



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

Análisis de la expresión del gen hap2 en fases sexuales de Babesia bigemina.

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

Presenta:
María Elena Paredes Martínez

Dirigida por:
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

_____	_____
Presidente	Firma
_____	_____
Secretario	Firma
_____	_____
Vocal	Firma
_____	_____
Suplente	Firma
_____	_____
Suplente	Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

Fecha
México

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad de impacto económico mundial que es transmitida por garrapatas. No hay vacunas contra esta enfermedad y un gen estudiado para desarrollar vacunas contra parásitos apicomplexos como *Plasmodium* spp., es el gen *hap2*, específico de fases sexuales. *Babesia* pertenece al mismo phylum, por lo que se hipotetiza que *hap2* está presente en su genoma y tiene función similar en las fases sexuales. Por lo cual el objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de *hap2* en fases sexuales de *Babesia bigemina*. Se identificó *hap2* de *Babesia bigemina* mediante la técnica de PCR. Se generaron anticuerpos en conejos contra un péptido sintético de HAP2. Se evaluó por inmunofluorescencia indirecta la expresión de HAP2 en fases sexuales de *Babesia bigemina* obtenidas de sangre de bovinos experimentalmente infectados. En bovinos naturalmente infectados con *Babesia bigemina* se evaluó con la técnica de ELISA indirecta si existían anticuerpos contra HAP2. Los resultados mostraron que anticuerpos contra HAP2 identificaron fases sexuales y fases asexuales de *B. bigemina*. Mientras que anticuerpos de bovinos infectados naturalmente no identificaron a HAP2. En conclusión, *hap2* se expresa en fases sexuales y asexuales de *Babesia bigemina* y puede tener más funciones que la reproducción sexual.

(Palabras clave: *Babesia bigemina*, *hap2*, fases sexuales)

ABSTRACT

Bovine babesiosis is an illness carried by ticks with an important economic impact. There are no vaccines against this illness and the sexual stages specific *hap2* gene has been widely studied to develop vaccines against apicomplexus parasites such as *Plasmodium* spp. Since *Babesia bigemina* belongs to the same phylum, it is believed that the *hap2* gene exists in its genome and has similar functions during its sexual stages. Therefore, the goal in this study is to evaluate the *hap2* expression during *Babesia bigemina* sexual stages. *Babesia bigemina*'s *hap2* was identified through PCR. Antibodies against a synthetic HAP2 peptide were generated in rabbits. *Hap2* expression during *Babesia bigemina* sexual stages in experimental infected bovine blood was evaluated through indirect immunofluorescence. In naturally infected bovines, antibodies against HAP2 were evaluated through indirect ELISA. The results show that the antibodies generated in rabbits identify both sexual and asexual *Babesia bigemina* phases. While naturally infected bovines didn't identify *hap2*. In conclusion, HAP2 expresses in both *Babesia bigemina* sexual and asexual phases and might have more functions than sexual reproduction.

(Keywords: *Babesia bigemina*, *hap2*, sexual stages)

El esfuerzo y esmero que puse en esta tesis
lo dedico a mi mamá, mi papá, mi
hermano, a Leonardo, mi familia
y amigos con todo
mi cariño y amor.

AGRADECIMIENTOS.

A mis profesores por ser una fuente de conocimiento y contribuir a mi formación profesional durante estos años tanto dentro como fuera de las aulas.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, director de mi tesis, por brindarme esta oportunidad trabajar en su proyecto, por todo el apoyo y el conocimiento que me brindó.

A mis asesores de tesis; Dra. Minerva Camacho Nuez y Dr. Juan Campos Guillén por su ayuda para la realización de esta tesis.

A todo el personal del CENAPA por ofrecerme su apoyo, material y conocimiento en la realización de algunos de los experimentos realizados en esta tesis.

A mi mamá y mi papá porque todo su apoyo, afecto y dedicación ha sido un impulso importante para luchar por mis metas. Por confiar en mí y brindarme todos los medios para convertirme en profesionalista.

A mi hermano por ser un ejemplo de que todo se puede lograr con esmero y dedicación.

ÍNDICE.

	Página
ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FÍGURAS.....	V
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.JUSTIFICACIÓN.....	4
Hipótesis.....	5
Objetivo principal.....	5
Objetivos particulares.....	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Definición.....	6
Sinonimia.....	6
Taxonomía.....	6
Etiología.....	7
Distribución Geográfica.....	7
Mundial.....	7
Nacional.....	7
Ciclo de vida.....	9
Ciclo de vida en la garrapata.....	9
Ciclo de vida en el bovino.....	12
Signos Clínicos.....	12
Periodo de Incubación.....	13
Patogenia.....	13

Lesiones Post-Mortem.	13
Lesiones macroscópicas.	13
Lesiones microscópicas.....	14
Diagnóstico.	14
Diagnóstico clínico.....	14
Diagnóstico diferencial.....	14
Diagnóstico de Laboratorio.....	15
Tratamiento.....	17
Inmunización.....	18
Vacunas Bloqueadoras de la Transmisión.....	19
HAP2 como candidato para desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión.....	20
IV.METODOLOGÍA.	22
Materiales.	22
Métodos	22
Obtención de sangre infectada con <i>B. bigemina</i>	22
Identificación de Hap2 de <i>B. bigemina</i> mediante PCR.	22
Evaluación de la expresión del gen hap2 en fases sexuales de <i>B.</i> <i>bigemina</i>	26
Detección de anticuerpos contra HAP2 en bovinos naturalmente infectados con <i>B. bigemina</i> mediante la técnica de ELISA.	27
V. RESULTADOS.....	29
Obtención de sangre infectada con <i>B. bigemina</i>	29
Identificación de <i>Hap2</i> de <i>B. bigemina</i> mediante PCR.	29

Evaluación de la expresión del gen <i>hap2</i> en fases sexuales de <i>B. bigemina</i> .	30
Detección de anticuerpos contra HAP2 en bovinos naturalmente infectados con <i>B. bigemina</i> mediante la técnica de ELISA.....	31
VI. DISCUSIÓN.....	33
VII. CONCLUSIÓN.....	36
LITERATURA CITADA.....	37
APÉNDICE.....	42
Lista de materiales empleados para la realización de la tesis.	42
Material biológico.....	42
Material de cirugía.....	42
Material de monitoreo y recolección de sangre.....	43
Material de laboratorio.....	43
Equipos.....	44
Reactivos.....	45
Soluciones.....	47

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1. Eficacia de las tres sustancias más utilizadas contra la Babesiosis bovina (adaptada de Kuttler, 1988).....	17
Tabla 2. Tratamientos para <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> , actualmente encontrados en el mercado (Kuttler, 1981; Bock, 2004; Vignau, 2005).....	18
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para ampliar el gen <i>hap2</i> de <i>B. bigemina</i>	24
Tabla 4. Volumen de los reactivos empleados en la Reacción en Cadena Polimerasa de 25 µl.....	24
Tabla 5. Cronograma de inoculaciones.....	26
Tabla 6. Tipo de Antígeno y anticuerpo primario empleado por laminilla de IFI	27
Tabla 7. Resultados del monitoreo del bovino.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Indica la distribución del vector <i>Boophilus</i> en México (SENASICA).....	8
Figura 2. Ciclo de Vida de <i>B. bigemina</i> . Fuente: Bock, 2004.	11
Figura 3. Programa de PCR utilizado en el termociclador.....	25
Figura 4. Amplificación del gen hap2 de <i>B. bigemina</i>	30
Figura 5. Expresión de HAP2 de <i>B. bigemina</i> mediante inmunofluorescencia indirecta.....	31
Figura 6. Evaluación de sueros de bovinos naturalmente infectados a la presencia de anticuerpos contra un péptido de HAP2 de <i>B. bigemina</i>	32

I.INTRODUCCIÓN.

La babesiosis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia* que se caracteriza por producir hemólisis y anemia en los hospedadores vertebrados y que se transmite de un huésped a otro a través de garrapatas de la familia *Ixodidae*. El cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza por fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia (Quiroz, 2005; Vignau, 2005; OIE, 2009).

La babesiosis puede encontrarse en cualquier lugar donde exista el vector, siendo éste común en áreas tropicales y subtropicales. En el ganado bovino se han identificado con mayor importancia económica tres especies: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*. Sin embargo, tanto *B. bovis* como *B. bigemina* tienen mayor importancia en Asia, África, Centro y Sudamérica, Sudeste de Europa y Australia, debido a la amplia distribución de la garrapata *Boophilus microplus* que trasmite ambas especies de *Babesia* (De Vos, 1992; Bock, 2004; Vignau, 2005; cfsph.iastate.edu, 2008; OIE, 2009). En México la presencia de las garrapatas *Boophilus annulatus* y *B. microplus*, determina la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* (Callow, 1997; Bock, 2004; Quiroz, 2005).

Cerca de 300 millones de bovinos a nivel mundial corren riesgo de infectarse con *B. bovis* y *B. bigemina* siendo por lo tanto una enfermedad que tiene un gran impacto económico en la ganadería (Wright, 1990). No obstante, aunque *B. bovis* es considerada más peligrosa por Callow *et al* (1997), *B. bigemina* también provoca una enfermedad aguda (Mosqueda y Castro, 2007).

El impacto económico de la babesiosis se observa en la mortalidad, abortos, disminución en la producción de carne y leche, costos de acaricidas, costos de tratamientos contra *Babesia*, costos de vacunación y las restricciones para la movilización de animales (Bock *et al*, 2004).

Para el control de esta enfermedad se ha recurrido a diversos métodos tales como: el uso de acaricidas para reducir la población trasmisora de la enfermedad, la vacunación de bovinos en riesgo y finalmente el uso de medicamentos tales como los derivados de acridinas, derivados de quinolonas, derivados de diamidinas y tetraciclinas (Kuttler, 1988; Bock, 2004). De los métodos anteriores, De Vos (1992) menciona que el uso de acaricidas queda limitado sólo al control del vector pues resulta difícil erradicarlo a menos que se trate de un área ecológicamente aislada con recursos económicos, mientras que el uso de medicamentos es para uso terapéutico.

En cuanto a vacunas, se han utilizado vacunas vivas de *B. bovis* principalmente, aunque últimamente la demanda para antígenos de *B. bigemina* ha incrementado, por ejemplo, el 65% de las vacunas vendidas en 2002 en Australia contenían ambas cepas. (Bock, 2004; De Vos, 1992).

Tanto el uso de vacunas vivas como de muertas que han sido empleadas hasta la fecha tienen limitantes, ya sea en el riesgo implícito de transmitir enfermedades concurrentes y el riesgo a la reversión a la virulencia o por su baja inmunogenicidad. Por estas razones, actualmente se está intentando desarrollar vacunas de antígenos recombinantes que se puedan emplear con un menor número de restricciones (Bock *et al*, 2004).

