



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA
CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *hap2*
EN *Babesia bigemina***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA

I.B. MARISOL KARINA ROCHA MARTÍNEZ

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ

DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

MÉXICO, D.F.

ENERO 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

TUTORES

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ
DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

ASESORES Y LECTORES

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ
DR. MÁXIMO B. MARTÍNEZ BENÍTEZ
DRA. MAVIL LÓPEZ CASAMICHANA
DR. ISRAEL LÓPEZ REYES

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas; bajo la dirección de la Dra. Minerva Camacho Nuez y el Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito. Se contó con la asesoría de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez, el Dr. Máximo B. Martínez Benítez, la Dra. Mavil López Casamichana, y el Dr. Israel López Reyes. El proyecto fue financiado con fondos del proyecto CONACyT SB-2007 No. 78921.

Agradezco sinceramente a la Dra. Minerva Camacho por darme la oportunidad de realizar está proyecto de Maestría; por sus atinados consejos cuando los necesité y sobre todo, por el apoyo incondicional para realizar este trabajo.

Al Dr. Juan Mosqueda, le agradezco su asesoría y el tiempo empleado para la realización de este proyecto.

A los Doctores Elizbeth y Maximino, Agradezco sinceramente, el tiempo empleado para la revisión y asesoría de este trabajo.

Les agradezco profundamente a los Doctores Juan Alberto Ramos Aragón, Alfonso Falcón y Juan Diego Pérez De La Rosa por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

Agradezco principalmente a mis padres: Leopoldo Rocha y Yolanda Martínez, por su apoyo incondicional que siempre he recibido; por sus palabras de aliento cada que lo he necesitado y por ser personas que me inspiran a siempre seguir adelante.

A Diego por caminar a mi lado a lo largo de estos años; por siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que necesite y por no dejarme abandonar lo que un día inicie con tanta ilusión.

A las dos personitas que en este momento llenan mi vida y corazón de alegría, ilusión y sueños y que sin duda nada sería igual sin ellos: Samy y Alex

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
LA BABESIOSIS	1
DISTRIBUCIÓN.....	2
TAXONOMÍA DE BABESIA spp.....	4
SIGNOS CLÍNICOS	5
DIAGNÓSTICO DE BABESIOSIS.....	6
INMUNIDAD.....	8
CICLO BIOLÓGICO DE Babesia	9
PROCESO DE INVASIÓN.....	11
MEDIDAS DE CONTROL CONTRA BABESIOSIS.....	14
GENOMA DE <i>B. bovis</i>	17
GENOMA DE <i>B. bigemina</i>	18
ANTECEDENTES DIRECTOS	19
2.-HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
4.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28

5.- METODOLOGÍA.....	32
MATERIAL BIOLÓGICO	32
LAVADO DE SANGRE.....	32
INDUCCIÓN DE LAS FASES SEXUALES.....	32
EXTRACCIÓN DE DNA	33
IDENTIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DEL GEN <i>hap2</i> DE <i>B. bigemina</i>	34
AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR Y PURIFICACIÓN DEL GEN <i>hap2</i>	35
CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>hap2</i> DE DIFERENTES REGIONES GEOGRÁFICAS DEL MUNDO.....	35
ANÁLISIS DEL GRADO DE CONSERVACIÓN DE <i>hap2</i> EN DISTINTAS CEPAS DE <i>B. bigemina</i>	36
EXTRACCIÓN DE RNA	37
ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN <i>hap2</i> MEDIANTE RT-PCR.	38
DISEÑO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	38
INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HAP2 EN FASES SEXUALES Y ERITROCITOS INFECTADOS.	39
IDENTIFICACIÓN DE HAP2 DE <i>B. bigemina</i> MEDIANTE WESTERN BLOT.....	40
6.- RESULTADOS	41
BUSQUEDA BIOINFORMATICA DEL GEN <i>hap2</i> EN <i>B. bigemina</i>	41

