enolasa se transloca a la superficie celular se desconoce, pues la secuencia de aminoácidos de la proteína carece de porción transmembranal, pero se sabe que esta enolasa de superficie es importante para fibrinólisis y la invasión intracelular pues diversos patógenos son capaces de usar la enolasa como mecanismo de invasión (Pancholi, 2001; Liu & Shih, 2007).

En la superficie de algunos patógenos, como en el caso de *Plasmodium*, la enolasa interviene en el proceso de invasión a la célula hospedera por unión a plasminógeno, pues la enzima actúa como receptor de esta serina proteasa. La unión de enolasa y plasminógeno se escinde por proteasas específicas para dar lugar a plasmina activa, la cual tiene la función de degradar la matriz extracelular que rodea la célula diana facilitando el ingreso del patógeno. Así también, en esta especie Apicomplexa, enolasa tiene la característica de distribuirse dentro de la célula, en organelos como núcleo, vacuola fagocitófora, elementos del citoesqueleto, además de en las etapas invasivas (esporozoíto, merozoíto y kineto). En 2007 se demostró la presencia de la enolasa en la superficie del merozoíto de *P. falciparum*, así como la capacidad de generar anticuerpos neutralizantes en ratones inmunizados con la enolasa recombinante de este patógeno (Pal-Bhowmick *et al.*, 2007; Gosh & Jacobs-Lorena, 2011; Jarori & Moitra, 2017).

La actividad protectora contra otros patógenos no apicomplexas como *Candida albicans* se ha confirmado experimentalmente, pues la enolasa recombinante al ser

aplicada como inmunógeno en ratones genera la producción de anticuerpos que evita la diseminación de éste agente (Li *et al.*, 2011). En 2012 se demostró que al inmunizar ratones con la enolasa recombinante de *Ascaris suum*, un nemátodo intestinal de importancia en cerdos y humanos, se logró la disminución considerable de larvas de éste parásito, demostrando el potencial de esta proteína como candidato vacunal (Chen *et al.*, 2012).

En el caso de organismos del género *Babesia*, en *B. microti* se ha confirmado la presencia citoplasmática y de superficie de enolasa por inmunofluorescencia y se demostró su capacidad de unión a plasminógeno humano para dar lugar a plasmina activa la cual es una serina proteasa con capacidad de degradar la matriz extracelular. Además, al inmunizar ratones con esta proteína recombinante se logró crear inmunidad protectora parcial contra *B. microti* (Liu *et al.*, 2017).

III. Hipótesis

Babesia bovis tiene el gen de la *enolasa* el cual se expresa en merozoitos y la proteína codificada por este gen contiene epítomos B conservados inmunogénicos.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Demostrar la presencia y funcionalidad del gen *enolasa* en *Babesia bovis* e identificar epítomos B inmunogénicos en la proteína.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar y aislar el gen *enolasa* en *B. bovis*.
2. Evaluar la expresión del gen a nivel de transcrito.
3. Demostrar que péptidos con epítomos B de la *enolasa* de *B. bovis* son inmunogénicos.
4. Evaluar la expresión de la proteína *enolasa* de *B. bovis*.

V. Metodología

5.1 Material biológico utilizado

Los procedimientos realizados en animales durante el desarrollo de este trabajo de investigación cuentan con autorización del comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (proyecto 14FCN2019).

El ADN de *B. bovis* utilizado en este proyecto proviene de aislados realizados en México obtenidos de Nayarit, Michoacán y Puebla, procesados en el laboratorio de Inmunología y vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Para la obtención de eritrocitos infectados con *B. bovis* del aislado de Puebla, se infestó con larvas infectadas con *B. bovis* a un bovino macho de 8 meses de edad, raza Holstein, clínicamente sano y proveniente de una zona libre de garrapatas y por lo tanto de *B. bovis* y *B. bigemina*. De la sangre del bovino infectado se realizaron frotis sanguíneo en laminillas para antígeno, se extrajo ADN y se preservaron eritrocitos infectados en TRIzol Reagent (Invitrogen, California, USA). Este material se preservó a -20°C hasta su uso.

5.2 Identificación y evaluación de la expresión del gen *enolasa* en *B. bovis*.

5.2.1 Extracción de ADN de *B. bovis*.

Para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre infectada con *B. bovis* de los aislados de Tepic, Michoacán y Puebla se utilizó el kit de extracción “DNeasy Blood & Tissue kit” (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante:

En un tubo de 1.5 ml se añadieron 100 µl de sangre infectada, 20 µl de proteinasa K, 100 µl de PBS pH 7.4 y 200 µl de Buffer AL, se procedió a mezclar durante 1 minuto en vortex e incubar a 56°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de etanol grado biología molecular y se mezcló por 1 minuto en vortex. Con ayuda de una pipeta se colocó el contenido del tubo en una de las columnas incluidas en el kit y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto, descartando el sobrenadante del fondo del tubo recolector. En la columna se añadieron 500 µl del Buffer AW1, se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µl del Buffer AW2, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto para secar la membrana de la columna. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo y se añadieron directamente sobre la membrana 100 µl del Buffer AE, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8,000 rpm. Finalmente se descartó la columna y el producto de la extracción se cuantificó en el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.2.2 Extracción de ARN de *B. bovis*.

La extracción de ARN de *B. bovis* del aislado de Puebla se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación, basado en el método recomendado por el fabricante del reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen, California, USA):

A 1 ml de muestra descongelada de sangre infectada preservada en trizol se le adicionaron 200 µl de cloroformo, se vortexeó 15 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente 3 minutos para después centrifugar a 4°C 15 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante claro resultante de la centrifugación fue colocado en un tubo nuevo de 1.5 ml y se le añadió la 5ta parte del volumen total del sobrenadante de cloroformo para después vortexear, reposar y centrifugar como se describió anteriormente. El sobrenadante claro resultante de esta segunda centrifugación se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y se le añadió 1 volumen de

isopropanol frío (4°C), se agitó por inversión 10 veces y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 4°C 10 minutos a 12,000 rpm. Se descarta el sobrenadante evitando despegar el pellet del fondo del tubo, después se añadió 1 ml de etanol al 75% frío. Se vortexeó 5 segundos hasta despegar el pellet y se centrifugó a 4 °C por 5 minutos a 7,500 rpm, se descartó el sobrenadante evitando despegar el pellet del fondo. Se repitieron estos últimos pasos de lavados con etanol al 75%, centrifugación y retiro de sobrenadante 2 veces más. Finalmente se dejó secar totalmente el pellet obtenido y se rehidrató con 15 µl de agua grado biología molecular, se vortexeó hasta homogenizar y se procedió a su cuantificación en el equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Se procedió a tratar la extracción de ARN anterior con ADNasa empleando kit DNase I (Invitrogen, California, USA) según las especificaciones del fabricante: se tomaron 8.5 µl de la extracción de ARN anterior los cuales se colocaron en un microtubo de 200 µl, se añadió a la reacción 1.5 µl de Buffer de reacción X10, 0.75 µl de DNase I y 4.25 µl de agua grado biología molecular obteniendo un volumen final de 15 µl. La reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se separaron 5 µl de la reacción para obtener el control negativo. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.2.3 Identificación y análisis *in silico* del gen enolasa de *B. bovis*.

A partir de las secuencias reportadas del genoma de *B. bovis* cepa T2bo en la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) se realizó una búsqueda de secuencias similares a las reportadas del gen *enolasa* de *Babesia bigemina* (código de acceso NCBI: MK490919.1) y *Plasmodium falciparum* (código de acceso NCBI: XM_004221995.1). Se encontró una secuencia similar a las antes mencionadas en el cromosoma 3 (código de acceso NCBI:AAXT01000001.1), la cual se tomó para realizar: 1) la predicción de marcos abiertos de lectura con ayuda

de la herramienta ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>), 2) la predicción de intrones y exones con la herramienta GENSCAN (<http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html>).

5.2.4 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *enolasa* de *B. bovis*.

A partir de la secuencia obtenida del cromosoma 3 de *B. bovis* donde se localiza el gen *enolasa* se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos, cuya localización se ejemplifica en la Figura 3 y las características de cada uno de los oligonucleótidos fueron obtenidas con ayuda de la herramienta OligoAnalyzer de la plataforma IDT™ INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) las cuales se detalla en el Cuadro 2.

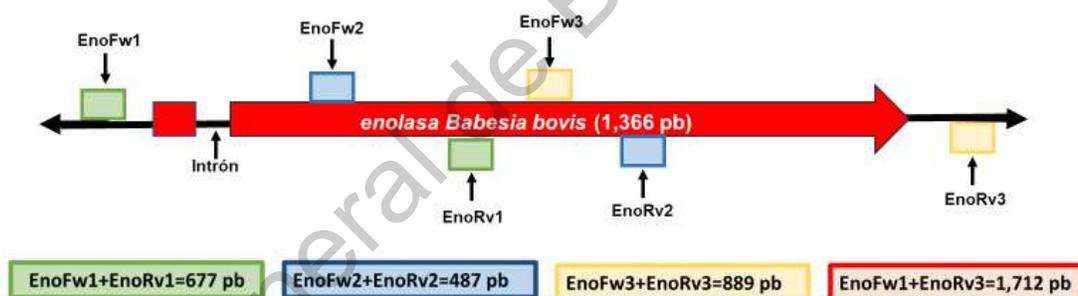


Figura 3. Localización los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *enolasa* de *B. bovis* y el tamaño esperado de cada amplificación.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos diseñados.

OLIGONUCLEÓTIPO	SECUENCIA	LONGITUD	%GC	MELT T°
EnoFw1	5'-CACTTGTCGCTCAGTCACTC-3'	21	57.1%	57.8°C
EnoRv1	5'-TGGTAGACTTCACATCCCATGC-3'	22	50%	56.8°C
EnoFw2	5'-CATGCTCCCAGTTCCATGC-3'	19	57.9%	56.6°C
EnoRv2	5'-GGTGTATGCTTCCCAGTCATCC-3'	22	54.5%	57.6°C
EnoFw3	5'-GGTCAAGATTGGTATGGATGTCG-3'	23	47.8%	55.5°C
EnoRv3	5'-CCCTGCGATACTGGAGTTTTG-3'	21	52.4%	55.8°C

5.2.5 Amplificación del gen *enolasa* de *B. bovis* mediante PCR

La amplificación del gen *enolasa* mediante PCR se llevó a cabo en una reacción de 50 μ l, la cual estaba compuesta por 25 μ l de MyTaq™ Mix (Bioline, Luckenwalde, Germany), 10 μ l de DNA de *B. bovis* de las cepas de Tepic y Michoacán (concentraciones de DNA: cepa de Tepic 24 μ g/ μ l, cepa de Michoacán 7.5 μ g/ μ l), 2 μ l de los oligonucleótidos “EnoFw1” y “EnoRv3” a 10 pmol/ μ l y 11 μ l de agua grado biología molecular para ajustar el volumen. La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) con el programa de termociclado especificado en el Cuadro 3. El producto total de la reacción se visualizó en un gel de agarosa al 1% con el tinte fluorescente GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (GOLDBIO, St. Louis, USA) e identificando el amplicón con base en el marcador de talle molecular HyperLadder™ 1Kb (Bioline, Luckenwalde, Germany) haciendo uso del equipo ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK).

Cuadro 3. Programa de termociclado para amplificar el gen de la *enolasa* de *B. bovis*.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	35
Alineamiento	53°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

5.2.5 Determinación de la expresión del gen mediante RT-PCR.

Para continuar con el proceso de retrotranscripción se hizo uso del kit Super Script® III First-Strand (Invitrogen, California, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. A los 10 μ l restantes del RNA tratado con ADNasa se le añadió 1 μ l de EDTA 25 μ M, 0.375 μ l de Oligo DT y 0.375 μ l de Random Primer, la reacción se

incubó a 65°C en termociclador por 10 minutos e inmediatamente se pasó a hielo por 1 minuto. Posteriormente se le añadió 2 µl de Buffer 2x, 2 µl de Mg 50 mM, 2 µl de DTT, 1 µl de DNTP's, 0.25 µl de RNasa Out y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa, quedando una reacción final de 20 µl, la cual se colocó en termociclador por 10 minutos a 25°C, después 50 minutos a 50°C y finalmente 5 minutos a 85°C. Una vez concluidas estas incubaciones se añadió 1 µl de RNase Out y se incubó a 37°C por 20 minutos.