En la búsqueda de antígenos que puedan utilizarse en la elaboración de vacunas contra *B. bigemina*, se están estudiando los antígenos de la superficie del merozoito y antígenos de la membrana apical. Sin embargo, Kaslow en 1997 indicó la importancia de realizar vacunas que bloqueen la transmisión de la enfermedad, haciendo referencia a trabajos que han mostrado que durante las fases sexuales de los protozoarios del phylum *Apicomplexa*, como *Plasmodium* spp., minutos después de ingerido el parásito por el vector, aquel se torna

extracelular quedando expuesto a ser reconocido por anticuerpos del hospedero vertebrado. Lo anterior sugiere que aquellos antígenos de las fases sexuales de esos protozoarios pueden ser utilizados para el desarrollo de vacunas que tengan por objetivo impedir la transmisión de la infección. En estos últimos años se está intentando diseñar vacunas enfocadas a bloquear la transmisión de *Plasmodium* spp. usando diferentes antígenos (Kaslow, 1997).

La proteína GCS1 (Generative Cell Specific 1), también llamada HAP2, interviene en la reproducción sexual de los parásitos, la cual se lleva a cabo en el mosquito, siendo una importante opción para el bloqueo de la transmisión de la enfermedad al humano. Considerando que tanto *Babesia*, como *Plasmodium* son miembros de la clase *Apicomplexa*, es factible que HAP2 también pueda estar presente en *B. bigemina* y expresarse en las fases sexuales del parásito, teniendo la misma importancia en el bloqueo de la transmisión a través de la interacción garrapata-parásito (Hirai, 2008; Blagborough, 2009).

II.JUSTIFICACIÓN.

En México la babesiosis es endémica en zonas tropicales y subtropicales donde se encuentra el 70% de los bovinos que están en el país, en riesgo de contraer la enfermedad. La babesiosis bovina tiene un impacto económico en la industria ganadera, haciéndola una industria con pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de carne y leche, y debido a la falta de control de la enfermedad y el vector también representa una limitante en la exportación de ganado y de la introducción de razas especializadas a zonas tropicales del país (Fernández, 1995; Bock, 2004).

La falta de herramientas de control de esta enfermedad ha hecho necesario el uso de acaricidas que son caros y generan resistencia, además la terapéutica de la enfermedad también resulta costosa y las vacunas que se emplean actualmente que son a base de cepas vivas atenuadas que en ocasiones provocan reacciones de virulencia y las vacunas muertas son difíciles de elaborar debido a la gran variación antigénica de las proteínas de la *Babesia*, además de ser costosas de producir (Bock, 2004; Torina, 2009).

Para el desarrollo de las vacunas contra la babesiosis bovina se están empleando tecnologías de punta a base de antígenos recombinantes que sean más seguros, tal como se ha realizado en otros parásitos apicomplexos. En *Plasmodium* spp, por ejemplo, se están identificando antígenos para el desarrollo de vacunas con la intención de bloquear la transmisión de la malaria. Algunos de los candidatos a ser incluidos en las vacunas bloqueadoras de la transmisión de la Malaria se encuentran los antígenos PFS230 y PFG27/25, presentes en las fases sexuales de *Plasmodium* y el recientemente descrito *hap2*, un gen exclusivo del gametocito macho para la fusión de membranas de los parásitos de *Plasmodium* (Kaslow, 1997; Stowers, 2002; Bock, 2004; Hirai, 2008; Blagborough, 2009). En

este trabajo se evalúa si un gen homólogo de *hap2* está presente en *B. bigemina* y entonces pueda ser utilizado en un futuro para bloquear la transmisión de la enfermedad.

Hipótesis.

El gen *hap2* se expresa en las fases sexuales de *B. bigemina*.

Objetivo principal.

Evaluar la expresión de *hap2* en las fases sexuales de *B. bigemina*.

Objetivos particulares.

Identificar *hap2* de *B. bigemina* mediante PCR.

Evaluar la expresión de HAP2 a través del uso de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Evaluar la presencia de anticuerpos contra un péptido sintético de HAP2 en el suero de bovinos infectados naturalmente.

III. REVISIÓN DE LITERATURA.

Definición.

La babesiosis es causada por parásitos protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* que infectan un amplio rango de mamíferos, es transmitida por garrapatas y su distribución es mundial. Esta enfermedad se manifiesta por anemia, fiebre, hemoglobinuria y muerte (McCosker, 1981; Bock, *et al.* 2004).

Sinonimia.

La babesiosis bovina también ha sido llamada: Piroplasmosis, Fiebre de Texas, agua roja, fiebre de garrapata, tristeza bovina, fiebre del ganado (McCosker, 1981; Vignau, 2005; cfsph.iastate.edu, 2008).

Taxonomía.

La clasificación taxonómica de *B. bigemina* es la siguiente:

Reino: Protista
Subreino: Protozoa
Phylum: Apicomplexa
Clase: Sporozoa
Subclase: Piroplasmia
Orden: Piroplasmida
Familia: Babesiidae
Género: *Babesia*
Especie: *bigemina*

(Levine, 1982).

Etiología.

A la fecha se han descrito 71 especies de *Babesia*, siendo 18 especies las de importancia en Medicina Veterinaria pues afectan a los animales domésticos, de éstas 18 especies las de importancia en el bovino son:

B. bovis descrita por Víctor Babes en 1888.

B. bigemina descrita por Smith y Kilbourne en 1893.

B. divergens descrita por Fadigan y Stockman en 1991.

Babesia major descrita por Sergent, Donatien, Parrot, Lestoquard y Plantureaux en 1926 (Levine, 1971; Quiroz, 2005).

Distribución Geográfica.

Mundial.

La babesiosis bovina se puede encontrar en cualquier lugar donde el vector exista, si bien las garrapatas *B. microplus* originaria del Sudeste de Asia, y *B. annulatus* originalmente presente en zonas del mediterráneo, se han diseminado ampliamente en áreas tropicales, incluyendo Australia, Este y Sur de África, Centro y Sudamérica y Sur y Centro de Sudán. Ambas especies se introdujeron en México de donde se extendieron a Estados Unidos y de donde han sido eliminadas en los últimos años (Bock, 2004; Jongejan, 2004; cfsph.iastate.edu, 2008).

Nacional.

En México la distribución de las garrapatas *Boophilus* es del 51.5% del territorio, esto es en zonas correspondientes a regiones tropicales y subtropicales, implicando que cerca del 75% de la población bovina en el país en 2004 se encontraba en áreas infestadas por el vector y por tanto en riesgo de contraer la

enfermedad (Mosqueda, Figueroa *et al.*, 2007). SENASICA realiza la Campaña Nacional Contra la Garrapata *Boophilus* spp (NOM-019-ZOO-1994), cuyos resultados reportados al 5 de enero de 2011 son:

- ❖ Las áreas libres en la región Norte del país en parte de los estados de Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, el Altiplano de San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla y todo el territorio de los estados de Baja California, Sonora, Aguascalientes, Tlaxcala y Distrito Federal.
- ❖ Las áreas en Fase de Control se localizan en el litoral del Golfo de México y del Pacífico y en la parte Sur del Territorio Nacional.



Figura 1. Indica la distribución del vector *Boophilus* en México (SENASICA).

Ciclo de vida.

B. bigemina tiene un ciclo de vida indirecto; necesita de un huésped invertebrado que es la garrapata *Boophilus* y donde se lleva a cabo la reproducción sexual y de un huésped vertebrado, que es el bovino, donde se lleva a cabo la reproducción asexual (Bock, 2004; Vignau, 2005). Es un ciclo de vida típico del phylum *Apicomplexa*, alternando por tres fases; merogonia, gametogonia y esporogonia (García, 2010).

Ciclo de vida en la garrapata.

En el bovino, la *Babesia* se multiplica dentro de los eritrocitos, cuando la garrapata se alimenta de sangre del bovino infectado, adquiere los merozoitos (Smith, 1978; Vignau, 2005).

En el intestino de la garrapata se da una rápida destrucción de eritrocitos y las formas intraeritrocíticas de *Babesia* quedan libres en el lumen intestinal. Muchas de las formas parasitarias son degradadas en el intestino, y es aquí en donde las primeras horas después de la ingestión se aprecian las fases parasitarias que originan la infección en la garrapata y de las cuales se formarán los microgametos y macrogametos (Riek, 1964; Smith, 1978; Chauvin, 2009; García, 2010). Antes de que ambas formas celulares se desarrollen, ocurrirán cambios morfológicos que originarán estadios intermedios con forma de cuerpos elongados, radiados que han sido denominados “Strahlenkörper” o cuerpos radiados, después ocurre una conglomeración de formas radiadas multinucleadas que al completar la división dan lugar a células haploides, fases sexuales o gametos del parásito y es por lo que, esta etapa recibe el nombre de gametogonia (Rudzinka, 1983; Mackenstedt, 1995; Chauvin, 2009). Estos gametos se fusionan (singamia) en el lumen del tracto digestivo de la garrapata y se da origen a un cigoto, célula diploide, que comienza a alargarse lo que facilita la penetración

celular (Vignau, 2005; Chauvin, 2009; García, 2010). A continuación el cigoto, que presenta un organelo en forma de flecha, infecta selectivamente las células del tracto digestivo de la garrapata y una vez que se interna en estas células el organelo en forma de flecha se degenera, ocurre a continuación una meiosis cuyo resultado es una forma móvil llamada ooquinetos, la cual es poliploide (Smith 1978; Mackenstedt, 1995; Vignau, 2005; Chauvin, 2009). Los ooquinetos o vermículos atraviesan las células intestinales para así migrar en la hemolinfa a diferentes tejidos de la garrapata: Tubos de Malpigio, glándulas salivales, hemocitos e iniciar la infección, durante este proceso el parásito llega a los ovarios donde infecta los óvulos antes que elaboren la cubierta de quitina, siendo esta la transmisión transovárica, se formarán los esporoquinetos (Riek, 1964; Smith, 1978; Bock, 2004; Chauvin, 2009). Después de la ovoposición las babesias permanecen latentes en el tejido embrionario y de la larva cuando esta eclosiona pero se reactivan hasta que la larva inicia su alimentación una vez que infesta un bovino, entonces los parásitos invadirán las células de las glándulas salivales ocurrirá un desarrollo terminal que producirá un esporonte que dará origen a una formas pequeñas haploides que son los esporozoitos o formas infectivas para el huésped vertebrado (Smith, 1978; Bock, 2004; Chauvin, 2009).