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>hap2</i> DE CEPAS DE REGIONES GEOGRÁFICAS DIFERENTES.	46
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>hap2</i>	51
LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HAP2	52
IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HAP2	54
7.- DISCUSIÓN	56
8.-CONCLUSIONES	63
9.- PERSPECTIVAS.....	64

1.- INTRODUCCIÓN

LA BABESIOSIS

La babesiosis es una enfermedad infecciosa causada por un protozooario *Apicomplexa* intraeritrocítico del género *Babesia*, que infecta un amplio rango de animales domésticos y ocasionalmente al hombre. Las investigaciones sobre la babesiosis se remontan al año 1880, cuando se reportó en Rumania una enfermedad presente en el ganado conocida como hemoglobinuria enzoótica. El Dr. Víctor Babes, médico-biólogo rumano, fue el primero en descubrir microorganismos piriformes dentro de eritrocitos de bovino, enfermos con hemoglobinuria bovina (Hunfeld *et al.* 2008).

Posteriormente, Smith y Kilborne en 1983 detectaron en Estados Unidos el agente causal de la fiebre Texas, el cual fue denominado *Pyrosoma bigeminum*; además, pudieron demostrar que este agente era transmitido por garrapatas. En este mismo año, Starcovici renombra a estos parásitos como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, en reconocimiento a los trabajos del Dr. Babes (Starcovici, 1983; Uilenberg *et al.* 2006).

La babesiosis es transmitida por garrapatas y se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. De los diferentes tipos de babesiosis una de las más importantes es la bovina la cual puede ser causada por cuatro diferentes especies de *Babesia*: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *B. major* (Okamura *et al.* 2007). Sin embargo, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son las especies con un mayor impacto económico debido a las elevadas pérdidas económicas provocadas por la disminución en la producción de carne y leche en hatos afectados, así como elevados costos de los

tratamientos instaurados, control del vector y muerte de los animales afectados (Bock *et al*; 2004).

Los métodos de control actuales están basados en dos aspectos: uno es el control de las garrapatas transmisoras mediante agentes garrapaticidas y el segundo es el uso de químicos terapéuticos que eliminan al patógeno del organismo. Ambos métodos tienen desventajas ambientales, de generación de resistencia y el costo, además de un tiempo de retiro que impide la comercialización de la carne para consumo humano de forma inmediata. A la fecha no hay vacunas efectivas contra esta enfermedad pues las pocas existentes son hechas con microorganismos vivos atenuados, y por lo tanto, tienen limitaciones por el riesgo de transmisión de enfermedades o la dificultad para producir cantidades comerciales y sus costos de producción elevados. Las vacunas a base de antígenos específicos de estadios eritrocíticos asexuales no han sido del todo satisfactorias y no hay vacunas a base de antígenos de fases sexuales que puedan usarse para bloquear la transmisión de la enfermedad a bovinos susceptibles. Se hipotetiza que una vacuna exitosa contra la babesiosis bovina debe contener antígenos de ambos estadios del patógeno.

DISTRIBUCIÓN

Los principales vectores que transmiten la babesiosis bovina son las garrapatas del género *Boophilus*: *B. microplus*, *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *B. geigyi* y *B. calcaratus*. La distribución del parásito está íntimamente ligada a la presencia del vector transmisor (Tabla 1) y los factores limitantes de la presencia de la garrapata transmisora son la temperatura y la humedad relativa.

La distribución de la babesiosis bovina a nivel mundial incluye África, Asia, Australia, Europa y América abarcando desde el sur de Estados Unidos, México y hasta el norte de Argentina. Las especies de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* están ampliamente distribuidas en muchos países que se localizan entre los paralelos 40° Norte y 32° Sur (Bock *et al.* 2004). Estas áreas corresponden a las zonas tropicales y subtropicales del mundo y este patrón de distribución se caracteriza por la presencia de la garrapata vector *Boophilus* (Solorio-Rivera 1997, Rodríguez 1997).

En México, la babesiosis bovina es causada por *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos parásitos son transmitidos por las garrapatas *B. microplus* y *B. annulatus*, recientemente reclasificadas como *Rhipicephalus*, las cuales son las únicas especies de garrapatas de este género que parasitan al ganado bovino presente en México.