El ADNc obtenido de la retrotranscripción se usó en una reacción de PCR de 12.5 µl compuesta de la siguiente manera: 6.25 µl de MyTaq™ Mix (Bioline, Luckenwalde, Germany), 5 µl de cada uno de los oligonucleótidos que amplifican la parte interna del gen “EnoFw2” y “EnoRv2” a 10 pmol/µl, 3.25 µl de agua grado biología molecular y 2 µl del ADNc obtenido. Como control positivo se usó ADN de *B. bovis* de la cepa de Tepic y como control negativo se usó el RNA tratado con ADNasa, ambos en la misma cantidad que el ADNc. El programa de termociclado se especifica en el Cuadro 4. El producto de la reacción se visualizó en gel de agarosa al 1% con GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) y se usó como referencia el marcador de talla molecular Hyperladder™ 100BP (Bioline, Luckenwalde, Germany).

Cuadro 4. Programa de termociclado para amplificar la parte interna del gen de la *enolasa* de *B. bovis*.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	35
Alineamiento	62°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

5.3 Obtención las secuencias predichas de péptidos con epítomos B.

5.3.1 Clonación del gen *enolasa* de *B. bovis*.

A partir de ADN de *B. bovis* de Michoacán y Tepic se amplificó el gen de la *enolasa* y se procedió a su clonación siguiendo el siguiente protocolo:

El amplicón observado en el gel de agarosa se cortó con ayuda de un bisturí y un transiluminador Accuris™ (Accuris Co., Ltd., USA) para posteriormente purificarse con el kit EZ-10 Spin Column DNA gel Extraction MiniPreps (Bio Basic, Ontario, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante:

Las bandas cortadas se colocaron en microtubos de 1.5 ml y se agregaron 400 µl de Binign Buffer II por cada 100 mg de gel, se incubaron a 55°C por 10 minutos mezclando por inversión ocasionalmente para lograr la disolución total del gel en el buffer. Se pasó el contenido del tubo a una de las columnas incluidas en el kit dejando reposar 2 minutos y procediendo a centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante del fondo del tubo recolector. A continuación se realizaron dos lavados consecutivos de la siguiente manera: en la misma columna se añadieron 750 µl de Wash Solution y se centrifugó a 10,00 rpm por 1 minuto descartando el sobrenadante. Posterior a los lavados se secó la columna por 1 minuto a 10,000 rpm y se traspasó a un tubo nuevo de 1.5 ml. Directamente sobre la columna se añadieron 20 µl de Elution Buffer, se dejó incubar a 37°C por 5 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos. Este último paso de elusión y centrifugación se repitió una vez mas para obtener un volumen total de 40 µl de la purificación de ADN.

Una vez obtenido el ADN purificado se procedió a verificar la integridad y determinar la concentración del purificado en gel de agarosa al 1 % con el agente intercalante y el marcador antes descrito haciendo uso del ChemiDoc. Una vez obtenidos estos datos se procedió a calcular la proporción inserto/ vector (3:1) para proceder a la clonación y transformación de células competentes con el kit TOPO™ TA Cloning™

Kit, con pCR™2.1-TOPO™ One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, and PureLink™ (Invitrogen, California, USA) como se describe a continuación:

La reacción de clonación compuesta por 1 µl de sales, 1 µl del vector, 0.87 µl del inserto (ADN purificado del del gel) y 3.13 µl de agua grado biología molecular se colocó en termociclador y se incubó por 30 minutos a 30°C. Para proseguir con la transformación de células competentes *E.coli* Top10, se añadió el total de la reacción de clonación al vial de células competentes, después la reacción se incubó en hielo por 30 minutos y se sometió a un choque térmico a 42°C por 30 segundos y después regresando la reacción a hielo inmediatamente. Se adicionó al vial 250 µl de medio S.O.C y se dejaron incubar a 37° C por 1 hora en agitación orbital a 200 rpm. Las células se sembraron en placas de Petri con agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/ ml) y se dejaron incubando toda la noche a 37°C. Posterior a la incubación se seleccionaron 6 colonias de cada aislado de *B. bovis* para analizarlas realizando un PCR de colonias con el fin de verificar la presencia del inserto en las células transformadas usando los oligonucleótidos “EnoFw1” y “EnoRv3” con el protocolo antes especificado en una reacción de 12.5 µl. Las colonias positivas al inserto se cultivaron en 5 ml de medio LB-Ampicilina incubandolas toda la noche a 37° C, en agitación a 200 rpm. Se extrajo el ADN plasmídico de los cultivos con el kit illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

5.3.2 Secuenciación del gen *enolasa* de *B. bovis*.

Se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos) el producto de la extracción de ADN plasmídico de la colonia 2 transformada con el inserto del gen enolasa del aislado de Tepic (TOPO+EnoBbovT) por duplicado y el ADN plasmídico las colonias 1 y 6 transformadas con el inserto del gen enolasa del aislado de Michoacán (TOPO+EnoBbovM) con el uso de los oligonucleótidos diseñados para el gen de interés “EnoFw2”, “EnoRv2” y los oligonucleótidos generales de TOPO “M13/pUC

Reverse” y “T7 primer”. Los electroferogramas obtenidos se analizaron con ayuda del programa BioEdit de NUCLEICS (<https://www.nucleics.com>) y se ensamblaron para obtener las secuencias correspondientes al gen enolasa de *B. bovis* de los aislados de Michoacán y Tepic.

5.3.3 Análisis bioinformático e identificación de péptidos con epítomos B.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas: 1) ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) para identificar marcos de lectura abiertos y obtener secuencias predichas de aminoácidos, 2) SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) para predecir la presencia de péptido señal en la secuencia de aminoácidos, 3) TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predecir la presencia de regiones transmembranales y 4) SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) para identificar dominios de proteínas. El punto isoeléctrico y el peso molecular se predijeron con ayuda de la herramienta ComputeI/Mw de ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Adicionalmente las secuencias de aminoácidos obtenidas se compararon con otras secuencias de *enolasa* reportadas en el Gene Bank haciendo alineamientos con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y Boxshade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de la proteína ENolasa de *B. bovis* incluyendo las secuencias obtenidas en el laboratorio y las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), también se determinó el porcentaje de similitud entre ellas con la herramienta Clustal Omega. Para buscar los péptidos con epítomos B se usaron las herramientas bioinformáticas ACBpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred>), BCEpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred>) BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>) e IEDB (<https://www.iedb.org>). Los

péptidos seleccionados se enviaron a sintetizar en sistema peptídico de 8 brazos (MAPS-8) a Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, VA, USA).

5.4 Determinación de la expresión de la proteína Enolasa de *B. bovis* con anticuerpos anti-péptidos.

5.4.1 Generación de anticuerpos anti-péptidos.

Para la generación de anticuerpos contra los péptidos seleccionados en esta investigación se utilizaron conejos de 2 meses de edad, los cuales se mantuvieron y manejaron en las instalaciones de la granja cunícula, ubicadas en el Campus Amazcala, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Cada péptido sintético (ENOL-1 y ENOL-2) se solubilizó con PBS pH 7.4 y se emulsificó en adyuvante Montanide ISA 71 VG (Seppic, Francia) a una concentración de 100µg/ml. Previo a la primera inmunización se obtuvo una muestra de suero como control de cada conejo empleado en el estudio. Con cada péptido se inmunizaron 2 conejos vía sub-cutánea en la región escapular, utilizando jeringa de 3 ml con aguja de calibre 22. Las inmunizaciones se repitieron 5 veces con intervalos de 21 días entre cada inmunización. Se empleó un conejo control, el cual fue inmunizado con una mezcla de PBS y adyuvante (v/v) y mantenido bajo las mismas condiciones que el resto de los individuos de este experimento.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena auricular antes de cada inmunización y 15 días después de la última inmunización se procedió al sacrificio de los conejos para el sangrado final de la vena yugular. El suero fue separado por centrifugación y envasado posteriormente en tubos de 1.5 ml en cantidades de 200 y 500 µl para almacenarse a -20°C hasta su uso.

5.4.2 Determinación y titulación de anticuerpos anti-péptidos de enolasa

Para evaluar la generación y títulos de anticuerpos contra los péptidos de la enolasa de *B. bovis* se realizó la técnica de ELISA indirecta siguiendo el siguiente protocolo (Hernández-Silva *et al*, 2018):

Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos con cada uno de los péptidos diluidos en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6 a una concentración de 2 µg/ml, 100 µl por pozo y se dejaron incubar toda la noche a 4°C. En cada placa se sensibilizaron 3 pozos con suero de conejo diluido de igual forma que los péptidos a una concentración de 1:500 como control de conjugado (C.C). Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con 200 µl de PBS con 0.05% de Tween 20 (PBS-T 0.05%), se secaron y bloquearon con 200 µl leche descremada marca Svelty® al 5% en PBS-T 0.05% incubándolas a 37°C por 1 hora, después se lavaron y secaron como se describe anteriormente y se procedió a añadir el suero de conejo de la siguiente manera:

- Para la determinación de generación anticuerpos se analizó por triplicado cada individuo agregando 100 µl de suero pre inmunización y de suero correspondiente a cada una de las inmunizaciones diluido 1:500 en PBS-T 0.05% en la placa sensibilizada con el péptido correspondiente. Adicionalmente se colocaron 100 µl de PBS-T 0.05% en 3 pozos como control de PBS.
- Para la titulación de anticuerpos, se colocó por triplicado 100 µl de suero pre inmunización y el correspondiente a la 5ta inmunización diluido 1:500 en PBS-T 0.05%, haciendo diluciones seriadas hasta llegar a la dilución 1:1,024,000. Todas estas diluciones fueron realizadas en PBS-T 0.05%. a cada placa se añadió de igual forma un triplicado de control de PBS. Se determinó el título máximo de anticuerpos identificando la dilución anterior a la que no presenta diferencia estadísticamente significativa con la misma

dilución del suero pre-inmunización. Para este análisis se realizó una prueba T de comparativa de medias para muestras emparejadas con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$).

Después de agregar los sueros se incubaron las placas a 37°C por 1 hora, se lavaron, se secaron y se procedió a añadir 100 µl de anticuerpo anti-IgG de conejo (H+L) conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch®, Philadelphia, PA.) diluido 1:6,000 en PBS-T 0.05% con 2% de leche descremada y se repitió el protocolo de incubación. Una vez finalizada la incubación, se lavó 3 veces con 200 µl de PBS-T 0.05% y una vez con 200 µl de PBS, se secaron y se procedió a añadir 100 µl de solución sustrato (O-fenilendiamina dihidrocloruro y agua oxigenada en citrato ácido cítrico), incubando a temperatura ambiente por 20 minutos y procediendo a leer inmediatamente en lector de placas a 450 nm.