CICLO DE VIDA DE *BABESIA BIGEMINA*

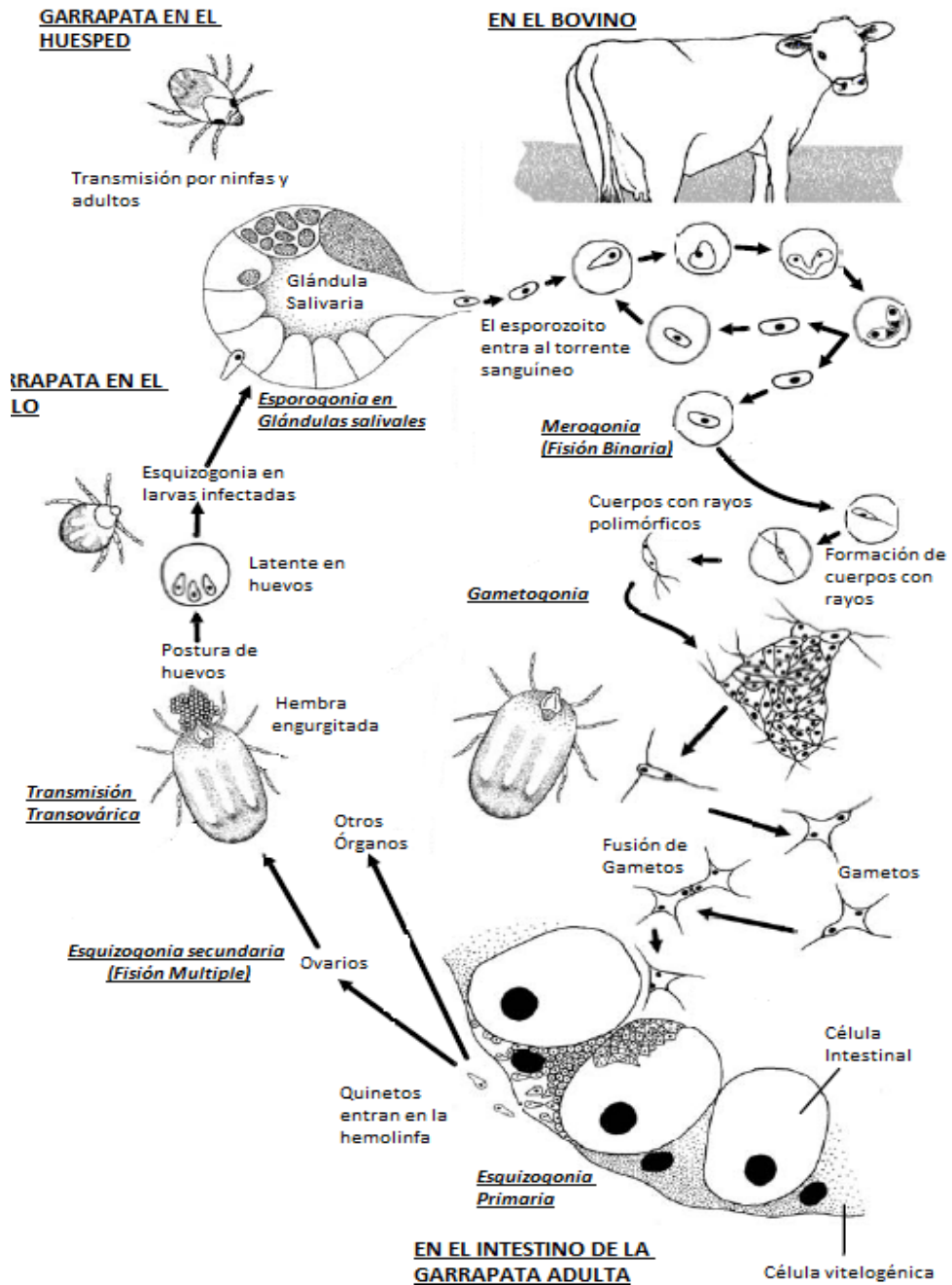


Figura 2. Ciclo de Vida de *B. bigemina*. Fuente: Bock, 2004.

Ciclo de vida en el bovino.

La *Babesia* infecta al huésped vertebrado cuando la garrapata se alimenta del bovino y le inocula los esporozoitos que están siendo eliminados por la saliva (Bock, 2004; Chauvin, 2009). *Babesia* no parasita más que eritrocitos en el bovino, por lo que una vez que los esporozoitos son inoculados en el bovino invaden los eritrocitos y es ahí donde se desarrollan todos los estadios del parásito (Bock, 2004; Chauvin, 2009). Una vez en los eritrocitos el esporozoito se transforma en trofozoito el cual pierde los organelos del complejo apical y por fisión binaria genera dos merozoitos, que en *B. bigemina* contiene DNA haploide (Rudzinka, 1976; Mackenstedt, 1995; Chauvin, 2009). Al finalizar su desarrollo se provoca una lisis celular y de esta manera los merozoitos quedan libres en la sangre donde infectarán otros eritrocitos y ocurrirán nuevos ciclos de reproducción asexual, así que en sangre se podrán observar diferentes estadios del parásito (Chauvin, 2009).

Signos Clínicos.

La infección por *B. bigemina* produce diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la virulencia y patogenicidad de la cepa en cuestión. Los signos característicos se deben a la anemia y la hemólisis, los más comúnmente presentados son: fiebre alta de hasta 41°C, incluso antes que aparezcan otros signos, anorexia, debilidad, se observan animales se separan del hato y se niegan a moverse, depresión, mucosas pálidas, frecuencia cardíaca y respiratoria elevadas, hemoglobinuria y hemoglobinemia, aborto por fiebre en hembras gestantes y machos con baja temporal de la fertilidad (cfsph.iastate.edu, 2008; OIE, 2009)

Son raras las manifestaciones de signos en sistema nervioso central. Los animales se recuperan de la anemia en una semana, pero quedan débiles y delgados (Vignau, 2005; cfsph.iastate.edu, 2008).

Periodo de Incubación.

El periodo de incubación de la enfermedad causada por *B. bigemina* puede variar, dependiendo de la virulencia de la cepa, de 4 a 5 días, aunque los signos se presentan de 2 a 3 semanas después de la infestación por garrapata (Barros y Figuera, 2008; cfsph.iastate.edu, 2008).

Patogenia.

Se desarrolla una anemia hemolítica que se debe principalmente a la destrucción masiva de eritrocitos por acción traumática cuando *B. bigemina* sale de los eritrocitos, por acción mecánica cuando se forman cúmulos de parásitos en vasos capilares. Lo anterior produce un descenso del 25% del conteo celular normal. La hemólisis causa una anoxia que en cuadros agudos puede resultar mortal. La hemoglobina tiñe de rojo oscuro la orina (hemoglobinuria) que se presenta en etapas tempranas de la enfermedad llegando a tener porcentajes de hemoglobina 50% menores de lo normal. Se observa anisocitosis en frotis sanguíneo (Bock, 2004, Quiroz, 2005, Singh, 2008).

Lesiones Post-Mortem.

Las lesiones *post-mortem* se relacionan principalmente a la hemolisis intravascular, anemia e ictericia.

Lesiones macroscópicas.

Se observan las mucosas pálidas o ictéricas. La sangre es acuosa. El tejido subcutáneo, el tejido adiposo abdominal y el omento se observan amarillentos. Los pulmones están congestionados y edematosos. Se observa fluido sanguinolento en el saco pericárdico. El bazo se nota aumentado de

tamaño, friable y de color muy oscuro. El hígado puede presentar un color café amarillento además de estar aumentado de tamaño. Los riñones presentan una coloración rojiza oscura o negra. Se puede observar una ictericia y hemorragia en la submucosa del abomaso, gastroenteritis catarral y la serosa intestinal presenta tonos rosa oscuro por la absorción de hemoglobina *ante-mortem*. La vejiga urinaria puede contener orina de color rojo oscura. Los nódulos linfáticos se observan edematosos (Bock, 2004, cfsph.iastate.edu, 2008, Singh, 2008).

Lesiones microscópicas.

El hígado se observa con necrosis centrotubular, infiltración grasa, neutrófilos en áreas necrosadas e infiltración por linfocitos de la porta. Los capilares del pulmón están congestionados con una gran cantidad de linfocitos, neutrófilos y macrófagos. El corazón presenta subendocarditis y subendopericarditis. Las células reticulares están aumentadas. Se observa una reducción de la pulpa roja y la pulpa blanca en el bazo: hay congestión, macrófagos repletos de hemosiderina y aumento del número de células mitóticas (Ristic, 1980; Quiroz, 2005; Singh, 2008).

Diagnóstico.

Diagnóstico clínico.

En zonas donde está presente el vector, el bovino con babesiosis presenta un cuadro de anemia, fiebre, hemoglobinuria y otros signos de hemólisis (Quiroz, 2005).

Diagnóstico diferencial.

Se deben considerar enfermedades que produzcan fiebre y anemia hemolítica tales como: Anaplasmosis, Theileriosis, Hemoglobinuria bacilar, Tripanosomiasis, Leptospirosis, Eperitrozonosis, Intoxicación crónica por cobre,

Intoxicación por semilla de canola, Rabia y otras encefalitis (cfsph.iastate.edu, 2008).

Diagnóstico de Laboratorio.

Frotis sanguíneo.

Los frotis sanguíneos delgados teñidos con giemsa se emplean para detectar las formas intraeritrocíticas de *Babesia*. Es una prueba oficial de diagnóstico, establecida en la NOM-019-ZOO-1994 donde se recomienda que la sangre para esta prueba sea tomada de la vena caudal o vena auricular. Esta es una prueba cuantitativa que permite identificar la infección aguda con *B. bigemina*. Sin embargo, una desventaja es que la forma subclínica de la enfermedad no se detecta por medio de esta técnica debido a que esta prueba es poco sensible dificultando la identificación de cantidades pequeñas del parásito (Mosqueda, 2003; Vignau, 2005, Bock, 2004, cfsph.iastate.edu, 2008).

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Esta también es una prueba oficial para la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* en México establecida en la NOM-0190-ZOO-1994. Con esta prueba se detectan los anticuerpos generados por el bovino contra la *Babesia*. Esta técnica consiste en la identificación de anticuerpos específicos contra un patógeno, al que después se le detecta usando un segundo anticuerpo unido a un fluorocromo, es decir, un anticuerpo fluorescente contra el anticuerpo no fluorescente. El resultado de la reacción se observa en un microscopio de fluorescencia y si existe la presencia del anticuerpo específico contra el patógeno emitirá fluorescencia sobre la superficie de los parásitos intraeritrocíticos (Madigan *et al*, 2006). Para *B. bigemina* los parásitos se pueden observar dentro de la célula roja y se distinguen formas anulares, de pera; solas o en pares, dependiendo del estadio de parásito, el tamaño puede ser 3-3.5µm por 1-1.5µm e incluso llenar todo el eritrocito. Sin embargo, tanta variación morfológica hace difícil la identificación de una especie

en específico, además es una prueba que requiere de equipo especializado como el microscopio de fluorescencia y se necesita la capacitación del personal que la realizará (cfsph.iastate.edu, 2008) ya que es subjetiva.

Ensayo inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA.)