La babesiosis requiere de la presencia del vector transmisor, por lo que las regiones libres de garrapatas *Rhipicephalus* son consideradas como regiones libres de babesiosis. En la Figura 1 se muestra un mapa con la distribución de *Rhipicephalus* en México.

Estimaciones recientes indican que el 75% del ganado en México (aproximadamente 22 millones de cabezas) viven en zonas donde la garrapata transmisora es endémica y por lo tanto están en riesgo de contraer babesiosis (Mosqueda *et al.*; 2008).



Figura 1 Distribución de la garrapata *Rhipicephalus* en México (Fuente: <http://www.senasica.gob.mx>).

TAXONOMÍA DE *BABESIA* spp.

Según Levine (1980) la clasificación taxonómica de *Babesia* es la siguiente:

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

Tabla 1. Distribución mundial de las especies de *Babesia* más importantes en la industria ganadera y sus vectores (De Waal and Combrink; 2006).

Especie	Garrapata vector	Distribución
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus decoloratus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i> , <i>Rhipicephalus evertsi evertsi</i>	África, Asia, Australia, América Central, Sur de Europa
<i>Babesia bovis</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i>	África, Asia, Australia, América Central, Sur de Europa
<i>Babesia divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Noroeste de Europa, España, Reino Unido, Irlanda y Tunisia

SIGNOS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son provocadas por los estadios reproductivos asexuales del parásito en el eritrocito del hospedero y la subsiguiente lisis de estas células, lo que provoca una serie de eventos clínicos y patologías que pueden variar según sea la especie con la que esté infectado el bovino.

La babesiosis causada por *B. bovis* se caracteriza por provocar fiebre mayor a los 40°C por un periodo de entre 3 a 7 días, presente normalmente antes de que el bovino manifieste algún otro signo clínico; posteriormente el bovino

infectado presentará inapetencia, depresión, hiperpnea, dificultad para moverse y regularmente hemoglobinuria; y en los casos más severos esta enfermedad causa anemia e ictericia. La fiebre característica mencionada anteriormente puede provocar en bovinos hembras preñadas abortos y en bovinos machos fertilidad reducida durante un lapso de 6 a 8 semanas. Por todo lo anterior, el resultado de esta enfermedad si es mal monitoreada suele ser la muerte (Bock *et al* 2004; Vos and Potgieter 1994).

La patogénesis causada por *B. bigemina* está enfocada a la destrucción de eritrocitos; la hemoglobinuria está presente en todos los casos, la fiebre suele ser menos severa que la provocada por *B. bovis* y los periodos son considerablemente más cortos, regularmente el ganado afectado por *B. bigemina* se recupera rápidamente, sin embargo en algunos casos la enfermedad se puede desarrollar rápidamente con anemia severa e ictericia lo que puede provocar la muerte con advertencias mínimas y en periodos cortos (Bock *et al.* 2004; Dalgliesh *et al.* 1995).

DIAGNÓSTICO DE BABESIOSIS

Tradicionalmente, el diagnóstico de la Babesiosis bovina involucra el reconocimiento e identificación de los estadios parasíticos intraeritrocíticos y se basa en parte, en el tamaño, la morfología y las características de tinción. El tamaño y la morfología son los principales parámetros de diagnóstico de la especie causal; y un microscopio calibrado es la herramienta esencial en un laboratorio de diagnóstico. El método de diagnóstico relativamente más simple y que más frecuentemente se ha utilizado es la observación directa al microscopio de los parásitos intraeritrocíticos presentes en extensiones de

sangre teñidas con colorante de Giemsa. Este método es bastante sensible, económico y relativamente fácil de implementar; sin embargo, es considerado como tardío, exhaustivo y dependiente de la experiencia de un técnico microscopista. Independientemente de las desventajas citadas, el método ha sido utilizado como la primera herramienta de trabajo para la identificación y confirmación de la babesiosis bovina con presentación en forma aguda (Figueroa *et al.* 1992; 2003).