5.4.3 Reconocimiento de la enolasa de *B. bovis* por anticuerpos anti- péptidos de Enolasa

Para comprobar la capacidad de los anticuerpos anti-péptidos de enolasa de reconocer a la proteína nativa de *B. bovis* se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta siguiendo el siguiente protocolo (Hernández-Silva *et al*, 2018):

Las láminas con frotis de eritrocitos infectados fueron fijadas en acetona al 100% por 30 minutos a 4°C, posteriormente se dejaron secar y se trazaron pozos usando esmalte de uñas para delimitar el espacio de cada muestra. Se procedió a colocar por cada pozo 60 µl del suero pre inmunización y el correspondiente a la 5ta inmunización tanto de los conejos inmunizados con péptidos como del conejo control. En este análisis se incluyeron los sueros pre inmunización y post inmunización de un conejo inmunizado con la proteína enolasa recombinante de *B. bigemina* como control positivo. Todos los sueros evaluados fueron diluidos 1:20 en PBS-T 0.1%. Después de incubar a 37 °C por 30 minutos en cámara húmeda se

procedió a lavar las láminas 3 veces con PBS-T 0.1% en cubetas de vidrio tipo Coplin a 50 rpm durante 5 minutos por lavado. Se secaron en cabina de flujo laminar y se procedió a colocar en cada pozo 20 µl de anticuerpo anti- IgG de conejo (H+L) conjugado con Alexa 488 Jackson ImmunoResearch® (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) dilución 1:200 en PBS-T 0.1% con 2 µg/ml de DAPI, se incubó por 30 minutos en cámara húmeda cubierta con aluminio para evitar el paso de la luz. Se realizó el protocolo de lavados y secado como se explica anteriormente evitando exponer las láminas a la luz directa. Finalmente se leyeron las láminas en un microscopio de fluorescencia Leica® DM 2500 (Leica, Heerbrugg, Suiza).

VI. Resultados

6.1 Análisis *in silico* del gen *enolasa* de *B. bovis*

Los análisis bioinformáticos permitieron la identificación del gen *enolasa* en el cromosoma 3 del genoma de *B. bovis* (en adelante nombrado *enoBbov*) cepa *T2Bo*, ubicado en el locus BBOV_III007950 y se encuentra flaqueado por dos genes que codifican a proteínas hipotéticas (loci BBOV_III007940 y BBOV_III007960). El gen tiene un tamaño de 1,366 pb, que presenta un único intrón que inicia en la posición 40 de la secuencia y termina en la posición 94, lo anterior se esquematiza en la Figura 4.

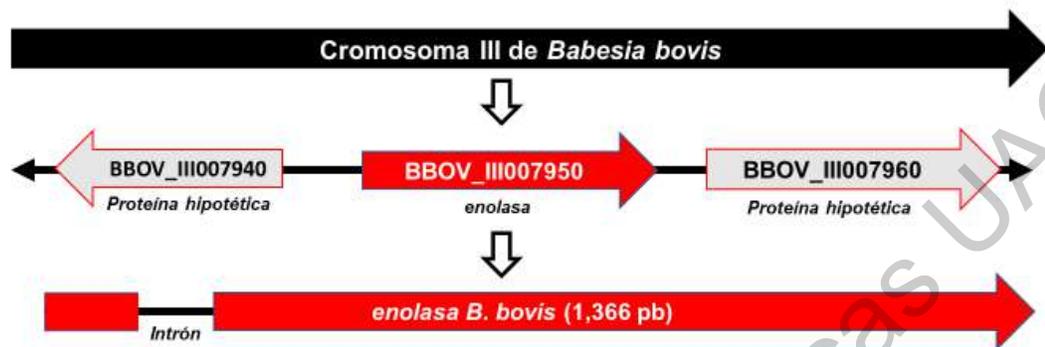


Figura 4. Esquematación de la localización del gen *enolasa* en el cromosoma III de *B. bovis*.

El gen presenta una identidad con su homólogo en *B. bigemina* del 76.29% y del 62.84% con *P. falciparum*, genes que se usaron como base para poder ser identificado en el genoma de *B. bovis*. El alineamiento de estas secuencias se muestra en la Figura 5.

P. falciparum 1 -----ATGGCTCAGT-----ATAAATCTATTAA
B. bovis 1 ATGGCAACTATCAAACTCTTTTCAGGCTCGCGAAATTCTTGGTATAGCCCTATTAAATCTTG
B. bigemina 1 ATGGCTTCGATTACTGCAATTCAGGCTCGCGAAATTCTTGGTATAGTTTATCTCCCTGTG

P. falciparum 27 TGCCCGTGAAATTTAGATTCTAGAGGAATCCCAACTGTGAAGTTGACTTACAGACCAA
B. bovis 61 ATATTTCATTCAACAGACTCTCGTGGTAAATCCAAGTGTGGAAGTTGATATCCACAGTGT
B. bigemina 61 TGTTCCTATTACACAGACTCCCGTGGAAATCCACAGTTCGAAGTTGACCTCGCCACCGC

P. falciparum 87 CTTAGGTATTTTCAGAGCTGCCGTACCATCTGGTCCCTCCACTGGTATTTAGGAAGCCTT
B. bovis 121 TGACGGTCTCTTCAGAGCCGCTTGGCCATCTGGCCGCTCCACTGGTATCTACGAAGCCCT
B. bigemina 121 TGACGGTCTCTTCAGAGCCGCTTGGCCATCTGGCCGCTCCACTGGTATCTACGAAGCCCT

P. falciparum 147 AGATTAAAGAGATATGACAAGAGCACTACTTAGGAAGGGTGTTCATAAAGCTATCAA
B. bovis 181 AGAGCTCCGTGATGGGACAAGGATCGTACTTGGTAAGGGTGTGTTGAAGGCTGTTC
B. bigemina 181 CGAGCTCCGTGATGGTGACAAAGCGGATACCTTGGTAAGGGTGTGTTGAAGGCTGTCAA

P. falciparum 207 GAACCTTAATCAAACTTATGCTCCAGAAATGATTGGAAATGATGTACTGAACAAAAGAA
B. bovis 241 CAACGTCAATCTTACCCTCGCCGTTGGAGTTACCGCCCATGATGCCACCAACAAAATGT
B. bigemina 241 CAACGTCAACCTCACCATCGCCGCGGTTGGAAGGTCATGATGTCCGTGACCAAAAGGG

P. falciparum 267 AATGACAAATTAATGGTCAAAATTTGATGGAAAGTAAAAATGAATGGGGATGTCAAA
B. bovis 301 TTTGGATGACTACATGGTAAAAACTCTTATGAGGCAATAAAATGAATGGGGATACTGCAA
B. bigemina 301 ATTGGACGACTCATGGTCAAAATTTGACGGTAGCATAAAATAATGGGGTCACTGCAA

P. falciparum 327 AAGTAAATTAGGAGCTAATGCTATTTTAGCTTATCCATGGCTGTATGTAGAGCTGTGG
B. bovis 361 GTCTAACTAGGTGCTAAACGCAATTCAGTAAATTTCCATGGCTGCTGCCAGGCGCCGCTGG
B. bigemina 361 GTCTAACTAGGTGCTAAACGCTATCTTGTCTTCCATGGCTGCTGCCAGGCGCCGCGC

P. falciparum 387 ASCCTCTAATAAATSTATCTTTTACAAATNTTGGCACAAATAGCTGGAAAGAAAATGAA
B. bovis 421 TCGTGCACAAAGATCTCTCTACCAACACCTGGCTGAAGTACTGGCAAACAACCGA
B. bigemina 421 CCAATCAAAAGAGTCCCTTACCAACACCTCGCTGACTTCCCGCAAGCCACTGA

P. falciparum 447 CCAATGCTATTAACAGTACCTTGTTCACCTTATCAATGGAGGATCCCATGCGCGAAA
B. bovis 481 CAATACATCTCCAGTTCCTATGCTTAAATGTCATTAACGGTGGTTCCACCGCTGGAAA
B. bigemina 481 CAATACATCTCCAGTTCCTATGCTTAAATGTCATTAACGGTGGTTCCACCGCTGGTAA

P. falciparum 507 CAATTTCTTTCAAGAATTTATGATAGTCCAGTTGGTCTCCATCATTTAAAGAGCC
B. bovis 541 CAGCTTGCCATGCAAGAATTCATGATCCTTCCAGTTGGTCTCCAGCTTCAAGGAGGG
B. bigemina 541 CAGCTTGCCATGCAGAAATTCATGATCCTTCCAGTTGGTCTCCAGCTTCAAGGAGGG

P. falciparum 567 CTAAAGATATGGTGTGAAGTATATCACTTAAATCTGAATTTAAATAGAAATATGG
B. bovis 601 CATTCGCATGGGATGTGAAGTACCCACAACCTTAAGAAGGTATTAACGCCAAATATGG
B. bigemina 601 CATTCGCATGGGTTGGAAGTATACCCACAACCTTAAGAAGGTATTAACGCCAAATATGG

P. falciparum 687 TGAAGCTCTTGATTCTTTAGTACTGCCATTAAATCAGCTGGTTATGAAGGAAAGGTTAA
B. bovis 721 TGAAGCACTTGACCTCTTGGTGGATCCATCAAGAAAGCTGGATTGAAGGTCAGGTCAA
B. bigemina 721 TGAAGCCCTTGACCTCTTGGTGGATCCATCAAGAAAGCTGGATTGAAGGTCAGGTCAA

P. falciparum 747 AATTGCTATGGATGTTGCAGCTCTCGAATTTTACACAAATGAAACAAACATACATTT
B. bovis 781 GATTGCTATGGATGTCGCCCTCGAGTTCTATGTTAAAGAGTCCAAATCATACAAATTT
B. bigemina 781 GATTGCCATGGATGTCGCTGCCTCGAGTTCTACGTCAAAGAGTCAATTTCTTACAAATTT

P. falciparum 807 AGTTTCAAACTCCAAATAATGACAAATCATTATTAAGACTGGAGCTCANTTTGTGA
B. bovis 841 GGCATTCAAATGCGAAACT-----CCTTACATGAAGTCTGGTCCCGAATGGTTGC
B. bigemina 841 GGGTTCAAATGCGAACTAG-----CCTTACATGAAGTCTGGTCCCGAATGGTTGC

P. falciparum 867 CTATACATTGATTTGTAGAGAAATATCCAATTGTTCTATTGAAATCCMTTGTATCA
B. bovis 892 CTACTACAAGGACTTTTGCCAGAAGTACCCAATTGTCTCTATTGAGGACCCCTCGACCA
B. bigemina 892 CTACTACAAGGACTTTTGCCAGAAGTACCCATGCTCTCTATTGAGGACCCCTCGACCA

P. falciparum 927 AGATGATTGGGAATTTATCTTATTTACAGCGCTATTGGAAAGGATTTCAATTTGT
B. bovis 952 AGATGACTGGGAATCTTACACCTTGTCTACATAGAGATTGGAGACAAATTTCAATTTGT
B. bigemina 952 AGATGACTGGGAATCTTACAGATGTTTACAGAGAGATGGGCTCTCTCTTCAATTTGT

P. falciparum 987 TGGTGATGATTTTGTAGTTACAAACCCCAACAGATTTCTAAGGCTCTTGAAATAAATGC
B. bovis 1012 TGGTGATGACTTGTCTGTACTAACCCTAAGCGTATCCAGAGCCGCTTCAACAAGAAATGC
B. bigemina 1012 TGGTGATGACTTGTCTGTACTAACCCTAAGCGTATCCAGACTGCCCTTGCACAAGAAATGC

P. falciparum 1047 TTGCANTGCTTTACTTCTTAAATTAACCAAATCGGTTCTTTACTGAAGCTATTGAAGC
B. bovis 1072 TTGCAACGCTCTTTTGTGTAAGGTTAACCAAATTTGTTCCGTAAGCGAAGCTATCGATGC
B. bigemina 1072 TTGCAACGCTCTTTTGTGTAAGGTTAACCAGATCGGATCTGTACCGAATGCATCGAATGC

P. falciparum 1107 TTGCTTATTTCTCAGAAATAAATACTGGGGTGTATGGTTTCTCACAGTCTGGTGAAC
B. bovis 1132 CTGCCTCCTTAGCCACAATAAATACTGGGGTGTATGGTTTCTCACAGGCTGGTGAAC
B. bigemina 1132 TTGCTTATTTAGTCACCTAACAATACTGGGGTGTATGGTTTCTCACAGGCTGGTGAAC

P. falciparum 1167 CGAAGATGTTTTATTGCTGATTTAGTTGTTGCTTGAAGACCGGACAAATCAAACAGG
B. bovis 1192 CGAAGATAGTTTATTGCTGACCTTGTATAGCACTCGGAACCGGACAAATCAAACAGG
B. bigemina 1192 TGAAGACACTTTCATTGCTGACCTGTTGTTGCTTGAAGACCGGACAAATCAAACAGG

P. falciparum 1227 AGCTCCATGCTAGTGAAGAAACGCCAAATATAACCAATTTTAAAGNATTGAATGATC
B. bovis 1252 CGCTCCATGCCGCACTGAAAGAAATGCCAAATACACCAGTTGATCCGCATTGAGGAAATC
B. bigemina 1252 TACTCCTGCCGCACTGAAAGAAATGCCAAATACACCAGTTGATCCGCATTGAGGAAATC

P. falciparum 1287 TTTAGGAACAAATGCTGTTTTTCTGGAGAAATTTAGATTACATTAATTAATTA
B. bovis 1312 TCTTGGATCAGGCTCTTACGCTGGTGGTGCATTCCGCACCTGTGCCCCAATA
B. bigemina 1312 TCTTGGTTCCCGTGCTCGCTAOCCTGGCTGCTGCTTCCGCACCTGTGCCCCAATA

Figura 5. Alineamiento realizado con Boxshade de los genes *enolasa* identificados *Babesia bigemina*, *Plasmodium falciparum* y en el cromosoma III de *B. bovis* de la cepa T2Bo. En negro se resaltan las regiones idénticas y en gris las similares.