Esta prueba se utiliza para la detección de anticuerpos en el suero sanguíneo. Es una prueba que posee alta especificidad y alta sensibilidad. Se basa en aprovechar la unión covalente de enzimas a anticuerpos para así conservar la propiedad catalítica de la enzima y la especificidad del anticuerpo. Al agregar los productos de la reacción, estos se colorean y pueden medirse en pequeñas cantidades (Madigan et al, 2006). Con esta prueba se pueden identificar anticuerpos contra *Babesia*. La prueba de ELISA específica para *B. bigemina* realizada por Goff (2008) muestra una especificidad de 100% y una sensibilidad de 87.2%, por lo que tiene potencial para ser usada a nivel mundial. Está diseñada para ser distribuida fácilmente y en laboratorios con diferentes cantidades de recursos.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Es una herramienta simple, específica y eficiente, que permite obtener millones de copias del ADN blanco presente en una muestra. Para esta prueba se necesitan generar dos oligonucleótidos iniciadores, uno de cada extremo del ADN blanco, los cuales se agregan a ADN blanco que es desnaturalizado con calor para que cada oligonucleótido se hibride con las cadenas de ADN blanco correspondiente y con ayuda de la ADN polimerasa los iniciadores se alargarán usando el ADN blanco como molde, luego se vuelve a calentar el ADN para separar las nuevas cadenas de ADN para que se hibriden con oligonucleótidos iniciadores nuevamente y así se repite el ciclo (Madigan, 2006). Para el diagnóstico de *B. bigemina* se usan oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar exclusivamente el ADN de *B. bigemina*. La ventaja de esta prueba es

que permite identificar una sola bacteria en una muestra aún en presencia de otras bacterias, es altamente específica de manera que permitirá diferenciar entre infecciones por *B. bovis* e infecciones por *B. bigemina*, al multiplicar las cadenas de ADN, también permite detectar infecciones subclínicas por *B. bigemina*, con la secuencia forward 5' –CTCGTAGTTGTATTTTCAGCCTC- 3' y la secuencia reverse 5' –GCTGAAGGAGTCGGAAAATG- 3' empleadas por Mosqueda (2006).

Tratamiento.

El tratamiento es más efectivo cuando la enfermedad se detecta tempranamente, pues si el animal se encuentra debilitado por la anemia pueden requerirse transfusiones sanguíneas para contribuir a la recuperación del animal. Diferentes compuestos químicos se han empleado para el tratamiento contra la babesiosis, sin embargo, actualmente pocos se encuentran en el mercado pues han tenido problemas por residuos o de seguridad. Los fármacos más empleados para tratar la babesiosis han sido el dipropionato de imidocarb, el aceturato de diminazina y las oxitetracilinas, aunque actualmente los de mayor uso a nivel mundial son los dos primeros, debido a que las oxitetracilinas no son capaces de controlar la infección de campo (Kuttler, 1988; Bock, 2004).

Tabla 1. Eficacia de las tres sustancias más utilizadas contra la Babesiosis bovina (adaptada de Kuttler, 1988).

	Diminazine	Imidocarb	Oxitetraciclina
<i>B. bigemina</i>	++++	++++	+
<i>B. bovis</i>	+++	+++	+

Nota: + poco efectivo, ++++ efectivo.

Tabla 2. Tratamientos para *B. bovis* y *B. bigemina*, actualmente encontrados en el mercado (Kuttler, 1981; Bock, 2004; Vignau, 2005).

Sustancia activa	Dosis	Nombre comercial
Diaceturato de 4,4'-Diazoaminodibenzamidina (Diminazina o diminazene)	3 – 5 mg/kg de peso vivo I.M.	Ganaseg, Beronal, Atrisan.
Dipropionato de imidocarb	1 – 3 mg/kg de peso vivo S.C o I.M.	Imizol, Imidox, Imidofin, Imicar.

Inmunización.

Debido a que los protozoarios desarrollan resistencia a los fármacos y que la babesiosis bovina representa pérdidas económicas en el ganado se busca como alternativa para el control de esta enfermedad la creación de una vacuna estandarizada efectiva y económica que permita conferir protección a los bovinos en riesgo. Se ha observado que los animales son capaces de desarrollar inmunidad bastante duradera contra *B. bovis* y *B. bigemina* lo que indica que la inmunización puede resultar efectiva técnica de control de bajo costo y sin consecuencias ambientales (Bock, 2004; Callow, 2007).

Para controlar la babesiosis bovina se han empleado la premunición, las vacunas vivas atenuadas y las vacunas recombinantes. La premunición fue un método empleado desde principios del siglo pasado, principalmente en zonas endémicas, consistía en utilizar la sangre infectada de un animal en recuperación para infectar otros bovinos sanos y después aplicar un tratamiento terapéutico. Las vacunas vivas atenuadas se realizan cultivadas in vitro o en becerros esplenectomizados, los animales vacunados no se enferman pero si se infectan y se protegen contra cepas virulentas de campo. Este tipo de vacunas se están produciendo actualmente en Argentina, Uruguay, Australia, Sudáfrica e Israel con apoyo del gobierno. Las vacunas vivas tienen desventajas de seguridad como la reversión a la virulencia, el riesgo de contaminación con organismos patogénicos,

la corta vida de anaquel, además de requerir un manejo especial para conservar las propiedades de la vacuna por cadena fría, mientras que las vacunas muertas no confieren la inmunidad deseada (Callow 1997; Jenkins 2001; Bock, 2004; Mosqueda, 2007)

En este momento se está empleando tecnología de punta para producir vacunas sintéticas para *Babesia* spp, no obstante, a la fecha no existe vacuna de este tipo contra la babesiosis bovina (Mosqueda, 2007). Por lo anterior, se está trabajando en desarrollar una vacuna a partir de subunidades enfocada a bloquear la transmisión de esta enfermedad, lo cual ya se ha trabajado en otros parásitos apicomplexos como los causantes de la malaria.

Vacunas Bloqueadoras de la Transmisión.

Para erradicar la malaria -una enfermedad de humanos muy similar a la babesiosis bovina- se están desarrollando las vacunas bloqueadoras de la transmisión que en conjunto con otras medidas, ayuden a disminuir la resistencia a fármacos, proporcionando una solución barata y de aplicación sencilla.

El objetivo de estas vacunas es evitar que el artrópodo vector transmisor se infecte, esperando que al no infectarse no pueda a su vez transmitir la enfermedad a los hospedadores sanos. Es una estrategia ingeniosa ya que sólo unos cuantos parásitos se transformarán en gametocitos extracelulares que poseen proteínas que no están en contacto con el sistema inmune del hospedero mamífero por lo tanto no se encuentran bajo selección inmune, así se espera que sean péptidos conservados y buenos inmunógenos.

Como candidatos para desarrollar estas vacunas se encuentran diversas proteínas en la superficie del gameto como las proteínas pfs48/45 y pfs230 que

han demostrado ser buenos inmunógenos (Kaslow, 1997; Carter, 2001; Blagborough 2009).

HAP2 como candidato para desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión.

A la fecha existen varios candidatos a ser usados en las vacunas bloqueadoras de la transmisión por lo cual se siguen estudiando diferentes proteínas. Una de esas proteínas de estadios sexuales recientemente identificada es HAP2, también denominado GCS1 (Generative Cell Specific 1), en *Plasmodium berghei* (Blagborough 2009; Hirai 2008).

A través de estudios moleculares se ha determinado que el gen *hap2* apareció en un ancestro de plantas, protistas y animales, formando parte importante en la reproducción sexual. Este gen es esencial para la fertilización de las fases sexuales ya que participa en la fusión de membranas de los gametos (Blagborough 2009; Steele, 2009). Se ha observado que HAP2 tiene su función en machos lo que se ha comprobado en algunas plantas angiospermas, mientras que en *Plasmodium* se ha visto que parásitos knockout presentan esterilidad (Hirai, 2008). Todos los genes ortólogos a *hap2* que se han estudiado codifican para proteínas que comparten su arquitectura la cual se divide en dos regiones; un dominio HAP2 de cerca de 50 aminoácidos en la región amino terminal que es más larga y altamente conservada, y que está separada por una región transmembranal de la región carboxilo terminal que es más variable (Wong, 2010).

En cuanto a las aplicaciones de HAP2 en el desarrollo de vacunas bloqueadoras de la transmisión, se ha observado que parásitos knockout de *Plasmodium* para *hap2* presentan esterilidad, indicando la importancia de esta proteína en la fusión sexual. Por lo anterior se ha mencionado que un ataque

mediado por anticuerpos contra HAP2 podría ser efectivo contra las fases sexuales en el mosquito, ya que las fases sexuales no se han enfrentado a anticuerpos en el mosquito y por lo tanto no han desarrollado ninguna estrategia de evasión para el sistema inmunitario. Esto se ha evaluado con suero anti-Hap2 de *Plasmodium berghei* con el que se ha observado que el ciclo de vida se interrumpe por inhibición de la fertilización (Von Besser, 2006; Blagborough 2009; Hirai 2009). Como *Plasmodium* pertenece al phylum *Apicomplexa*, actualmente se está trabajando el gen *hap2* en distintos parásitos del mismo phylum. *B. bigemina* es un parásito apicomplejo por lo tanto, se hipotetiza que este gen puede estar presente en su genoma y tener participación en la reproducción sexual.

IV.METODOLOGÍA.

Materiales.

Los materiales empleados en la realización de esta tesis se enlistan en la sección de Apéndice.

Métodos

Obtención de sangre infectada con B. bigemina.

Para obtener una mayor cantidad de parásitos intraeritrocíticos, se realizó una esplenectomía al bovino, con el objetivo de inmunosuprimirlo. La Técnica quirúrgica empleada en la esplenectomía se realizó conforme al procedimiento descrito en el libro de Técnicas Quirúrgicas en Animales (Alexander, 1989).

Posteriormente se realizó el monitoreo del bovino a partir del día cinco post-inoculación. El monitoreo consistió en tomar la temperatura rectal y una muestra sanguínea de la vena coccígea. Con la sangre se realizaron frotis que fueron teñidos con Giemsa para su observación directa en el microscopio y determinar la parasitemia, también se midió el Volumen Corpuscular Medio (VCM) por medio de la técnica de hematocrito. Una vez que se diagnosticó al animal como positivo y que presentó un porcentaje de parasitemia superior al 1%, se realizó la exsanguinación del animal con ayuda de las bolsas para obtención de sangre, obteniendo la cantidad necesaria de sangre para realizar el PCR y frotis sanguíneos para realizar las Inmunofluorescencias.

Identificación de Hap2 de B. bigemina mediante PCR.

Extracción de ADN de B. bigemina a partir de eritrocitos infectados.