Los métodos inmunológicos son una alternativa diagnóstica para la babesiosis, los cuales están basados principalmente en la identificación de anticuerpos circulantes producidos por el hospedero hacia los antígenos babesiales. A los métodos inmunológicos, aún cuando se ha reportado que son sensibles, se les atribuyen algunas desventajas; porque los anticuerpos circulantes permanecen solo algún tiempo después de iniciada la infección, o pueden persistir por mucho tiempo posterior a la resolución de la infección (Buening 1991; Figueroa 1995).

La prueba más recientemente implementada es la de PCR, la cual permite la amplificación *in vitro*, de secuencias específicas de ADN. Esta técnica ha empezado a ser utilizada para el diagnóstico por las ventajas que ofrece como son: elevada sensibilidad, especificidad y velocidad, sin embargo los problemas asociados a la contaminación de amplicones limita el amplio uso de esta técnica (Buening and Figueroa, 1994; Gillespie, 1990).

INMUNIDAD

La respuesta inmune del bovino ante la infección con *B. bovis* o *B. bigemina* envuelve mecanismos de la respuesta inmune innata así como de la adquirida; sin embargo la inmunidad innata no es específica y depende de factores tales como los genéticos, la edad del hospedero y la respuesta inmunitaria (Bock *et al.* 2004; Shoda *et al.* 2000).

Las células de la respuesta inmune innata son las responsables de controlar la velocidad de crecimiento de la parasitemia y por lo tanto la extensión de la parasitemia, es por ésto que, en ausencia de macrófagos y células NK, la parasitemia aumenta rápidamente en cortos periodos de tiempo. Una característica importante tanto de los macrófagos como de las células NK es la capacidad que tienen para producir mediadores solubles como: Interferón gama, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, en respuesta a una gran variedad de estímulos causados por infecciones (Bock *et al.* 2004; Shoda *et al.* 2000).

La respuesta inmune adquirida es de vital importancia para la recuperación del bovino. Tanto para *B. bovis* como para *B. bigemina* el papel de los linfocitos CD4⁺ que producen citocinas que activan las células fagocíticas; y la producción de anticuerpos por los linfocitos B son mecanismos que juegan un papel definitivo (Brown *et al.* 2001).

La mayoría de las cepas de Babesia son de un hospedero específico y regularmente la esplenectomía es necesaria para el establecimiento de la infección en un hospedero no específico; además se ha observado que los bovinos esplenectomizados desarrollan una parasitemia más alta ante la

infección con *Babesia*, estas observaciones indican que el bazo juega un papel de suma importancia en la respuesta inmune contra *Babesia* spp ((Bock *et al.* 2004)

CICLO BIOLÓGICO DE *Babesia*

El ciclo biológico de *Babesia* es un proceso complejo en el que se involucran dos hospederos; uno vertebrado y otro invertebrado, en los cuales se reproduce el parásito de forma asexual y sexual, respectivamente (Scholtyseck, 1973).

El ciclo comienza con la inyección de los esporozoítos de *Babesia* al bovino hospedero cuando las garrapatas *Boophilus* se alimentan del mismo, infectando directamente a los eritrocitos. Los esporozoítos penetran la membrana celular de los eritrocitos mediante un mecanismo basado en proteínas localizadas en organelos de un complejo apical especializado, una vez que éstos se encuentran dentro del eritrocito se transforman a trofozoítos y, posteriormente, se desarrollan dos merozoítos mediante el proceso de fisión binaria(Hunfeld *et al*; 2008).

Una vez desarrollados los merozoítos, la célula hospedera es destruida por éstos, e inmediatamente infectan a otros eritrocitos. Cuando la garrapata se alimenta con sangre infectada con merozoítos eventos cambios en el intestino de la garrapata tales como: cambios en el pH, la temperatura y las concentraciones de bióxido de carbono, que estimulan a los estadios intraeritrocíticos a desarrollarse en cuerpos rayados o strahlenkörper, los cuales se unen en agregados para dar lugar a los gametos que se fusionan en parejas para formar el cigoto (Bock *et al*; 2004).