6.2 Amplificación del gen *enoBbov* mediante PCR.

El amplicón esperado con el uso de los oligonucleótidos “EnoFw1” y “EnoRv3” diseñados para que se alinearan río arriba y río abajo del locus del gen *enoBbov* es de 1,712 pb, en la Figura 6 se muestra el amplicón obtenido en los aislados del DNA de *B. bovis* de Tepic y Michoacán.

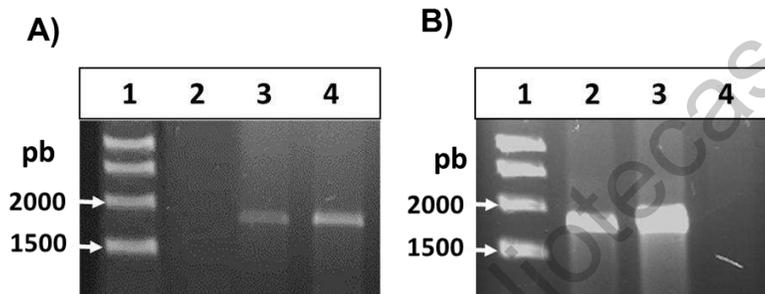


Figura 6. Amplicones obtenidos del gen *enolasa* en gel de agarosa al 1% con GelRed™. A) resultados obtenidos con el aislado de Michoacán: (1) marcador de tamaño molecular, (2) control negativo, (3) control positivo ADN *B. bovis*, (4) ADN *B. bovis* aislado de Michoacán. B) resultados obtenidos con el aislado de Tepic: (1) marcador de tamaño molecular, (2) control positivo ADN *B. bovis*, (3) ADN *B. bovis* aislado de Tepic, (4) control negativo.

6.3 Determinación de la expresión del gen *enolasa* mediante RT-PCR

El amplicón esperado con el uso de los oligonucleótidos “EnoFw2” y “EnoRv2” diseñados para que se alinearan en la región interna del gen *enoBbov* es de 487 pb. En la Figura 7 se muestra el amplicón obtenido a partir del ADNc del aislado de *B. bovis* de Puebla. En este experimento se incluyó como negativo de RT la extracción de ARN tratada con ADNasa sin someterse a retrotranscripción.

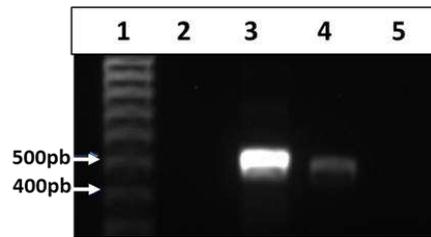


Figura 7. Amplicones obtenidos del gen *enolasa* en gel de agarosa al 1% con GelRed™. (1) Marcador de talle molecular, (2) control negativo, (3) control positivo ADN de *B. bovis*. (4) ADNc obtenido a partir de RNA del aislado de Puebla, (5) control negativo de RT.

6.4 Clonación y secuenciación del gen *enolasa* de *B. bovis*.

De las 6 colonias que se seleccionaron, procedentes de la clonación y transformación de las células *E. coli* TOP-10 con el inserto del gen *enoBbov* del aislado de Tepic (TOPO+*EnoBbovT*), solo una resultó positiva al PCR de colonia mostrando una amplificación del tamaño correspondiente al inserto (Figura 8, Panel A), Por otra parte, de las colonias que se clonaron y transformaron con el inserto del gen *enoBbov* del aislado de Michoacán (TOPO+*EnoBbovM*) se observaron amplicones en 4 de las 6 colonias seleccionadas, pero solo 2 de estos amplicones fueron del tamaño esperado (Figura 8, Panel B).

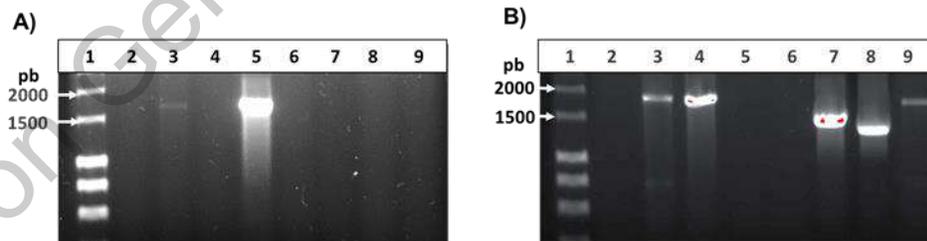


Figura 8. PCR de colonias en gel de agarosa al 1% con GelRed™. A) Colonias transformadas con el gen *enolasa* de *B. bovis* aislado de Tepic (1) Marcador de talle molecular, (2) control negativo, (3) control positivo ADN de *B. bovis*. (4) colonia 1, (5) colonia 2, (6) colonia 3, (7) colonia 4, (8) colonia 5, (9) colonia 6. B) Colonias transformadas con el gen *enolasa* de *B. bovis* aislado de Michoacán (1) Marcador de talle molecular, (2) control negativo, (3) control positivo ADN de *B. bovis*. (4) colonia 1, (5) colonia 2, (6) colonia 3, (7) colonia 4, (8) colonia 5, (9) colonia 6.

6.5 Secuenciación del gen *enolasa* de *B. bovis*.

Del DNA plasmídico de la colonia 2 transformada con “TOPO+*EnoBbovT*” enviado a secuenciar por duplicado, se obtuvieron 7 electroferogramas: 2 correspondientes a la secuenciación con el oligonucleótido “T7 primer”, 2 al “M13/puc Reverse”, 2 al “EnoFw2” y una al “EnoRv2”. Del DNA plasmídico de las colonias 1 y 6 transformadas con “TOPO+*EnoBbovM*” se obtuvieron 8 electroferogramas: 2 correspondientes a la secuenciación con el oligonucleótido “T7 primer”, 2 al “M13/puc Reverse”, 2 al “EnoFw2” y 2 al “EnoRv2”. Una vez analizados los electroferogramas y habiendo eliminado las secuencias correspondientes al vector TOPO, se lograron ensamblar las 2 secuencias del gen *enoBbov* de los aislados de *B. bovis* de Tepic y Michoacán. El alineamiento de estas secuencias y la correspondiente a la secuencia del mismo gen encontrada en el cromosoma III de la cepa T2Bo se muestra en la Figura 9.

B.bovisTepic	1	ATGGCAACTATCAAATCTGTTACAGCTCGCGAAATTCTCGGTAAGGCACATCAAATCTTG
B.bovisT2Bo	1	ATGGCAACTATCAAATCTGTTACAGCTCGCGAAATTCTCGGTAAGGCCTATTAATCTTG
B.bovisMichoaca	1	ATGGCAACTATCAAATCTGTTACAGCTCGCGAAATTCTCGGTAAGGCCTATTAATCTTG
B.bovisTepic	61	ATATACATACGCAACAGACTCCCGTGGTAATCCACTGTGGAAGTGGATCTCACCACCGT
B.bovisT2Bo	61	ATATATGCATTCAACAGACTCTCGTGGTAATCCAAGTGTGCAAGTTGATATCACCACGT
B.bovisMichoaca	61	ATATATGCATTCAACAGACTCTCGTGGTAATCCAAGTGTGCAAGTTGATATCACCACGT
B.bovisTepic	121	TGACGGTCTCTTCAGAGCCGCTTGCCCATCTGGCGCTTCCACGGTATCTACGAAGCCCT
B.bovisT2Bo	121	TGACGGTCTCTTCAGAGCCGCTTGCCCATCTGGCGCTTCCACTGGTATCTACGAAGCCCT
B.bovisMichoaca	121	TGACGGTCTCTTCAGAGCCGCTTGCCCATCTGGCGCTTCCACTGGTATCTACGAAGCCCT
B.bovisTepic	181	GGAGCTCCGTGATGGTGACAAGGCTCGTTCTTGGGTAAGGGTGTGTTGAAGGCTGTTGC
B.bovisT2Bo	181	GGAGCTCCGTGATGGCGACAAGGTCGTTACTTGGGTAAGGGTGTGTTGAAGGCTGTTGC
B.bovisMichoaca	181	GGAGCTCCGTGATGGCGACAAGGCTCGTTACTTGGGTAAGGGTGTGTTGAAGGCTGTTGC
B.bovisTepic	241	CAACGTCAATTCTACCCTCGCCAGTGGAGTTACCGGCCATGATGCCACCAGACAAAGGTG
B.bovisT2Bo	241	CAACGTCAATTCTACCCTCGCCAGTGGAGTTACCGGCCATGATGCCACCAGACAAAGGTG
B.bovisMichoaca	241	CAACGTCAATTCTACCCTCGCCAGTGGAGTTACCGGCCATGATGCCACCAGACAAAGGTG
B.bovisTepic	301	TTTGGATGACTACATGGTAAAACTCTTGATGGCAGTGAAAATGAATGGGGATACTGCAA
B.bovisT2Bo	301	TTTGGATGACTACATGGTAAAACTCTTGATGGCAGTGAAAATGAATGGGGATACTGCAA
B.bovisMichoaca	301	TTTGGATGACTACATGGTAAAACTCTTGATGGCAGTGAAAATGAATGGGGATACTGCAA
B.bovisTepic	361	GTCTAAGCTAGGTGCTAACGCAATTCTAGTAGTTCCATGGCTGCTGCCAGGGCCGCTGC
B.bovisT2Bo	361	GTCTAAGCTAGGTGCTAACGCAATTCTAGTAGTTCCATGGCTGCTGCCAGGGCCGCTGC
B.bovisMichoaca	361	GTCTAAGCTAGGTGCTAACGCAATTCTAGTAGTTCCATGGCTGCTGCCAGGGCCGCTGC
B.bovisTepic	421	TGCACACAAAAAGATTCTCTCTACCAACACCTGGCTGAACTAGCTGGCAAACCAACCGA
B.bovisT2Bo	421	TGCACACAAAAAGATTCTCTCTACCAACACCTGGCTGAACTAGCTGGCAAACCAACCGA
B.bovisMichoaca	421	TGCACACAAAAAGATTCTCTCTACCAACACCTGGCTGAACTAGCTGGCAAACCAACCGA
B.bovisTepic	481	CAAGTACATGCTCCCAGTCCATGCCTTAATGTCATTAACGGTGGTTCACACGCTGGAAA
B.bovisT2Bo	481	CAAGTACATGCTCCCAGTCCATGCCTTAATGTCATTAACGGTGGTTCACACGCTGGAAA
B.bovisMichoaca	481	CAAGTACATGCTCCCAGTCCATGCCTTAATGTCATTAACGGTGGTTCACACGCTGGAAA
B.bovisTepic	541	CAGCTTGGCCATGCAAGAATTCATGATCCTTCCAGTTGGTGCTCCCAGCTTCAAGGAGGC
B.bovisT2Bo	541	CAGCTTGGCCATGCAAGAATTCATGATCCTTCCAGTTGGTGCTCCCAGCTTCAAGGAGGC
B.bovisMichoaca	541	CAGCTTGGCCATGCAAGAATTCATGATCCTTCCAGTTGGTGCTCCCAGCTTCAAGGAGGC
B.bovisTepic	601	CATCCGCATGGGATGTGAAGTCTACCACAACCTTAAGAAGGTTATTAACGCCAAATATGG
B.bovisT2Bo	601	CATCCGCATGGGATGTGAAGTCTACCACAACCTTAAGAAGGTTATTAACGCCAAATATGG
B.bovisMichoaca	601	CATCCGCATGGGATGTGAAGTCTACCACAACCTTAAGAAGGTTATTAACGCCAAATATGG
B.bovisTepic	661	ACAGGATGCTACTAATGTTGGTGATGAAGGTGGTTTTGCCCAATATCAAGTCAGCTGA
B.bovisT2Bo	661	ACAGGATGCTACTAATGTTGGTGATGAAGGTGGTTTTGCCCAATATCAAGTCAGCTGA
B.bovisMichoaca	661	ACAGGATGCTACTAATGTTGGTGATGAAGGTGGTTTTGCCCAATATCAAGTCAGCTGA