Se centrifugó la sangre completa infectada con *B. bigemina* a 3500

revoluciones por minuto (rpm) durante 25 minutos, en la campana de flujo laminar se eliminó el plasma y los glóbulos blancos, dejando el paquete glóbulos rojos. A los tubos con el paquete celular se le agregaron los mililitros necesarios de PBS para completar los 15 ml del tubo. Se homogenizaron el paquete celular y el PBS y se repitió el procedimiento hasta obtener un pellet blanco. Se agregó proteínasa K en una concentración de 50µg/ml por cada mililitro del pellet blanquecino recuperado del lavado de sangre. Se dejó en baño maría toda la noche a 55°C. Se homogenizó el contenido del tubo y se transfirió la muestra a un tubo de 1.5ml, al que se le añadió 900µl de solución de lisis de células, se volteó 6 veces para homogenizar. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 segundos. Se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante y se agitó hasta que el pellet se mezcle con el sobrenadante restante. Se agregó 300µl de solución de lisis de núcleos y se pipeteó 6 veces. Se añadieron 100µl de solución de precipitación de proteínas y se homogenizó durante 20 segundos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante, a un tubo estéril de 1.5ml con 300µl de isopropanol, se mezcló suavemente la solución invirtiéndola una y otra vez hasta que se formaron bandas blanquecinas de ADN. Se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. Se retiró el sobrenadante y se agregó etanol al 70% a temperatura ambiente. Se movió el tubo varias veces para lavar el ADN y las paredes del tubo y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. Se retiró el etanol y se invirtió el tubo sobre papel absorbente limpio y dejó secar por 15 minutos en la campana de flujo laminar. Se agregaron 100µl de solución de rehidratación de ADN y dejó incubar toda la noche a 4°C.

Detección del gen hap2 de B. bigemina en la sangre obtenida.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *hap2* de *B. bigemina* fueron diseñados para amplificar una fracción de 1485 pb del gen y son los que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para ampliar el gen *hap2* de *B. bigemina*.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición	Orientación
Hap2 Forward	GGA AGG TTG GTT GCA GGG T	Inicia: 747 pb	Sentido
Hap2 Reverse	CGC TGA ATG TGA ACG AGT C	Termina: 2232 pb	Antisentido

La preparación de mezcla para PCR se realiza como se muestra a continuación.

Tabla 4. Volumen de los reactivos empleados en la Reacción en Cadena Polimerasa de 25 μ l.

Componente	ADN muestra	Control negativo
Mastermix	12.5 μ l	12.5 μ l
Agua libre de nucleasas	5.5 μ l	10.5 μ l
ADN con <i>B. bigemina</i>	5 μ l	–
Oligonucleótido Forward	1 μ l	1 μ l
Oligonucleótido Reverse	1 μ l	1 μ l
Volumen final	25 μ l	25 μ l

El programa de PCR utilizado para la amplificación de *hap2* es el siguiente: Para la desnaturalización de la doble cadena de ADN se realizó un calentamiento a 95°C durante 1 minuto. Para la amplificación exponencial se realizaron 35 ciclos cada uno con las siguientes características: un paso de 15 segundos a 94°C para la desnaturalización de las hebras, un paso de 1 minuto de 60°C para el alineamiento, seguido de 1 minuto a 72°C para sintetizar ADN. Para la extensión final se agrega un ciclo a 72°C por 7 minutos y finalmente las muestras se bajan a 10°C por tiempo indefinido hasta ser retiradas del termociclador.

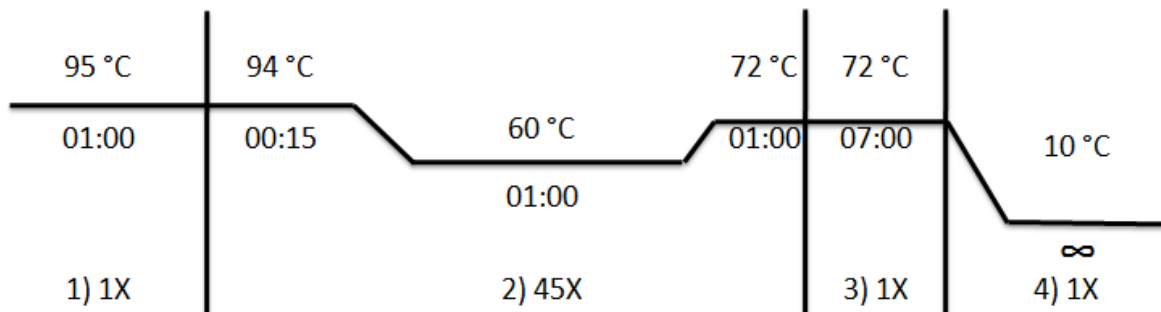


Figura 3. Programa de PCR utilizado en el termociclador.

Una vez amplificado *hap2* por PCR se elaboró un gel de agarosa TAE al 1% que se tiñó con Bromuro de Etidio para correr las muestras a 70 Voltios. Con ayuda de un fotodocumentador se observó la integridad y el tamaño de la banda esperada (1485 pb).

Análisis del amplicón del gen *hap2* de *B. bigemina* mediante electroforesis.

Se preparó una matriz de agarosa a una concentración del 1% diluyendo agarosa en TAE (1x) a una temperatura máxima de ebullición y luego se enfrió en un recipiente de agua a temperatura ambiente. Se colocó el peine en la charola de preparación, se vertió la agarosa y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta gelificarse. El gel de agarosa se colocó en la cámara de electroforesis, se retiró el peine y se cubrió con solución TAE. Se prepararon 10µl de muestra con 3µl de tinción y 5µl de marcador molecular con 3µl de tinción en viales de 1.5 ml. A continuación se depositaron en los 8µl del marcador molecular y los 13 µl de muestra en los pocillos del gel y se corrió en la cámara de electroforesis a 75 volts por una hora. Después se colocó el gel en bromuro de etidio al 5% por 10 minutos y finalmente se observaron los resultados en el fotodocumentador.

Evaluación de la expresión del gen hap2 en fases sexuales de B. bigemina.

Generación de Anticuerpos Anti-HAP2 en conejos.

Para obtener anticuerpos Anti-HAP2 se utilizaron dos conejos. Primero se realizó una toma de muestra sanguínea para obtener suero preinmunización de ambos conejos. Después se realizaron las inmunizaciones con 100µg de péptido diluido en adyuvante (Montanide ISA 70) para obtener el volumen final de 2.5ml. Cada inmunización se realizó de manera subcutánea en zona de la ingle de ambos costados, el volumen que se aplicó fueron 1.25ml en cada punto.

Tabla 5. Cronograma de inoculaciones

Día	Acción
0	Primera inoculación
15	Segunda inoculación
25	Tercera inoculación
35	Cuarta inoculación
41	Exsanguinación

El día 41 post inoculación se realizó la exsanguinación, la sangre se colocó en tubos de 50ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 25 minutos. Se extrajo el suero y se colocó en viales de 1.5ml estériles y se almacenaron a -20°C.

Evaluación de la expresión de hap2 en fases sexuales de B. bigemina mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Se indujeron fases sexuales de *B. bigemina* de acuerdo con la técnica descrita por Mosqueda et al. (2004), se extendieron sobre portaobjetos y se realizaron frotis con la sangre del bovino infectado experimentalmente para realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta. A continuación las laminillas se fijaron por inmersión en acetona al 100% durante 10 minutos y después se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos y posteriormente se cuadrículó con esmalte rojo la laminilla haciendo 18 pocitos. Se agregó suero post-

inmunización Anti-HAP2 a una concentración de 1 en 50 en un volumen final de 100µl de cada conejo en los pocitos. Una vez agregado el anticuerpo primario, las laminillas se incubaron en la cámara húmeda a 37°C por 30 minutos. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS y uno con agua destilada, después se secaron 15 minutos a 37°C. En seguida se agregó anticuerpo secundario FITC en todas las cuadrículas que contenían anticuerpo primario y se volvió a incubar por 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda. Se realizaron los dos lavados con PBS y uno con agua destilada y al secarse las laminillas se procedió a hacer la lectura en el microscopio de inmunofluorescencia.

Tabla 6. Tipo de Antígeno y anticuerpo primario empleado por laminilla de IFI

Tipo de antígeno	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Resultado Esperado
Eritrocitos Infectados	C1 pre inmunización	1µl FitC y 49µl PBS	Negativo
	C2 pre inmunización		Negativo
	Anti KLH		Negativo
	C1 postinmunización		Negativo
	C2 postinmunización		Negativo
Fases Sexuales	C1 pre inmunización		Negativo
	C2 pre inmunización		Negativo
	AntiKLH		Negativo
	C1 postinmunización		Positivo
	C2 postinmunización		Positivo

Detección de anticuerpos contra HAP2 en bovinos naturalmente infectados con B. bigemina mediante la técnica de ELISA.

Se tapizó el fondo de los pozos con 20 µg/ml del péptido sintético de HAP2 en un volumen de 100 µl por pozo, se cubrió con papel encerado y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se realizaron 5 lavados con la solución de lavado, aplicando 100 µl por pozo. Después se realizó el bloqueo con 100 µl de la solución bloqueadora por pozo y se incubó 1 hora a 4 °C. Se lavó 5 veces con solución de lavado y se aplicó el anticuerpo primario en una dilución 1 en 100 en

un volumen de 100 μ l por pozo, se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron otros cinco lavados. Se agregó el conjugado en una dilución de 1 en 1000 en un volumen final de 100 μ l por pozo y se incubó 2 horas a temperatura ambiente y se hicieron cinco lavados. A continuación se agregaron 100 μ l de sustrato por pozo y se dejó reposar durante 12 minutos, después de agregaron 100 μ l de solución de paro por pozo y se realizó la lectura a 450 nm.

V. RESULTADOS.

Obtención de sangre infectada con *B. bigemina*.

En el monitoreo del bovino se observó un incremento progresivo de la temperatura rectal el décimo día postinoculación que el animal presentaba una temperatura de 41.5°C y un Volumen Celular Aglomerado (VCA) de 32% y se realizó el exanguinado el décimo día postinoculación por la tarde, cuando el animal presentó 41.2°C y un VCA de 27.15%. Los valores de temperatura y VCA se aprecian en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados del monitoreo del bovino

Día Post-inoculación	Temperatura	Hematocrito	Parasitemia
5	38.8°C	32%	
6	39°C	30.6%	
7	39.5°C	31.3%	
8	39.2°C	31%	
9	40°C	30.2%	1%
10	40.5°C	30%	>1%
10 por la tarde	41.2°C	26.3%	>1%

Una vez colectada la sangre infectada el bovino fue tratado con una dosis de Diaceturato de diaminozeno por dos días consecutivos y se recuperó satisfactoriamente.

Identificación de *Hap2* de *B. bigemina* mediante PCR.

Mediante la técnica de PCR se amplificó el gen *hap2* de *B. bigemina* a partir de ADN extraído de sangre de bovino infectada. El amplicón obtenido se analizó mediante electroforesis y se visualizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los resultados mostraron un amplicón de 1500pb en la muestra analizada (figura 4, carril2). No se observó amplificación en la muestra control negativo (Carril 3) que no contenía ADN.

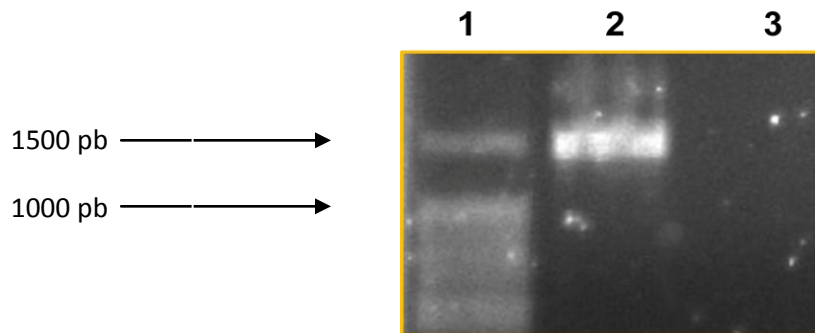


Figura 4. Amplificación del gen *hap2* de *B. bigemina*. Carril 1) Marcador de pares de bases de ADN, Carril 2) ADN de *B. bigemina*, Carril 3) Muestra sin ADN. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Evaluación de la expresión del gen *hap2* en fases sexuales de *B. bigemina*.