Este cigoto infecta específicamente a las células basófilas del intestino de la garrapata; dentro de las cuales se forma un cuerpo de fisión que da origen a formas móviles conocidas como quinetos (vermículas), éstos lisan las células basófilas y vía hemolinfa infectan a una gran variedad de células y tejidos incluyendo los ovarios. Dentro del huevo los quinetos infectan los embriones de la garrapata, a este evento se le denomina transmisión transovárica y conforme se desarrolla el embrión existe otra multiplicación de quinetos. Cuando una larva de garrapata eclosiona, los quinetos migran hacia las glándulas salivales formando cuerpos redondos conocidos como esporontes; de cada uno de éstos se desarrollan cientos de cuerpos piriformes conocidos como esporozoítos; cuando una garrapata se alimenta de un nuevo hospedero bovino los esporozoítos son inyectados junto con la saliva del vector, completando así el ciclo biológico (Fig. 3) (Bock *et al*; 2004).

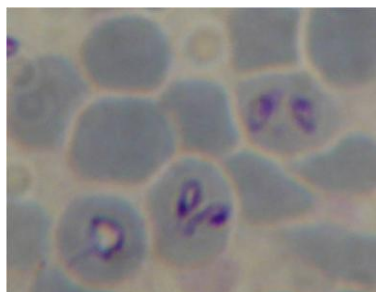


Figura 2. Eritrocitos de bovino infectados con *Babesia bigemina*. (Tinción de Giemsa)

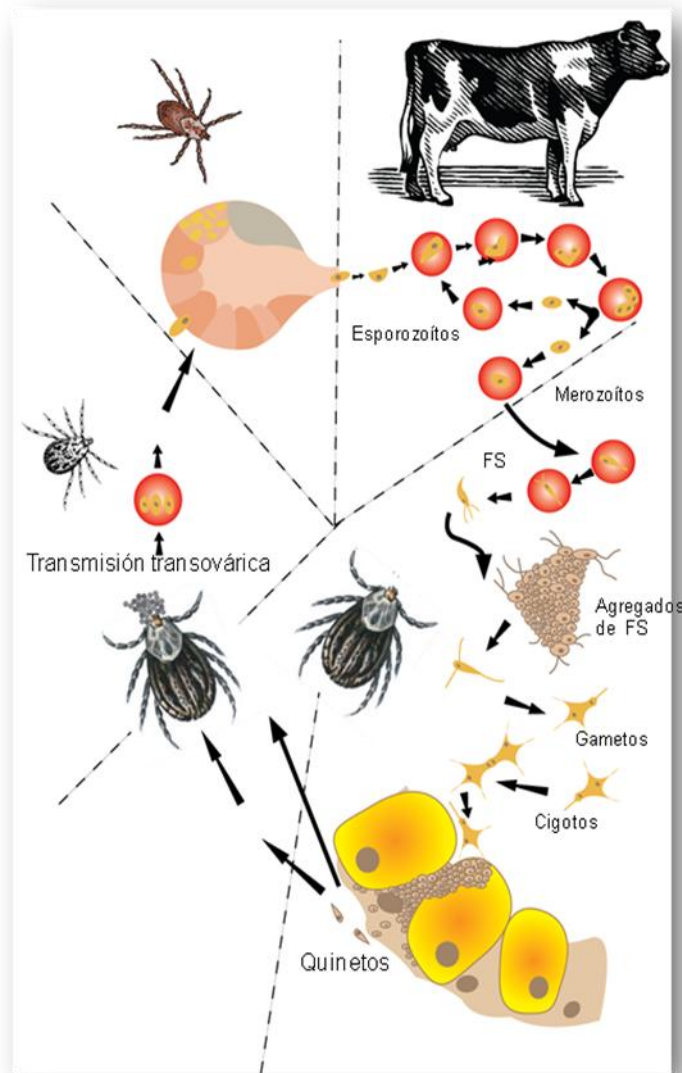


Figura 3. Ciclo biológico de *Babesia bigemina* (Bock et al; 2004).