B.bovisTepic	721	AGAAGCACTTGACCTCTGGTGGAAATCCATCAAGAAAGCTGGATTTGAAGGTCAGGTCAA
B.bovisT2Bo	721	AGAAGCACTTGACCTCTGGTGGAAATCCATCAAGAAAGCTGGATTTGAAGGTCAGGTCAA
B.bovisMichoaca	721	AGAAGCACTTGACCTCTGGTGGAAATCCATCAAGAAAGCTGGATTTGAAGGTCAGGTCAA
B.bovisTepic	781	GATTGGTATGGATGTCGCCGCCTCAGAGTTCTATGTTAAGGAGTCCAAATCATAACAATTT
B.bovisT2Bo	781	GATTGGTATGGATGTCGCCGCCTCAGAGTTCTATGTTAAGGAGTCCAAATCATAACAATTT
B.bovisMichoaca	781	GATTGGTATGGATGTCGCCGCCTCAGAGTTCTATGTTAAGGAGTCCAAATCATAACAATTT
B.bovisTepic	841	GGGATTCAAATGCGAAACTCCTAACATGAAGTCTGGTGCCGAGATGGTTGCCTACTACAA
B.bovisT2Bo	841	GGGATTCAAATGCGAAACTCCTAACATGAAGTCTGGTGCCGAGATGGTTGCCTACTACAA
B.bovisMichoaca	841	GGGATTCAAATGCGAAACTCCTAACATGAAGTCTGGTGCCGAGATGGTTGCCTACTACAA
B.bovisTepic	901	GGACTTGTGCCAGAGTACCCAAATTGTCTCTATTGAGGACCCCTTCGACCAGGATGACTG
B.bovisT2Bo	901	GGACTTGTGCCAGAGTACCCAAATTGTCTCTATTGAGGACCCCTTCGACCAGGATGACTG
B.bovisMichoaca	901	GGACTTGTGCCAGAGTACCCAAATTGTCTCTATTGAGGACCCCTTCGACCAGGATGACTG
B.bovisTepic	961	GGAAGCATAACCTTGATCACTAAGGAGATTGGAGACAAGTTTCAGATCGTTGGTGATGA
B.bovisT2Bo	961	GGAAGCATAACCTTGATCACTAAGGAGATTGGAGACAAGTTTCAGATCGTTGGTGATGA
B.bovisMichoaca	961	GGAAGCATAACCTTGATCACTAAGGAGATTGGAGACAAGTTTCAGATCGTTGGTGATGA
B.bovisTepic	1021	CTTGCTCGTTACTAACCCCTAAGCGTATCCAGACCGCCTTGGACAAGAAAGCTTGCAACGC
B.bovisT2Bo	1021	CTTGCTCGTTACTAACCCCTAAGCGTATCCAGACCGCCTTGGACAAGAAAGCTTGCAACGC
B.bovisMichoaca	1021	CTTGCTCGTTACTAACCCCTAAGCGTATCCAGACCGCCTTGGACAAGAAAGCTTGCAACGC
B.bovisTepic	1081	CCTCTTGTGAAGGTTAACCAATTGGTTCGGTAAGCGAAGCTATCGATGCCTGCGTCTCT
B.bovisT2Bo	1081	CCTCTTGTGAAGGTTAACCAATTGGTTCGGTAAGCGAAGCTATCGATGCCTGCGTCTCT
B.bovisMichoaca	1081	CCTCTTGTGAAGGTTAACCAATTGGTTCGGTAAGCGAAGCTATCGATGCCTGCGTCTCT
B.bovisTepic	1141	TAGCCACAAGAACAACCTGGGGTGTGATGGTATCTCACAGGCTGGTGAAACCCGAGATAC
B.bovisT2Bo	1141	TAGCCACAAGAACAACCTGGGGTGTGATGGTATCTCACAGGCTGGTGAAACCCGAGATAC
B.bovisMichoaca	1141	TAGCCACAAGAACAACCTGGGGTGTGATGGTATCTCACAGGCTGGTGAAACCCGAGATAC
B.bovisTepic	1201	GTTCAATTGCTGACCTTGTAGTAGCACTCGGAACCGGTCAAATCARGACCGGCGCTCCATG
B.bovisT2Bo	1201	GTTCAATTGCTGACCTTGTAGTAGCACTCGGAACCGGTCAAATCARGACCGGCGCTCCATG
B.bovisMichoaca	1201	GTTCAATTGCTGACCTTGTAGTAGCACTCGGAACCGGTCAAATCARGACCGGCGCTCCATG
B.bovisTepic	1261	CCGCAGTGAAGAAATGCCAAATACAACCAAGTTGATCCGCATTGAGGAAGAACTTGGATC
B.bovisT2Bo	1261	CCGCAGTGAAGAAATGCCAAATACAACCAAGTTGATCCGCATTGAGGAAGAACTTGGATC
B.bovisMichoaca	1261	CCGCAGTGAAGAAATGCCAAATACAACCAAGTTGATCCGCATTGAGGAAGAACTTGGATC
B.bovisTepic	1321	ACGCGCTTCTTACGCTGGTGTGCTGCATTCCGCACCTGTGCCAGTAA
B.bovisT2Bo	1321	ACGCGCTTCTTACGCTGGTGTGCTGCATTCCGCACCTGTGCCAGTAA
B.bovisMichoaca	1321	ACGCGCTTCTTACGCTGGTGTGCTGCATTCCGCACCTGTGCCAGTAA

Figura 9. Alineamiento de las secuencias del gen *enolasa* de *B. bovis* de los aislados de Tepic, Michoacán y de la cepa T2Bo (NCBI:AAXT0100001.1).

6.6 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas del gen y la proteína Enolasa e identificación de péptidos con epítomos B.

Tras los análisis bioinformáticos se obtuvieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los aislados de *B. bovis* de Tepic y Michoacán, resultando en ambos casos secuencias de 442 aminoácidos. La proteína Enolasa del aislado de Tepic tiene una identidad del 98.64% con la misma proteína de la cepa T2Bo, mientras que la identidad del aislado de Michoacán con la de la cepa T2Bo es del 99.77% y con la de Tepic es del 98.87%. La matriz de identidad de las secuencias antes mencionadas más la correspondiente a la de *B. bigemina* (código de acceso GenBank: QEG79394.1) obtenida con ayuda del servidor Clustal Omega se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Matriz de porcentaje de identidad entre diferentes secuencias de la proteína enolasa de *B. bovis* y la secuencia de la proteína enolasa de *B. bigemina*.

	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i> Tepic	<i>B. bovis</i> T2Bo	<i>B. bovis</i> Michoacán
<i>B. bigemina</i>	100.00%	87.78%	88.01%	88.24%
<i>B. bovis</i> Tepic	87.78%	100.00%	98.64%	99.87%
<i>B. bovis</i> T2Bo	88.01%	98.64%	100.00%	99.77%
<i>B. bovis</i> Michoacán	88.24%	98.87%	99.77%	100.00%

El peso molecular de la proteína Enolasa de cada aislado es de 47.73 kDa y su punto isoeléctrico es de 5.98. Se predijo que la proteína enolasa no posee péptido señal ni regiones transmembranales (Figura 10). Los dominios de proteínas identificados corresponden a otras proteínas enolasa reportadas, los cuales fueron "Enolase_N" que inicia en la posición 4 y termina en la 139 de la secuencia y

“Enolase_C” que inicia en la posición 149 y termina en la 444 de la secuencia, donde adicionalmente se identificó el dominio de Barril TIM

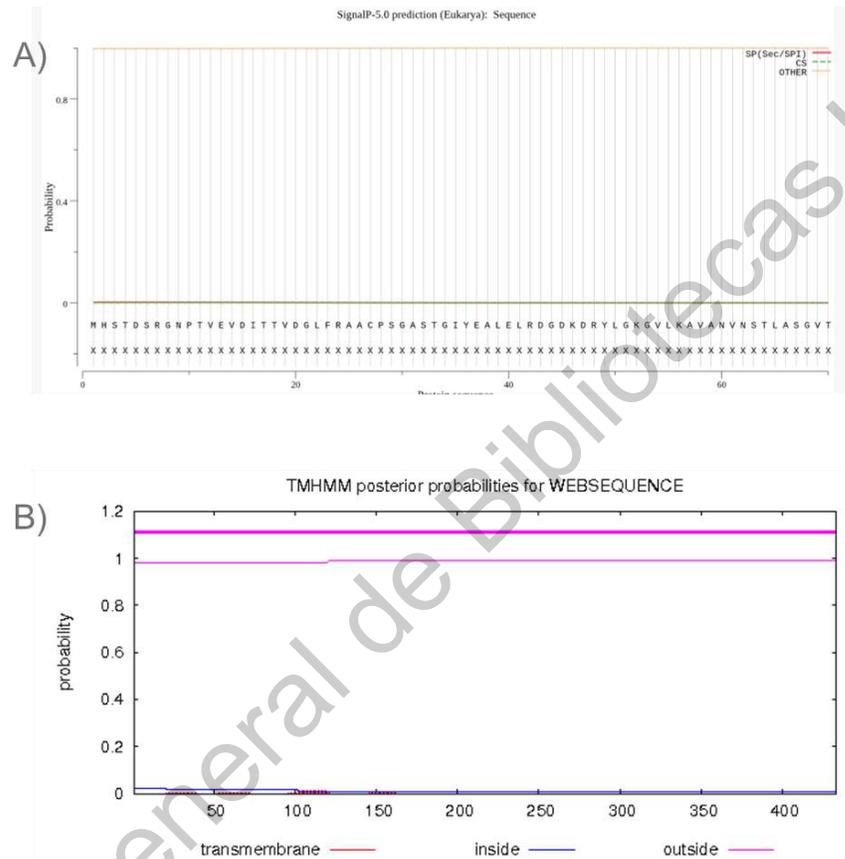


Figura 10. Análisis bioinformáticos de la proteína Enolasa de *B. bovis*. A) gráfico obtenido del servidor SignalP donde no se predice péptido señal en la secuencia de aminoácidos de la proteína. B) gráfico obtenido del servidor TMHMM donde no se predicen regiones transmembranales.

Se identificaron 2 péptidos con epítomos B, los cuales fueron nombrados ENOL-1 y ENOL-2. Todos los programas bioinformáticos excepto ABCpred predicen epítomos B en las regiones donde se encuentran los péptidos seleccionados. En el Cuadro 6 se especifican las características de cada péptido y los programas bioinformáticos que identificaron epítomos B en los péptidos.