Los anticuerpos contra el péptido sintético de HAP2 generados en conejos se emplearon en la técnica de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de esta proteína en fases intraeritrocíticas y fases sexuales de *B. bigemina*. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 5. Se puede observar que los sueros de dos conejos inmunizados con HAP2 contienen anticuerpos que generan una señal positiva en parásitos intraeritrocíticos (B y F) y en fases sexuales (D y H). Los sueros preinoculación de ambos conejos incubados con muestras de parásitos intraeritrocíticos y de fases sexuales dieron señal negativa.

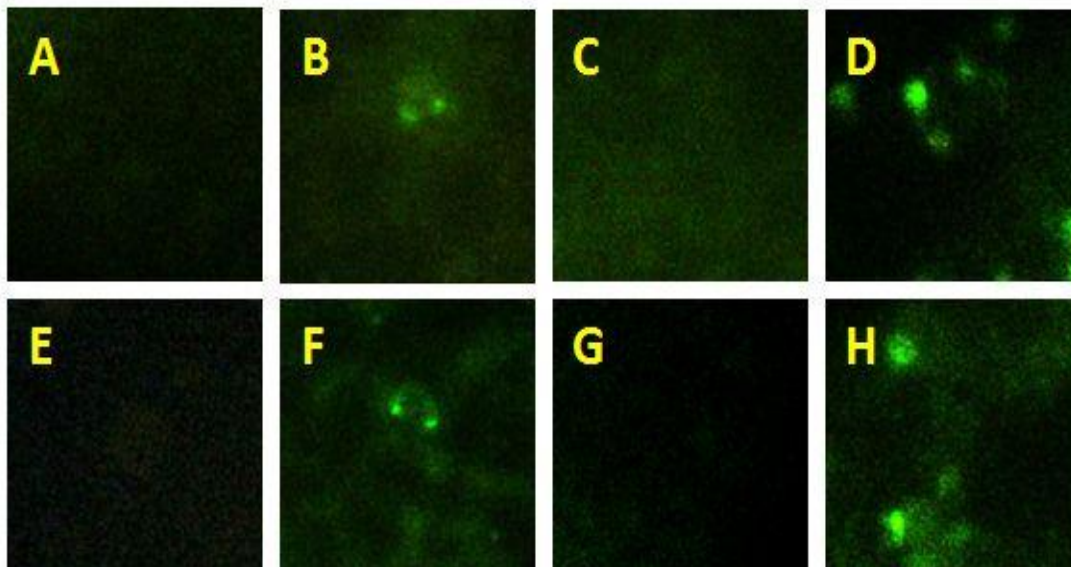


Figura 5. Expresión de HAP2 de *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta. Parásitos intraeritrocíticos (A, B, E y F) y fases sexuales (C, D, G y H) de *B. bigemina* fueron incubados con sueros de dos conejos contra HAP2 (B, F, D y H) y visualizados con un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los paneles A, E, C y G muestran resultados con los sueros de los dos conejos preinmunización. Objetivo de 100X.

Detección de anticuerpos contra HAP2 en bovinos naturalmente infectados con *B. bigemina* mediante la técnica de ELISA.

Los resultados de la evaluación de diez sueros de bovinos infectados con *B. bigemina* se muestran en la gráfica (Figura 6). El valor del punto de corte fue de 0.13788 y a partir de este valor se observó que los diez sueros problema analizados (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 57) estuvieron por debajo del punto de corte significando que son negativos, los valores de los sueros controles negativos (36, 21 y 22) estuvieron por debajo del punto de corte siendo entonces negativos, mientras que los valores de los sueros controles positivos (3082 y 3064) estuvieron por encima del punto de corte, siendo positivos. Estos resultados fueron comprobados por duplicado.

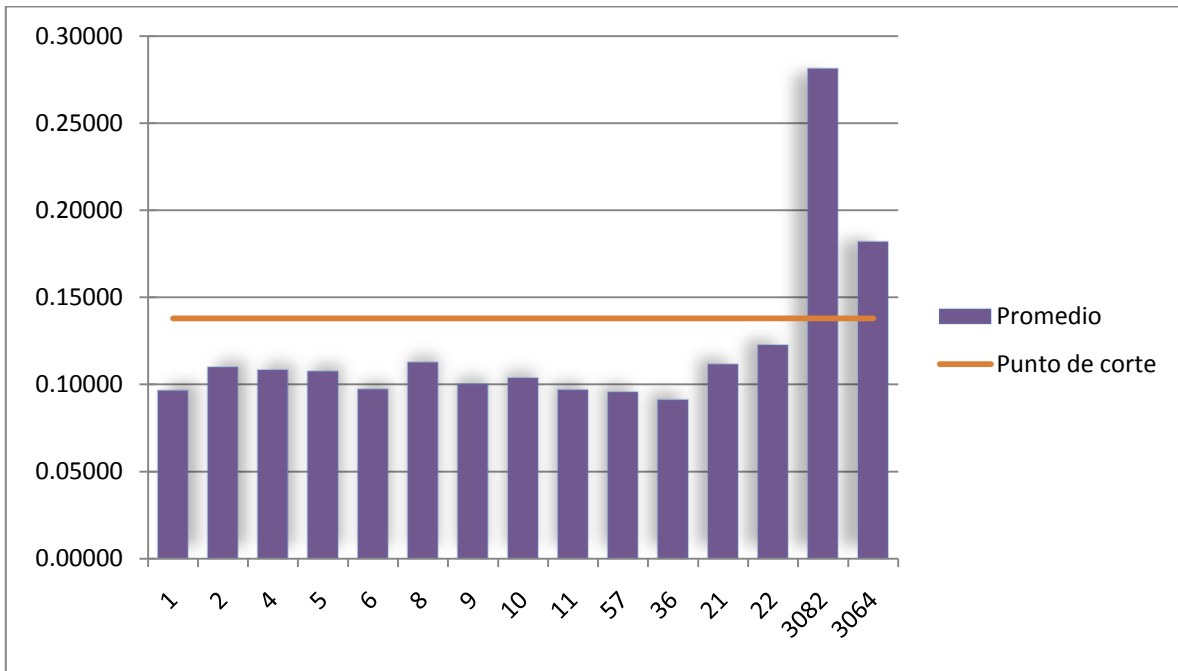


Figura 6. Evaluación de sueros de bovinos naturalmente infectados a la presencia de anticuerpos contra un péptido de HAP2 de *B. bigemina*. Se muestran los valores promedio de tres repeticiones obtenidas de cada suero y su relación al punto de corte.

VI. DISCUSIÓN.

En el genoma de *B. bigemina* se encuentra el gen *hap2*, lo anterior quedó corroborado a través de la amplificación de este gen mediante la técnica de PCR realizada. Al observar los resultados de la amplificación de *hap2* (Figura 4), mediante la electroforesis, se demostró que el ADN de *B. bigemina* fue positivo observándose una banda de aproximadamente 1500 pb, que es el tamaño esperado de acuerdo con los primers utilizados. Se observó también que la muestra que no contenía ADN de *B. bigemina* arrojó resultados negativos pues no se apreció ninguna amplificación, demostrando que los primers son específicos para *hap2* y corroborando que los oligonucleótidos y los reactivos utilizados no estaban contaminados. El hallazgo de *Hap2* en *B. bigemina* tiene implicaciones muy importantes porque *hap2* es un gen que participa la fusión de la membrana de los gametos. A través de estudios moleculares se ha determinado que es un gen que apareció en un ancestro común de plantas y protistas. Además, que la proteína para la que codifica *hap2* es altamente conservada (Steele, 2009). En parásitos como *Plasmodium* que también pertenecen al phylum *Apicomplexa* se ha demostrado que *hap2* está presente y se ha estudiado como un candidato para la creación de vacunas bloqueadoras de la transmisión de la malaria (Blagborough, 2009, Hirai, 2008).

Una vez confirmada la presencia de *hap2* en el genoma de *B. bigemina*, el siguiente paso fue analizar la expresión del gen *hap2* en *B. bigemina* mediante la detección de la proteína a través de la técnica de IFI. Para esto desarrollamos anticuerpos contra HAP2 y analizamos la presencia de la proteína en fases sexuales y fases asexuales. Los trabajos realizados por Hirai (2008) y Blagborough (2009) en diferentes especies de *Plasmodium* demostraron que el gen se expresa durante la reproducción sexual. En los resultados obtenidos de la IFI (Figura 5) se observó que la proteína HAP2 se expresa en fases

intraeritrocíticas y en fases sexuales, este resultado no era el esperado pues en trabajos previos en otros parásitos apicomplexos, HAP2 es específico de las fases sexuales (Hirai, 2008, Blagborough, 2009). Así como en *Plasmodium* se han reportado genes que al igual que *hap2* se expresan específicamente en ciertas fases del ciclo de vida. En *B. bovis*, un parásito que tiene el ciclo de vida muy similar a *B. bigemina*, existen reportes de proteínas que sólo se expresan en determinadas etapas del ciclo de vida; por ejemplo el antígeno de superficie del merozoito 2c (MSA-2c) se expresa en merozoitos y esporozoitos, pero no en quinetos (Rivera, 2008). Pero proteínas como HSP-20 y RAP-1a se han encontrado en fases sexuales y asexuales de *B. bigemina* (Vichido, 2008). Sin embargo, que el parásito exprese la proteína HAP2 también en las fases asexuales de los parásitos indica que quizás ésta proteína puede tener otra función, además de intervenir en la reproducción sexual. De acuerdo con lo observado en las IFIs, cuando *B. bigemina* se encuentra en los eritrocitos la señal positiva de HAP2 se observa con mayor intensidad y distribuida de manera homogénea en el citoplasma del parásito por lo cual existe la posibilidad de que la función de ésta proteína esté implicada en funciones que realiza el parásito durante su vida asexual.