PROCESO DE INVASIÓN

La interacción molecular entre los merozoitos de *Babesia* y los eritrocitos del hospedero hasta la fecha no es comprendida en su totalidad; sin embargo, el proceso invasivo de los eritrocitos es indispensable para el desarrollo de la babesiosis. Los parásitos apicomplexos como la *Babesia* tienen la característica de tener un organelo llamado complejo apical, el cual está compuesto por roptrias, micronemas y densos gránulos; gracias a este

organelo los parásitos secretan proteínas de importancia para la invasión celular (Blackman and Bannister 2001).

En el paso inicial de la invasión de los eritrocitos, *Babesia* utiliza moléculas de superficie que permiten unirse efectivamente a los eritrocitos; miembros de la familia VMSA se han propuesto como moléculas que juegan un papel importante en la adhesión inicial de los merozoitos y esporozoitos durante la fase de invasión (Mosqueda *et al.* 2002). Esta familia de proteínas se caracteriza por tener una región amino terminal hidrofóbica, un péptido señal, una región central hidrofóbica y una región carboxilo terminal altamente conservada de 54 pb con una secuencia señal de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Los experimentos *in vitro* referentes a estas proteínas han demostrado que anticuerpos específicos para estas moléculas son capaces de bloquear la invasión de merozoitos; lo que sugiere, que estas proteínas son de relevancia para una exitosa invasión de los eritrocitos hospederos (Florin-Christensen *et al* 2002; Mosqueda *et al.* 2002).

En varias especies de *Babesia* la proteína RAP-1 (Rhoptry-Associated Protein-1) ha sido estudiada, y los reportes indican una importante participación por parte de ésta en la invasión de los eritrocitos; ya que anticuerpos específicos contra RAP-1 impiden la interacción de esporozoitos con eritrocitos blancos del bovino, inhibiendo significativamente la proliferación de *Babesia in vitro* (Mosqueda *et al.* 2002).

En *B. bovis* RAP-1 es codificada por dos arreglos en tandem idénticos de genes *rap-1a* y se encuentra altamente conservada en diferentes aislados. Esta proteína tiene un peso molecular estimado de 60 kDa y se encuentra localizada

en la superficie apical dentro de las roptrias de los merozoitos (Yokoyama *et al.* 2006).

La proteína AMA-1 (Apical membrane antigenic), de aproximadamente 82 kDa, que tiene un pequeño carboxilo terminal y un dominio extracelular conservado de 14 cisteínas, el cual se sugiere está envuelto en la formación de puentes disulfuro típicos de AMA-1 en especies de *Plasmodium* y la proteína de membrana BbTRAP (Thrombospodin-related- *Babesia bovis*) de 75kDa que se caracteriza por presentar un dominio von Willebrand tipo A (vWfA), un dominio trombospondina tipo 1 (TSP1), una región transmembranal conservada y una región carboxilo terminal conservada, son dos moléculas recientemente reportadas como producto de las micronemas en esporozoitos de *B. bovis*, los anticuerpos específicos para cada una de ellas inhibe la invasión de eritrocitos por merozoitos de *B. bovis* (Howell *et al.* 2003; Gaffar *et al.* 2004).

Los estudios antes mencionados han propuesto que la invasión intraeritrocítica se da en de la siguiente manera: 1.- El parásito se adhiere al eritrocito; 2.- Posteriormente existe una reorientación del parásito, y es posible que en estas dos etapas algunas moléculas de superficie como lo son las de la familia VMSEA estén interaccionando con el eritrocito. 3.- El parásito se une al eritrocito. 4.- Empieza la invasión, en este paso RAP-1 es secretada de las roptrias y TRAP y AMA-1 de las micronemas. 5.- El parásito se encuentra internalizado (Fig. 4) (Yokoyama *et al.* 2006).