Cuadro 6. Características de los péptidos de la proteína Enolasa de *B. bovis* seleccionados para síntesis.

	ENOL-1	ENOL-2
Secuencia	VKESKSYNLGFKCETPNMKSGAEM	AHKKIPLYQHLAELAGKPTDKYM
Longitud	24	23
Posición en la secuencia	260-283	129-151
Identificación de epítotos B por programas bioinformáticos		
BCEpred: Hidrofilicidad	✓	✓
BCEpred: Flexibilidad	✓	✓
BCEpred: Accesibilidad	✓	✓
BCEpred: Superficie expuesta	✓	✓
BCEpred: Polaridad	✓	✓
BCEpred: Propensidad antigénica		✓
ABCpred		
BepiPred	✓	✓
IEDB	✓	✓

En la Figura 11 se presenta el alineamiento de las secuencias de la proteína Enolasa de *B. bovis* de los aislados de Tepic y Michoacán, el correspondiente a la cepa T2Bo y la secuencia de la misma proteína de *B. bigemina* además de la localización de los péptidos seleccionados para síntesis y los dominios de proteínas identificados.

B. bigemina	MASITSIHAREILDSRGNPTVEVDLATADGVFRAACPSGASTGIYEAELELRDGDKARYLG	60
B. bovisTepic	MATIKSVHAREILDSRGNPTVEVDLTTVDGLFRAACPSGASTGIYEAELELRDGDKARFLG	60
B. bovisT2Bo	MATIKSVHAREILDSRGNPTVEVDITTVDGLFRAACPSGASTGIYEAELELRDGDKDRYLG	60
B. bovisMichoacán	MATIKSVHAREILDSRGNPTVEVDITTVDGLFRAACPSGASTGIYEAELELRDGDKARYLG	60
	:*. :**:*. :*. :*****:***** *;*	
B. bigemina	KGVLKAVNNVNTTIAAGVKGHDVRDQKGLDDLMVKKLDGSMNEWHGCKSNLGANAILVVS	120
B. bovisTepic	KGVLKAVANVNSTLASGVTGHDATRQRCLDDYMKVTLDGSENEWGYCKSKLGANAILVVS	120
B. bovisT2Bo	KGVLKAVANVNSTLASGVTGHDATRQRCLDDYMKVTLDGSENEWGYCKSKLGANAILVVS	120
B. bovisMichoacán	KGVLKAVANVNSTLASGVTGHDATRQRCLDDYMKVTLDGSENEWGYCKSKLGANAILVVS	120
	***** **;*. :*. :*. :*. :*. :* **	
B. bigemina	MAAARAAE SKKVPLYQH LAELAGKPTD NYILPVPCLVINGGSHAGNSLAMQEFMILPV	180
B. bovisTepic	MAAARAAAHKKIPLYQH LAELAGKPTDKYLPAPCLNVINGGSHAGNSLAMQEFMILPV	180
B. bovisT2Bo	MAAARAAAHKKIPLYQH LAELAGKPTDKYLPVPCLVINGGSHAGNSLAMQEFMILPV	180
B. bovisMichoacán	MAAARAAAHKKIPLYQH LAELAGKPTDKYLPVPCLVINGGSHAGNSLAMQEFMILPV	180
	***** **;*. :*****:*****:*****:*****:*****:*****	
B. bigemina	GAPSFKEAIRMGCEVYHNLKVINAKYQDATNVGDEGGFAPNIKSAEAEALDLLVESIKK	240
B. bovisTepic	GAPSFKEAIRMGCEVYHNLKVINAKYQDATNVGDEGGFAPNIKSAEAEALDLLVESIKK	240
B. bovisT2Bo	GAPSFKEAIRMGCEVYHNLKVINAKYQDATNVGDEGGFAPNIKSAEAEALDLLVESIKK	240
B. bovisMichoacán	GAPSFKEAIRMGCEVYHNLKVINAKYQDATNVGDEGGFAPNIKSAEAEALDLLVESIKK	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
B. bigemina	AGFDGQVKIAMDVAASEFYVKESSSYNLGFKCEQPCMKSGPEMVAYYKELCQKYPIVSIE	300
B. bovisTepic	AGFEGQVKIGMDVAASEFYVKESSSYNLGFKCETPNMKSGAEMVAYYKDLQCQKYPIVSIE	300
B. bovisT2Bo	AGFEGQVKIGMDVAASEFYVKESSSYNLGFKCETPNMKSGAEMVAYYKDLQCQKYPIVSIE	300
B. bovisMichoacán	AGFEGQVKIGMDVAASEFYVKESSSYNLGFKCETPNMKSGAEMVAYYKDLQCQKYPIVSIE	300
	:**:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
B. bigemina	DPFDQDDWEAYTLITKEIGDRAVQIVGDDLLVTPNPKRIETALDKKACNALLKVNQIGSVT	360
B. bovisTepic	DPFDQDDWEAYTLITKEIGDRVQIVGDDLLVTPNPKRIQTALDKKACNALLKVNQIGSVS	360
B. bovisT2Bo	DPFDQDDWEAYTLITKEIGDKVQIVGDDLLVTPNPKRIQTALDKKACNALLKVNQIGSVS	360
B. bovisMichoacán	DPFDQDDWEAYTLITKEIGDKVQIVGDDLLVTPNPKRIQTALDKKACNALLKVNQIGSVS	360
	*****:*. :*. :*. :* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
B. bigemina	EADACLSSHANSWGMVSHRSGETEDTFIADLVVALGTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLI	420
B. bovisTepic	EADACVLSHKNNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVALGTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLI	420
B. bovisT2Bo	EADACVLSHKNNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVALGTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLI	420
B. bovisMichoacán	EADACVLSHKNNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVALGTGQIKTGAPCRSERNAKYNQLI	420
	*****:***^ ^	
B. bigemina	RIEELGSRARYAGAAFRTCGN	442
B. bovisTepic	RTEELGSRASYAGAAFRTCAQ	442
B. bovisT2Bo	RTEELGSRASYAGAAFRTCAQ	442
B. bovisMichoacán	RTEELGSRASYAGAAFRTCAQ	442
	:** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	



Figura 11. Alineamiento de las secuencias de la proteína Enolasa de *B. bovis* de los aislados de Tepic, Michoacán, la cepa T2Bo y de *B. bigemina*. El alineamiento se realizó con la herramienta Clustal Omega. Se representan también los dominios de proteína reconocidos mediante bioinformática resaltado en amarillo el dominio “Enolase-N”, en azul el dominio “Enolase-C”. Así también se muestra la localización de los péptidos seleccionados para síntesis, dentro del recuadro rojo el péptido “ENOL-2” y dentro del recuadro azul el péptido “ENOL-1”.

6.7 Generación y titulación de anticuerpos anti-péptidos

Tras pruebas de ELISA realizadas se determinó que se generaron anticuerpos contra cada uno de los péptidos desde la primera inmunización en dilución 1:2,000 (Figura 12). La quinta y última inmunización a los conejos 5 y 16 con el péptido ENOL-1 generaron títulos de anticuerpos de 1:128,000 y 1:256,000 respectivamente (Figura 13, Paneles A y B) y de los conejos 9 y 15 inmunizados con el péptido ENOL-2 se generaron títulos de anticuerpos de 1:512,000 en ambos casos (Figura 14, Paneles A y B). El conejo 2 (control) no mostró títulos de anticuerpos contra ninguno de los péptidos (Panel C de las Figuras 13 y 14).

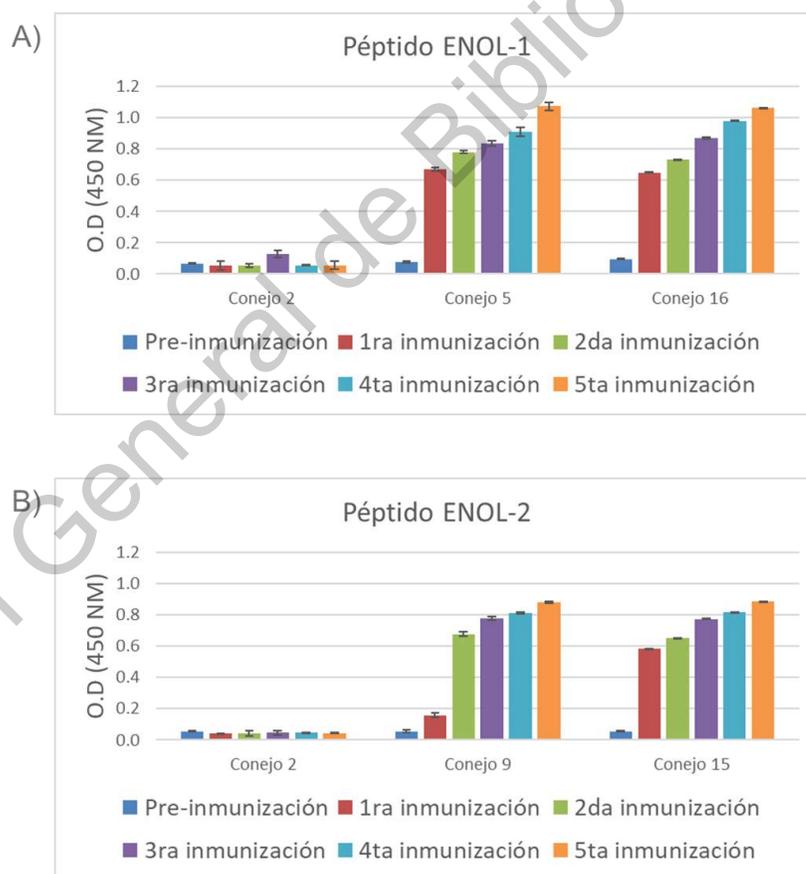


Figura 12. Gráficas de determinación de generación de anticuerpos. En el panel A se muestran los resultados de cada una de las inmunizaciones con el péptido ENOL-1. En el panel B se muestran los resultados de cada una de las inmunizaciones con el péptido ENOL-2.