Otro objetivo del trabajo fue analizar la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína HAP2 en los bovinos infectados naturalmente. Para esto, se realizó una prueba de ELISA evaluando sueros de bovinos que fueron diagnosticados positivos a *B. bigemina* por la técnica de IFI. Los resultados obtenidos indicaron que los bovinos naturalmente infectados con *B. bigemina* analizados en este trabajo no tuvieron anticuerpos contra el péptido de HAP2. Estos resultados se corroboraron dos veces y como control positivo de la técnica se utilizaron anticuerpos de bovinos inmunizados con un péptido sintético de otra proteína unido covalentemente al mismo acarreador (KLH) utilizado en este trabajo. Al ser HAP2 un péptido que no es reconocido por el sistema inmune, es

una proteína que no está constantemente bajo selección inmune, por lo cual, se espera que al igual que en otros organismos sea una proteína altamente conservada (Carter, 2001; Steele, 2009, Hirai, 2008). De esta manera, la proteína HAP2 tiene potencial para emplearse en vacunas bloqueadoras de la transmisión al ser una proteína que está presente en la superficie de los gametos. Si bien, el que el bovino no haya desarrollado anticuerpos contra éste péptido de HAP2 puede deberse a que es una proteína que no es lo suficientemente inmunogénica o a que el sistema inmune genera anticuerpos contra alguna otra parte de la proteína y no necesariamente contra el péptido empleado en este trabajo. Este resultado permite conservar la teoría sobre el potencial de ésta proteína para ser usada en vacunas bloqueadoras de la transmisión de acuerdo a lo publicado por Carter (2001).

VII. CONCLUSIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad de importancia a nivel mundial en las zonas tropicales y subtropicales. A la fecha no existen métodos de control eficientes por lo que es necesario realizar estudios en búsqueda de alternativas modernas y eficaces para el control de esta enfermedad tales como las vacunas bloqueadoras de la transmisión.

Para enfermedades como la malaria, se han desarrollado vacunas bloqueadoras de la transmisión haciendo uso de proteínas expresadas en las fases sexuales como HAP2. A través de la técnica de PCR se demostró que la secuencia nucleotídica de *hap2* está presente en el genoma de *B. bigemina*.

Se determinó a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta que HAP2 sí se expresa en fases sexuales de *B. bigemina*. Sin embargo, a diferencia de otros parásitos como *Plasmodium*, HAP2 de *B. bigemina* también se expresa en fases asexuales. Si HAP2 se expresa en fases intraeritrocíticas del parásito es necesario realizar más investigaciones para conocer mejor esta proteína y las funciones que puede tener en las fases asexuales del parásito.

Se observó que los bovinos infectados naturalmente no poseen anticuerpos contra HAP2 indicando que ésta proteína tiene potencial para realizar vacunas bloqueadoras de la transmisión, ya que en el bovino no habría interacción antígeno anticuerpo, pero en la garrapata si podría evitar la fusión de membrana de los gametos.

LITERATURA CITADA.

- Alexander A. 1989. Técnicas Quirúrgicas en animales. Interamericana, 6ta Ed. México D.F.
- Barros CSL, Figuera R. Babesiosis. 2008. In: Foreign animal diseases. 7th edition. Boca Raton, FL: United States Animal Health Association, p.147-158.
- Blagborough A. M., Sinden R. E., 2009. Plasmodium berghei HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. Vaccine 27, 5187–5194. Elsevier Ltd.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W., 2004, Babesiosis of cattle. Parasitology, 129, Cambridge University Press. Printed in the United Kingdom. S247-s269.
- Callow, L.L., Dalgliesh R.J. y De Vos, A.J., 1997, Development of effective Living vaccines against bovine babesiosis The Longest Field Trial? International Journal for Parasitology, vol. 27 No. 7. El Sevier Science. Printed in Great Britain. Milestones in parasitology.
- Chauvin, A. Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin L., 2009. Babesia and its hosts: adaptatiop to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet Res 40:37, DOI: 10.1051/vetres/2009020
- De Vos, A.J. 1992. Recent Developments in the Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proceedings of a Workshop Held at ILRAD, Nairobi, Kenya, 13–15 May 1991: Distribution, economic importance and control measures for *Babesia* and *Anaplasma*. ed. T.T. Dolan. Nairobi: The International Laboratory for Research on Animal Diseases.
- Falcón, N.A., Álvarez JMA., Ramos AJA., Valdez DCE, Figueroa MJV, Mosqueda GJJ, Análisis comparativo de la inducción de Fases intestinales en *B. bigemina* y *B. bovis* en un sistema in-vitro.
- Fernández, M.R. Cantó JG, 1995. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. Revista Veterinaria. Vol: 26, N° 4. Pp: 407.
- García M.J., 2010. Identificación molecular de las especies de piroplasmas en las poblaciones de Ixódidos de la Comunidad Autónoma del País Vasco: Distribución y prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en los ungulados

domésticos y silvestres. Universidad de Zaragoza. Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia. Editores. PP: 36-37

Goff, W.L., Johnson, W. C., Molloy, J.B., Jongensen, W. K., Waldron, S. J.s Figureoa, J. V., Matthee, O., Adams, D. S., McGuire, T.C., Pino, I., Mosqueda, J., Parlmer, G. H., Suarez, C. E., Knowles, D. P., MeElwin, T. F., 2008. Validation of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Babesia Bigemina Antibodies In Cattle. Clinical And Vaccine Immunology, p. 1316–1321 Vol. 15, No. 9, doi:10.1128/CVI.00150-08, American Society for Microbiology.

Hirai, M. Arai, M. Mori, T. Miyagishima, S. Kawai S, Kita, K., Kuroiwa T, Terenius O, Matsuoka H. 2008, Male Fertility of Malaria Parasites Is Determined by GCS1, a Plant-Type Reproduction Factor. Current Biology 18, 607–613, Elsevier Ltd. DOI 10.1016/j.cub.2008.03.045

Hirai, M., Mori, T., 2009, Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. Acta Trop. doi:10.1016/j.actatropica.2009.08.005

Iowa State University College of Veterinary Medicine. 2008. Bovine Babesiosis. www.cfsph.iastate.edu. Última consulta: 14 de septiembre de 2010. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf

Jenkins M.C., 2001, Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of importance, Veterinary Parasitology. Vol. 101 Pp. 291-310

Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The Global Importance of Ticks. Parasitology. Cambridge University Press. United Kingdom. 129, s7-s8.

Kaslow, D. C., 1997. Transmission-Blooming vaccines: Uses and current status of development. International Journal for Parasitology. Elsevier Ltd. Great Britain. Vol.27 n° 2. Pp 183-189.

Kuttler, K.L., 1981, Chemotherapy of babesiosis: a review in Babesiosis. Ristic M. and Kreier, J.P. Eds., Academic Press, New York, 1981, 65.

Kuttler, K.L., 1988, Babesiosis of Domestic Animals and Man: Chemotherapy of babesiosis. CRC Press. P: 229

Levine, N.D. 1971. Taxonomy of the piroplasms. Trans. Am. Microsc. Soc. 90:2-33

Levine, N.D. 1982. Apicomplexa. In Parker, S.P., Synopsis and Classification of

Living Organisms, vol. 1. McGraw-Hill, New York: 571-587.

Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E. & Mehlhorn, H., 1995. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitology Research* 81, 595-604.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2006. *Brock: Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall. Pp: 481,915.

McCosker, P. J., 1981. The global importance of Babesiosis. In Ristic, M. and Kreier, J.P. *Babesiosis* academic Press, New York.

Mosqueda GJJ, Falcón NA, Álvarez MJA, Ramos AJA, Valdez DCE, Figueroa bigemina y *Babesia bovis* en un sistema in vitro. *Memorias de la XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. 27 - 31 de Octubre de 2003. México, D.F

Mosqueda G. J.J., Falcon A. Álvarez J, Ramos A. Oropeza-Hernandez F y Figueroa JV. 2004. *B. bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *IntJParasitol* 34, 1229-1236.

Mosqueda GJJ, Salto SM, Falcón NA, Ramos AJA, Álvarez MJA, Figueroa MJV, Bautista GR, 2006. Estandarización de la Técnica de PCR en Tiempo Real para la Detección cuantitativa de *Babesia bigemina* en muestras sanguíneas. XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Santiago de Chile 2006.

Mosqueda, J.J., Castro, L.A., Falcón, A., Ramos, A., Benítez, D., Alcaráz, E., Figueroa, J. y Alvarez, A., 2007, *In silico* comparative analysis of the glycoprotein 45 in a vaccinal strain and field isolates of *Babesia bigemina* from México and Argentina. *Parassitologia*. University of Rome "La sapienza" Official Journal of the Italian society of parasitology. Lombardo Editore. 49 Supple 1, pag:95

Mosqueda, J.J., Figueroa, J., Alvarez, A., Bautista, R., Falcón, A., Ramos, A., Cantó, J.G. y Vega, C.A., y 2007, Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. *Parassitologia*. University of Rome "La sapienza" Official Journal of the Italian society of parasitology. Lombardo Editore. 49 Supple 1, pag:19-22

OIE, 2009. Fichas técnicas: Babesiosis bovina. Fecha de última consulta 23 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en->

el-mundo/fichas-tecnicas/

- Riek, R. F., 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agric Res. 15, 802-821.
- Rivera R. Y., 2008. Análisis de la expresión del antígeno de la superficie del merozoito 2c (MSA-2c) en quinetos de *B. bovis*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis profesional, Cuernavaca, Morelos.
- Ristic, M., 1980. Protozoal Diseases. Bovine Medicine and surgery: American Veterinary Publications Inc. California. 335-369.
- Rudzinska, M. A., Spielman, A., Lewengrub, S., Trager, W. & Piesman, J. 1983. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 80, 2966-2970. Sahibi, H., Rhalem,
- Smith, R.D., 1978. Ciclo Biológico de *Babesia* en la garrapata. En: Ciencia veterinaria, Editado por Moreno Chan. UNAM, vol. 2,. Pp. 233-264.
- SENASICA. 2010. Campañas zoonosanitaria: Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. Fecha de última consulta 19 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=803>
- Singh, C.D.N., Singh S.D., Verma. 2008. Advanced Pathology and Treatment of Diseases of Domestic Animals: With Special Reference to Etiology, Signs, Pathology and Management. Pág. 203-210.
- Steele RE, Dana CE. 2009. Evolutionary History of the HAP2/GCS1 Gene and Sexual Reproduction in Metazoans. PLoS ONE 4(11): e7680. doi:10.1371/journal.pone.0007680
- Stowers W. A., Kennedy C. M., Keegan P. B., Saul A., Long A. C., Miller H. L., 2002. Vaccination of Monkeys with Recombinant Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Confers Protection against Blood-Stage Malaria. American Society for Microbiology. 70:6961-6967
- Torina A. , Agnone A. , Sireci G. , Mosqueda J. J. , Blanda V. , Albanese I. , La Farina M. , Cerrone A. , Cusumano F. Caracappa S. 2009 Characterization of the Apical Membrane Antigen-1 in Italian Strains of *B. bigemina*. Universidad de Palermo. Italia. Pp: 52-56

- Quiroz, R. H. 2005, Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, SA de CV. México, D.F. Pág.: 187-199.
- Vichido R., Falcon A., Ramos J A., Alvarez A., Figueroa, J V., Norimine J., Brown,W C., Castro, L A., Mosqueda J., 2008. Expression Analysis of Heat Shock Protein 20 and Rhoptry-associated Protein 1a in Sexual Stages and Kinetes of Babesia bigemina. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1149: 136–140. doi: 10.1196/annals.1428.073.
- Vignau, M. 2005, Parasitología práctica y modelos de Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos, UNLP, Argentina, Buenos Aires, Pág.: 34
- Von Besser, K. Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. 2006. Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. Development 133, 4761-4769 (2006) doi:10.1242/dev.02683
- Wong JL, Leydon AR, Johnson MA (2010) HAP2(GCS1)-Dependent Gamete Fusion requires a Positively Charged Carboxy-Terminal Domain. PLoSGenet 6(3): e1000882. doi:10.1371/journal.pgen.1000882
- Wright, I.G. 1990. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasite Babesia sp. and Anaplasma sp. in domestic animals. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9, 345–356.

APÉNDICE.

Lista de materiales empleados para la realización de la tesis.

Material biológico

1. Bovinos experimentales
2. *B. bigemina* Cepa Xochitepec
3. Conejos experimentales
4. Péptido de HAP2 (HRRVFVDVYAFDGDAGVVPD)
5. Suero de Conejo Anti-HAP2

Material de cirugía

1. Alcohol al 70%. Alcoholera del centro, No de Catálogo: 750 13807 00113
2. Algodón. Marca Zuum, No. de Catálogo: 1224
3. Botón grande de 2cm de diámetro
4. Cloruro de Benzal Rojo. Marca Antibenzil de Farmacéuticos Altamirano.
5. Cuerdas para sujeción de bovino, Marca Monitex de Industrial Sisalara, No. de Catálogo: ME-M58
6. Diaceturato 4-4' diazoaminodibenzamidina trihidratada. Marca Ganaseg de Novartis. No. De Registro: MB7605000
7. Instrumental quirúrgico de cirugía general
8. Jabón quirúrgico Verde, Marca Antibenzil de Farmacéuticos Altamirano
9. Jeringas de 5ml, 10ml y 20ml. Marca TERUMO. No. de Catálogo: 389701002736-01, 389701002712-01 y SS+20ES1
10. Lidocaína 2.0 g/100 ml. Marca Xylocaína de AstraZeneca. No. de Catálogo: 0186-0232.
11. Nylon calibre 1, Marca Ethilon, No. de Catálogo: 489T
12. Penicilina G procaínica, penicilina G sódica, estreptomycin y flumetasona. Marca Flumivet 80 de VetilabInternacional.
13. Xilacina al 10%. Marca Procin de PISA

14. Yodopovidona. Marca Germisin de Farmacéuticos Altamirano.

Material de monitoreo y recolección de sangre

1. Aguja vacutainer. Marca Becton Dickinson Eclipse, No. de Catálogo: 368607
2. Bolsa para recolección de sangre. Becton Dickinson Vacutainer Safety lok. No. de Catálogo: 367283
3. Camisa para Vacutainer. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 364893
4. Matraz Kitazato
5. Perlas de vidrio
6. Portaobjetos. Marca Pearl, No. de Catálogo: 7102
7. Termómetro 10047 rectal de mercurio. Marca Le Roy, No. de Catálogo: 729513100471
8. Tubos capilares de vidrio con heparina. Marca Fisher, No. de Catálogo: 02-668-25
9. Tubos Vacutainer de 6ml sin anticoagulante Becton Dickinson, No. de Catálogo: 367815
10. Tubos Vacutainer de 6ml con heparina. Becton Dickinson, No. de Catálogo: 367878.

Material de laboratorio

1. Aceite de inmersión. Marca Zeiss, Immersol 518N, No. de Catálogo 1111-806
2. Caja de Coplin. Marca Wheaton. No de Catálogo: 900470
3. Cámara de incubación
4. Expert Portable Pipet Aid, Marca BD Falcon, No. de Catálogo: 357590
5. Frasco 250ml, 300ml, 500ml y 1l. Marca Pyrex
6. Gradillas para tubos de 15 ml, 50ml y 1.5ml
7. Guantes de nitrilo, Marca Kimberly Clark, No de Catálogo: N220M
8. Marco para ELISA, Marca Becton Dickinson, No de catálogo 353913
9. Matraz de Erlenmeyer. Marca Pyrex

10. Micropipetas de 10µl, 20µl, 200µl y 1000µl. Marca Gilson
11. Pipeta multicanal de 300µl. Marca High Tech Lab, No. de Catálogo: 5424
12. Pipetas desechables de 10ml y de 25ml. Marca Falcon, No de catálogo: 356550 y 357535
13. Piseta
14. Plumón indeleble. Marca Sharpie
15. Portaobjetos. Marca Pearl, No. de Catálogo: 7102
16. Pozos para ELISA. Marca Becton Dickinson, No. de Catálogo: 353279
17. Probetas de 250ml, 500ml y 1l. Marca Pyrex
18. Puntillas de 10µl, 20µl, 200µl y 1000µl. Marca Molecular BioProducts, ART. No de catálogo: 2139, 2149, 2069 y 2275
19. Toallas interdoblas. Marca Sanitas, No de catálogo: 92231
20. Tubos de propileno libres de nucleasas y estériles de 15 ml y 50ml. Marca Falcon. No de Catálogo: 352097 y 352073
21. Vaso de precipitados de 100ml, 250ml, 500ml. Marca Pyrex
22. Viales de 1.5 ml. Marca Fastgene, No de catálogo: KJ306
23. Viales para PCR de 0.5ml. Marca Thistle scientific. No de catálogo: AX-PCR-05D-B
24. Kit de extracción de ADN Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Marca Promega

Equipos

1. Agitador Orbital. Marca Felisa, No de Catálogo: FE-315
2. Agitador Vortex. Marca Daigger, Vortex Genie 2, Cat.22220A
3. Autoclave. Marca Felisa, No de Catálogo: FE-397
4. Balanza de Precisión. Marca Ohaus, Adventurer Pro, No de Catálogo: AV213C
5. Baño María a 60°C. Marca Felisa No. de Catálogo FE-371
6. Cámara de electroforesis. Marca Bio-Rad, No. De Catálogo 170-4467
7. Campana de flujo laminar. Marca Labconco No. de Catálogo: 3620804 DELTA

8. Centrífuga. Marca Sorvall, Legend Mach 1.6 R, No. de Catálogo:75004337
9. Congelador de -20°C. Marca Frigidaire. No de Catálogo: FGCH25M8LW
10. Fotodocumentador. Marca Bio-Rad Doc XR Model Universal Hood, No. de Catálogo: 200902015716
11. Fuente de poder para Electroforesis. Marca Bio-Rad, No. De Catálogo: 165-5052
12. Incubadora. Marca Felisa. No de catálogo: FE-133
13. Lector de ELISA. Marca Bio-Rad Imark microplate reader, No. de Catálogo: 11437
14. Microcentrífuga para hematocrito. Marca Clay Adams, Autocrit II Mod. 0574
15. Microcentrifuga para viales de 1.5ml. Marca Eppendorf, Centrifuga 5418, No. de Catálogo: 22331
16. Microscopio binocular para campo claro. Marca Carl Zeiss Referencia de Catálogo: Axiostar Plus
17. Microscopio Laser Confocal. Marca Leica TCS-SP2
18. Platina. Marca CIMAREC, No. de Catálogo: SP131325
19. Potenciómetro. Marca Hanna, No. de Catálogo 736-HI 2211
20. Refrigerador. Marca Mabe, No de Catálogo: RM43S07B.BLA
21. Termociclador C1000. Marca Bio-Rad, No. de Catálogo 185-1096
22. Ultracentrífuga. Marca IES centra MP4R

Reactivos

1. Acetona. Marca: J.T. Baker, No. de Catálogo: 9006-03
2. Ácido clorhídrico. Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 9535-05
3. Ácido Xanturénico. Marca Sigma, No. de Catálogo: X-3250
4. Adyuvante Montanide ISA 070. Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: f5506
5. Agarosa. Marca invitrogen Ultra pure, No. de Catálogo: 15510-027
6. Agua destilada
7. Agua libre de nucleasas. Marca Promega

8. Alcohol metílico absoluto. Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 9093-68-C
9. Antibiótico-antimicótico. Marca Invitrogen No. de Catálogo: 15240-062
10. Anticuerpo secundario (FITC donkey anti-rabbit IgG). Laboratorios Jackson Immuno Research, No. de Catálogo: 711096152
11. Conjugado de conejo anti-IgG de bovino. Marca Jackson IM. Peroxidase-Conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Bovine IgG (H+L).
12. Etanol desnaturalizado. J.T. Baker, No. de Catálogo: 9014-02
13. Ácido sulfúrico. Marca Sigma, No. de Catálogo: 320501
14. Hidróxido de potasio. Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: 221473-500g
15. Hojuelas de sosa. Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 3722-01
16. Isopropanol. Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 9080-01
17. KCl. Marca J.T. Baker, No. de Catálogo: 3040-01
18. Fosfato biácido de Potasio (KH_2PO_4). Marca Química dinámica SA de CV, No. de Catálogo: 95300
19. Marcador de Peso molecular.
20. Mastermix
21. Medio M199. Marca Sigma, No. de Catálogo: M-5017
22. Metanol. Marca Productos químicos Monterrey SA, No. de Catálogo: 06122
23. Carbonato de Sodio (Na_2CO_3). Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 3602-01
24. Fosfato Dihidrogenado de Sodio (Na_2HPO_4). Marca Productos químicos Monterrey SA, No. de Catálogo: 35932
25. Cloruro de Sodio. Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 3624-01
26. Fosfato monohidrato de Sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$). Marca J.T.Baker, No. de Catálogo: 3818-01
27. Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3). Marca Merck, No. de Catálogo: 1.06329.0500
28. Percoll. Marca Sigma No. de Catálogo: P-1644
29. Proteinasa K
30. Sustrato diluido. Marca Amresco TMB LIQUID-1 COMPONENT

31. Tinción de giemsa. Marca Merck KGaA

32. Tween 20, Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: 63158

33. Xileno (C8H10). Marca Sigma Aldrich, No. de Catálogo: X1040-4L

Soluciones

TAE (1x)

TAE 40x	25 ml
Agua destilada	975 ml
Volumen Final	1 litro

PBS (10X) pH 7.2 (IFI)

NaCl	80.06 g
KCl	2.23 g
Na₂HPO₄	11.35 g
KH₂PO₄	2.72 g
Agua destilada	Cbp 1 L

PBS (1X) pH 7.2 (ELISA)

Na₂HPO₄	0.23 g
Na₂HPO₄	1.18 g
NaCl	9.00 g
Agua destilada	Cbp 1 L

Solución de Bloqueo al 3% ELISA

Leche Svelty	3 g
PBS	Cbp 100ml

Solución Buffer de carbonatos ELISA pH 10.3

Carbonato de Sodio	10.60 g
Bicarbonato de Sodio	975 ml
Agua Destilada	Cbp 100 ml

Solución de lavado para ELISA

Tween 20	1.5 ml
PBS	Cbp 300ml

Solución de dilución de anticuerpos para ELISA

Tween 20	1.5 ml
PBS	Cbp 300ml

Solución de paro para ELISA

H₂SO₄	.15 M
------------------------------------	-------