Titulación de anticuerpos contra el péptido ENOL-1

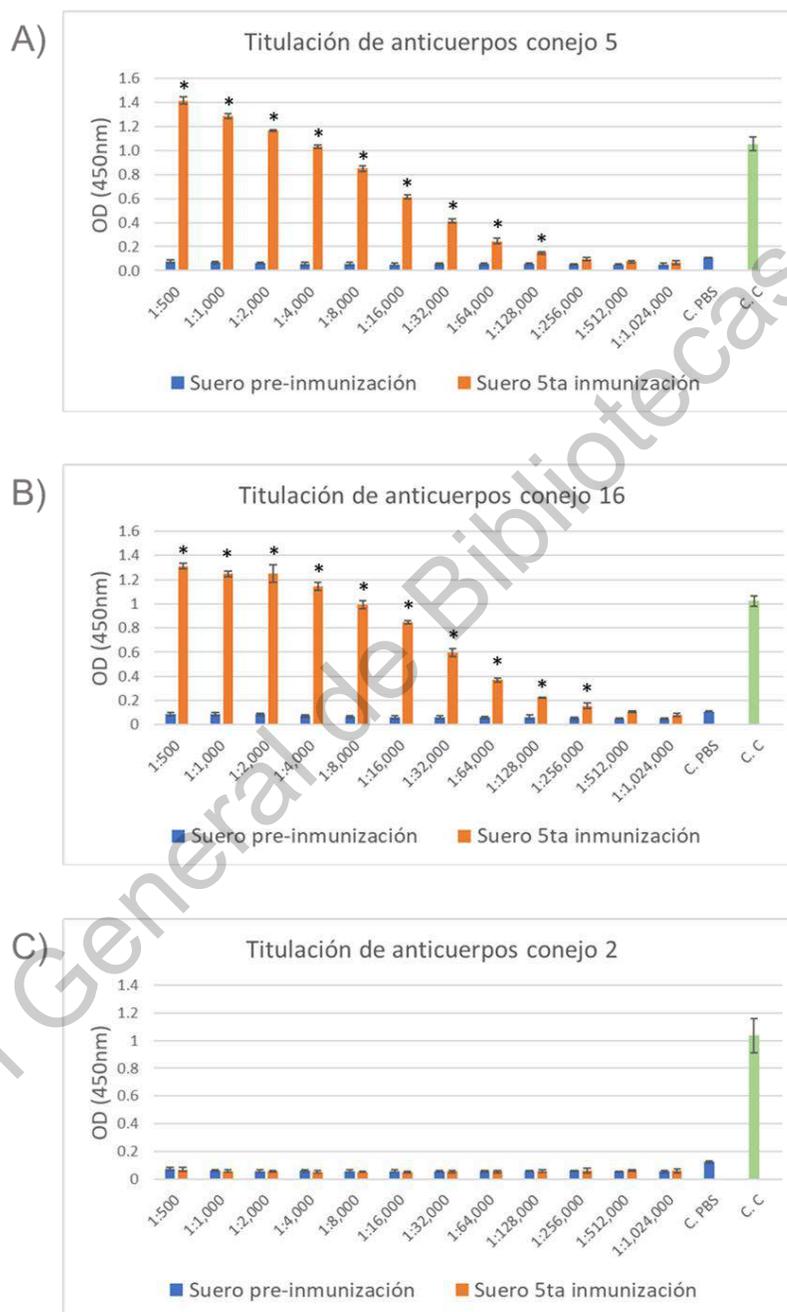


Figura 13. Graficas de titulación de anticuerpos contra péptido ENOL-1. En los paneles A, B y C se muestran las diferentes diluciones del suero de los conejos inmunizados y el conejo control. Se señalan con * las diluciones con diferencia estadísticamente significativa entre el suero pre-inmunización y 5ta inmunización ($P < 0.05$). C.PBS= control de PBS. C.C: control de conjugado.

Titulación de anticuerpos contra el péptido ENOL-2

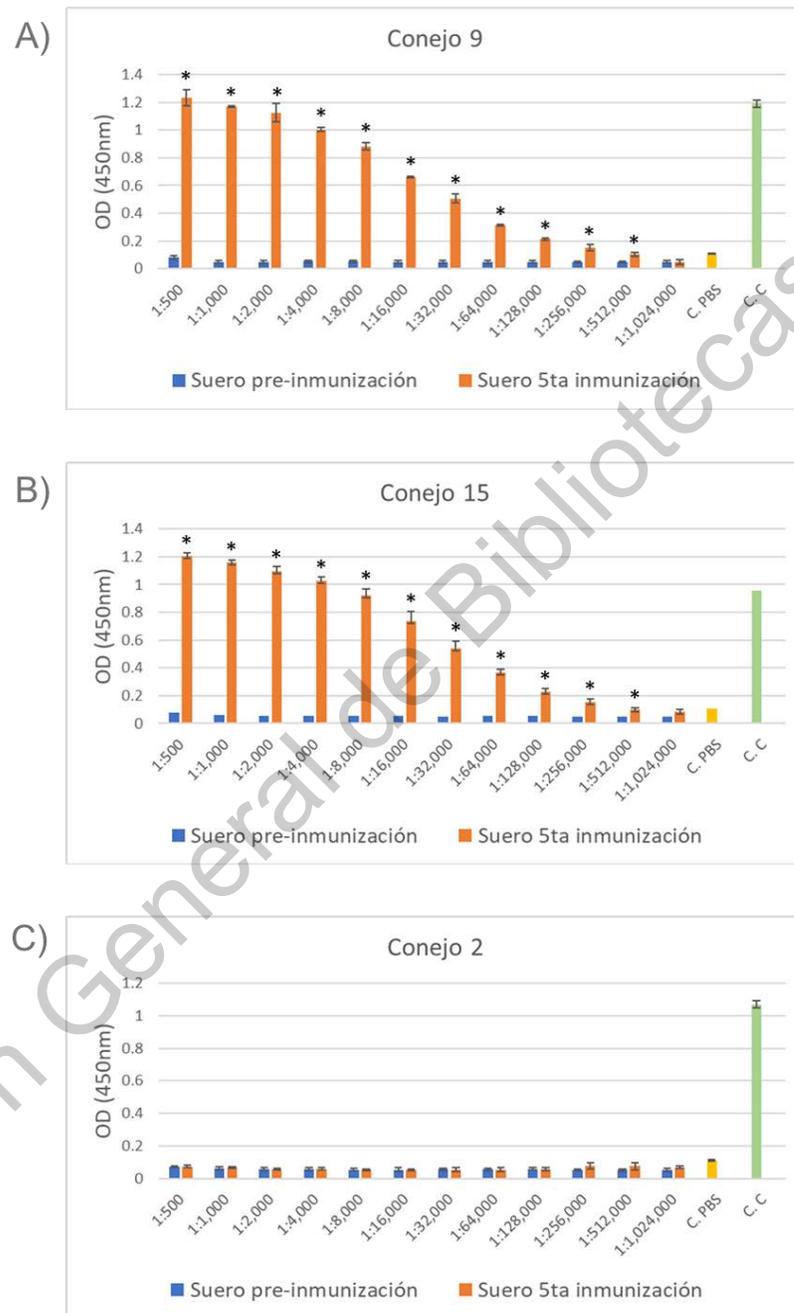


Figura 14. Graficas de titulación de anticuerpos contra el péptido ENOL-2. En los paneles A, B y C se muestran las diferentes diluciones del suero de los conejos inmunizados y el conejo control. Se señalan con * las diluciones con diferencia estadísticamente significativa entre el suero pre-inmunización y 5ta inmunización ($P < 0.05$). C.PBS= control de PBS. C.C: control de conjugado.

6.8 Determinación de la expresión de la proteína Enolasa de *B. bovis* con anticuerpos anti-péptidos.

Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados con los péptidos fueron capaces de señalar a los merozoitos de eritrocitos infectados con *B. bovis* (Figura 15, Paneles A y E) de forma similar al control positivo (Figura 15, Panel M). Los sueros pre inmunización de todos los conejos y el post inmunización del conejo control no mostraron señal (Figura 15, Paneles C y G).

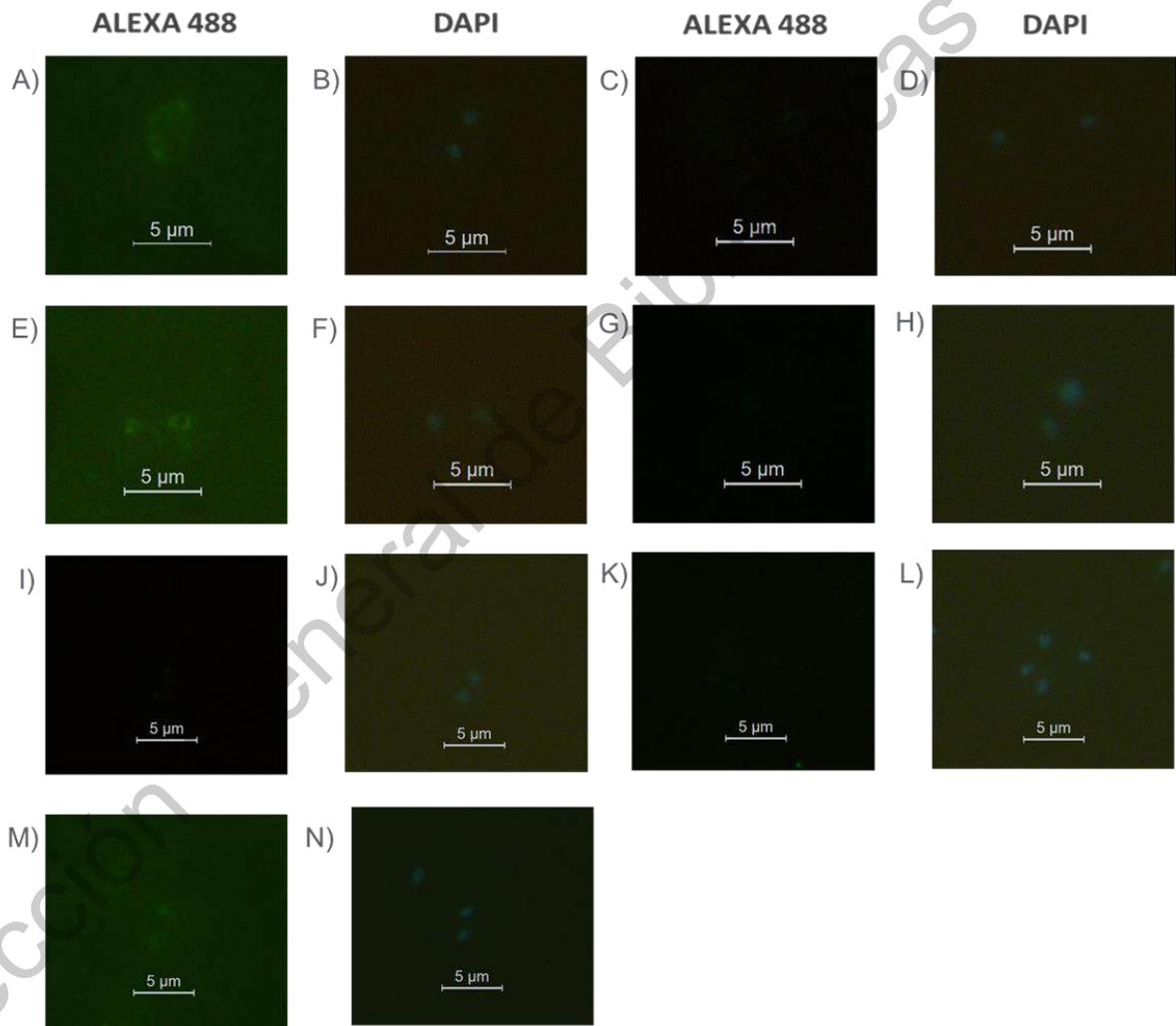


Figura 15. Inmunofluorescencias indirectas de *B. bovis*. Paneles A y B suero 5ta inmunización del conejo 5, C y D suero pre-inmunización conejo 5. Paneles E y F suero 5ta inmunización conejo 15, G y H suero pre-inmunización conejo 15. Paneles I y J suero 5ta inmunización conejo 2, K y L suero pre-inmunización conejo 2. Paneles M y N suero de conejo inmunizado con la enolasa recombinante de *B. bigemina*.

VII. Discusión

Anteriormente se ha estudiado a la proteína Enolasa en diversos patógenos como candidato vacunal. Por estudios previos se tiene conocimiento de que otros organismos del género *Babesia* tienen de forma funcional el gen *enolasa*, sin embargo, no se había comprobado de forma experimental su presencia en *B. bovis*; por lo tanto, los primeros objetivos del presente proyecto fueron demostrar la presencia del gen y evaluar su expresión a nivel de transcrito.

A partir de la secuenciación del gen en los dos diferentes aislados de *B. bovis* y su posterior análisis bioinformático se encontró que este organismo posee un gen de 1,366 pb localizado en el cromosoma 3. El gen presenta un intrón en la parte inicial de éste y codifica una proteína de 422 aminoácidos y 47.73 KDa a la cual no se le predice péptido señal ni regiones transmembranales. Lo anterior es comparable con los resultados obtenidos por Liu y otros en 2017, donde caracterizan la enolasa de *B. microti*, donde reportan un gen de 1,317 pb, que codifica a una proteína soluble de 438 aminoácidos, 47.5 KDa y no presenta péptido señal ni regiones transmembranales. Así también presenta similitudes importantes con la enolasa de otro organismo apicomplexa, *P. falciparum*, cuyo gen tiene una longitud de 1,342 pb y codifica a una proteína de 446 aminoácidos y 48.7 KDa. (Liu et al 2017, Read, et al, 1994). A pesar de que el gen *enolasa* de *B. bovis* es un poco más largo que sus homólogos en *P. falciparum* y *B. microti*, la proteína a la que codifica es de menos aminoácidos, esto puede deberse a la longitud del intrón que presenta el gen.

Los alineamientos realizados revelaron que las secuencias de la proteína Enolasa de la cepa T2Bo y los aislados de *B. bovis* de Tepic y Michoacán tienen una identidad de más del 98% entre ellas y tienen hasta de un 87% de identidad con la misma proteína de *B. bigemina*. Adicionalmente, los péptidos seleccionados para síntesis difieren solo en 5 aminoácidos con la misma secuencia en *B. bigemina* lo que podría significar que al usarse como inmunógenos, puedan tener efecto en ambas especies.

Se logró comprobar la expresión de la proteína enolasa en merozoitos de *B. bovis* con ayuda del suero de conejos inmunizados con péptidos de la proteína enolasa mediante inmunofluorescencia indirecta, lo cual representa los dos últimos objetivos del proyecto. El uso de péptidos sintéticos para inmunizar conejos y/o bovinos y que los anticuerpos generados sean capaces de reconocer a merozoitos de *Babesia*, se ha llevado a cabo con anterioridad, con péptidos de las proteínas AMA-1 y RON-2 de *B. bovis* (Gaffar *et al.*, 2004, Hidalgo-Ruiz *et al.*, 2018; Barreda *et al.*, 2019) y de MIC-1 de *B. bigemina* (Hernández-Silva *et al.*, 2018). Además, se ha evaluado la capacidad de estos péptidos para generar anticuerpos que neutralicen la invasión de *Babesia* a los eritrocitos. Por lo anterior se puede suponer que los presentes péptidos tienen probabilidad de inhibir la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos, pues fueron seleccionados con estrategias similares a los antes mencionados.

Se sabe que todos los organismos que usan la glucosa como fuente de energía requieren de la enolasa para su metabolismo, sin embargo, se ha encontrado que la enolasa se expresa no solo en el citoplasma, también se le ha observado en la superficie de diversas células eucariotas y funciona como fuerte receptor de unión a plasminógeno (Pancholi, 2001; Diaz-Ramos *et al.*, 2012). Se desconoce el mecanismo por el cual la enolasa se transloca a la superficie celular, ya que carece de un péptido señal que la dirija a la membrana citoplasmática para poder excretarse, pero se sabe que esta enolasa de superficie es importante para la fibrinólisis e invasión intracelular pues diversos patógenos son capaces de usar la enolasa como mecanismo de invasión (Pancholi, 2001; Liu & Shih, 2007).

Con la presente demostración de la expresión de esta proteína en estadios sanguíneos de *B. bovis* es recomendable hacer los siguientes experimentos complementarios para demostrar:

- La capacidad de los anticuerpos anti-péptidos de neutralizar la invasión de *B. bovis* a los eritrocitos.

- La actividad enzimática de la proteína enolasa de *B. bovis* de catalizar la deshidratación de ácido 2- fosfoglicérico a fosfoenolportuvato y su capacidad de unirse al plasminógeno bovino.
- Su expresión en estadios sexuales en el intestino de su vector.
- La generación de anticuerpos anti-enolasa en infecciones naturales tanto de *B. bovis* como de *B.bigemina*.
- El efecto de los anticuerpos anti-péptidos en el ciclo de vida de *Babesia* dentro de la garrapata.

Los experimentos antes mencionados catalogarían a la enolasa de este parásito como un importante candidato vacunal, al representar un antígeno presente en sus dos fases infectivas.

VIII. Conclusiones

Se demostró la presencia y funcionalidad del gen *enolasa* de *B. bovis*, el cual codifica a una proteína de 422 aminoácidos y 47.73 KDa. la cual posee péptidos con epítomos B, los cuales son capaces de generar anticuerpos que reconocen a la proteína enolasa dentro de merozoitos de *B. bovis*. Lo anterior confirma la hipótesis de este trabajo. A partir de esto se propone continuar con la investigación de las funciones enzimáticas de la proteína, su presencia en estadios sexuales del parásito y análisis de neutralización *in vitro*.

Dirección General de Bibliotecas UNAM

IX. Bibliografía

- Abbas, R., Zaman, M., Colwell, D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary parasitology*, 203, 6-20.
- Baravalle, M., Thompson, C., Torioni de Echaide, S., Palacios, C., Valentini, B., Suarez, C., . . . Echaide, I. (2010). The novel protein BboRhop68 is expressed by intraerythrocytic stages of babesia bovis. *Parasitol In* , 59, 571-578.
- Barreda, D., Hidalgo-Ruiz, M., Hernández-Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo-Velasco, E., & Mosqueda, J. (2019). Identification of conserved peptides containing B-cell epitopes of Babesia bovis AMA-1 and their potential as diagnostics candidates. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 60-68.
- Baruch, A., & Louis, W. (2014). *Parasitología Humana*. México: McGraw hill.
- Bock, R. E., De Vos, A. J., Kingston, T., Shiels, I. A., & Dalgliesh, R. J. (1992). Investigations of breakdowns in protection provided by living Babesia bovis vaccine. *Veterinary Parasitology*, 43(1-2), 45-56.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129S, S247-S269.
- Brown, W. N. (2006). Immune control of Babesia bovis infection. *Vet Parasitol*(138), 75-87.
- Center for Food Security & Public Health, I. S. (2008). Babesiosis Bovina. Ames, Iowa, USA. Recuperado el 24 de Septiembre de 2018, de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/bovine_babesiosis-es.pdf
- 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. *J Vet Res*, 40(37).
- Chen, N., Yuan, Z.-G., Xu, M.-j., Zhou, D.-H., Zhang, X.-X., Zhang, Y.-Z., . . . Zhu, X.-Q. (2012). Ascaris suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*, 30, 3478-3482.
- De Waal, D. T., & Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 88-96.
- Díaz-Ramos, Á., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., & López Alemani, R. (2012). α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.

- Figueroa, J. (2003). INVESTIGACIONES SOBRE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA BABELSIS BOVINA. *Ciencia Veterinaria*, 75-104.
- Gaffar, F., Yatsuda, A., Franssen, F., & de Vries, E. (2004). A Babesia bovis merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in Plasmodium sporozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 136, 45-34.
- Gállego, J. (2007). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Barcelona: Edicions Universitat.
- Goff, W., Storset, A., Johnson, W., & Brown, W. (2006). Bovine splenic NK cells synthesize IFN. *Parasite Immunol*, 28, 221-228.
- Gosh, A., & Jacobs-Lorena, M. (2011). Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(1), 85-90.
- Hamoda, A. R. (2014). Toxic Effect of Babesiosis in Cattle and Chemotherapeutic Treatment in Egypt. *ACS Infect Dis*, 2(5), 91-96.
- Henderson, B., & Martin, A. (2011). Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious Disease. *Infection and immunity*, 79(9), 3476-3491.
- Hernández-Silva, D. J., Valdez-Espinoza, U. M., Mercado-Uriostegui, M. A., Aguilar-Tipacamú, G., Aragón-Ramos, J. A., Hernández-Ortiz, R., . . . Mosqueda, J. (2018). Immunomolecular Characterization of MIC-1, a Novel Antigen in Babesia bigemina, Which Contains Conserved and Immunodominant B-Cell Epitopes that Induce Neutralizing Antibodies. *Veterinary Sciences*, 5(2), 32.
- Hidalgo-Ruiz, M., Suarez, C. E., Mercado-Uriostegui, M. A., Hernández-Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo-Velasco, E., . . . Mosqueda, J. (2018). Babesia bovis RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasites & Vectors*, 11(1), 575.
- Hussein, H., Bastos, R., Schneider, D., Johnson, W., Adham, F., Davis, W., . . . Suarez, C. (2017). The Babesia bovis hap2 gene is not required for blood stage replication, but expressed upon in vitro sexual stage induction. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(10).
- Jarori, G., & Moitra, A. (2017). Plasmodium spp. Enolase: A Housekeeping Protein with Complex Moonlighting Functions. *Adv Biotech & Micro*, 3(3).

- Levine N., C. J. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. *The journal of Protozoology banner*, 27(1), 37-58.
- Li, W., Hu, X., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., & Ashman, R. (2011). immunisation whit the glicolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*, 29, 5526-5533.
- Liu, K.-J., & Shih, N.-Y. (2007). The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of Cancer Molecules*, 3(2), 45-48.
- Liu, X., Zheng, C., Gao, X., Chen, J., & Zheng, K. (2017). Complete Molecular and Immuniprotective Characterizati3n of *Babesia microti* Enolase. *Frot. Microbiol*, 8.
- Liu, Y., Tewari, R., Ning, J., Andrew, B., Garbom, S., Pei, J., . . . Billker, O. (2015). The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment of fusogenic membranes in *Chlamydomonas* and *Plasmodium* gametes. *Genes dev*, 1051-1069.
- Marcelino, I., de Almeida, A. M., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D., Martinez, D., . . . Varela, A. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *Journal of proteomics*, 75, 4237-4250.
- Moharan, B., Wang, L., & Coppel, R. (2008). No TRAP, no invation. *Trends Parasitol*, 25(2), 77-84.
- Mosqueda, J., Figueroa, J., Alvarez, A., Bautista, R., Falcon, A., Ramos, A., . . . Vega, C. (2007). Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. *parassitologia*, 49, 19.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacam3, G., & Cant3, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Curr. Med. Chem.*, 19, 1504-1518.
- Mu3oz, T. (2016). Babesiosis bovina (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*) , una enfermedad hematozo3rica de importancia econ3mica en el mundo. *Centro de Biotecnolog3a*, 5(1), 21-30.
- Pal-Bhowmick, I., Mehta, M., Coppens, I., Sharma, S., & Gotam., J. (2007). Protective Properties and Surface Localization of *Plasmodium falciparum* Enolase. *Infect Immun*, 75(11), 5500-5508.
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional a-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(7), 902-920.

- Petrich, R. S. (2010). *Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales: Universidad de Buenos Aires.
- Quiroz, R. (2005). *Parasiología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México D.F: Editorial Limusa SA de CV.
- Read, M., Hicks, K., Sims, P., & Hyde, J. (1994). Molecular characterisation of the enolase gene from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eur. J. Biochem*, 220, 513-520.
- Ribas-Aparicio, R. M., Castelán-Vega, J. A., Jiménez-Alberto, Alicia, Monterrubio-López, G. P., & Aparicio-Ozores, G. (2017). The Impact of Bioinformatics on Vaccine Design and Development. En F. Afrin, H. Hemeg, & H. Ozbak (Edits.), *Vaccines* (págs. 123-146). Rijeka, Croatia: InTech.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Gris, L., Pérez de León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F., Fragoso Sánchez, H., . . . García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74.
- Schnittger, L., Rodriguez, A., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. (2012). Babesia: a world emerging. *Infect. Genet. Evol.*, 12, 1788-1809.
- Shoda, L., Palmer, G., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D., & Wendy, B. (2000). Babesia bovis-Stimulated Macrophages Express Interleukin-1b, Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide and Inhibit Parasite Replication In Vitro. *Infect Immun*, 68(9), 5139-5145.
- SIAP. (16 de Mayo de 2018). SAGARPA. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/indicadores-economicos>
- Sibley, D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, 592-598.
- Sibley, L. (2004). Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*, 304, 248-253.
- Terkawi, M., Ratthanophart, J., Salama, A., AbouLaila, M., Asada, M., Ueno, A., . . . Igarashi, I. (2013). Molecular Characterization of a New Babesia bovis Thrombospondin-Related Anonymous Protein (BbTRAP2). *PLoS ONE*, 8(12), 1-10.
- Tussaint, M. (1905). Piroplasma bigeminum en México. *Boletín Instituto Patológico, Estación Agrícola central.*, 1.
- Wright, I. G. (1988). Immunopathophysiology of Babesia bovis and Plasmodium falciparum infections. *Parasitol Today*, 4(8), 214-218.

Dirección General de Bibliotecas UAQ