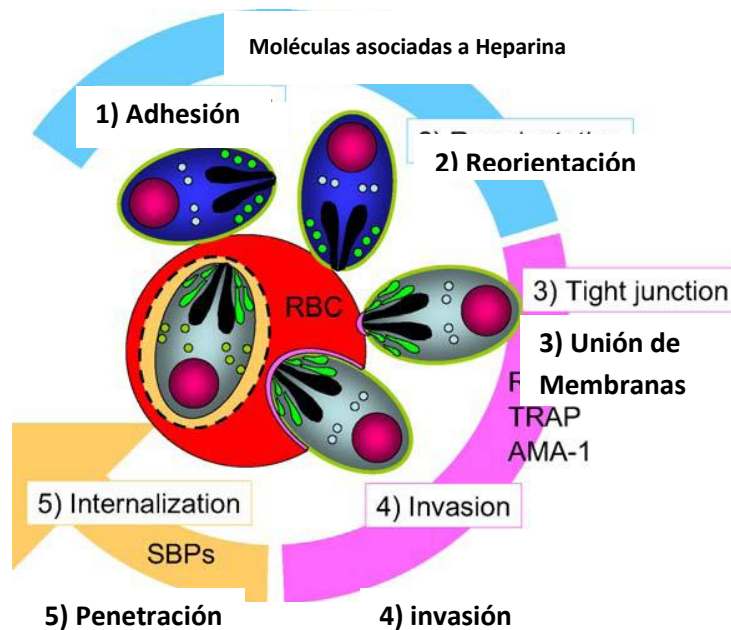


Figura 5. Representación esquemática del proceso de invasión del eritrocito por *Babesia* (Modificada de Yokoyaha *et al.* 2006).

MEDIDAS DE CONTROL CONTRA BABESIOSIS

A lo largo de los años han surgido una gran variedad de medidas de control contra la babesiosis bovina, como lo son los agentes quimioterapéuticos que han sido utilizados en gran medida. Dentro de estos productos se encuentran el aceturato de diminazeno y el imidocarb con periodos de protección de dos semanas a dos meses (Potgieter; 2004).

El control de la garrapata vector basado en agentes químicos y biológicos es ampliamente utilizado en todo el mundo. Los acaricidas resultan ser una medida de control temporal, y son útiles en áreas epidémicas donde normalmente la garrapata puede ser considerada como un invasor temporal. En áreas endémicas donde normalmente ocurre la enfermedad y el vector tiene una presencia permanente, esta medida de control resulta ser costosa y

laboriosa aunado a que el uso indiscriminado de estas sustancias ha propiciado el desarrollo de resistencia (De Waal *et al.*; 2006). Como control biológico del vector se han utilizado vacunas de tipo recombinante; sin embargo los resultados han sido poco favorables. Como ejemplo de vacunas recombinantes se tiene la TickGARD y la GAVAC elaboradas con la proteína recombinante BM86 y que han sido comercializadas en Australia y Cuba, respectivamente. No obstante, estas vacunas han resultado insensibles a algunos aislados. Sin embargo estudios han reportado cambios en la proteína BM86 de diferentes aislados, la cual podría ser la razón de la inespecificidad de las vacunas (Boue *et al.*, 1999; Garcia-Garcia *et al.*, 2000).

Durante décadas, la vacunación con parásitos vivos atenuados derivados de bovinos esplenectomizados, ha sido una herramienta utilizada ampliamente y ha demostrado ser la principal medida para controlar la babesiosis bovina en muchas partes del mundo (Fish *et al.*, 2008). A finales del siglo XIX, los investigadores notaron que los animales que se recuperaban de babesiosis desarrollaban inmunidad y que la sangre recuperada de estos animales no producía en otros bovinos una infección severa. De inmediato esta estrategia se empezó a emplear en diferentes países (De Vos and Potgieter, 1994; Benavides *et al.* 2000). Las vacunas vivas atenuadas se basan en la aplicación de sangre infectada con cepas de *Babesia* que fueron previamente atenuadas por pases en bovinos esplenectomizados. La importancia relativa de diferentes especies de *Babesia spp* en diferentes países dicta la composición de la vacuna; estas vacunas están compuestas de eritrocitos infectados con la especie de *Babesia* de interés (De Vos & Jorgensen, 1992)

El mecanismo por el cual se produce la atenuación no está completamente entendido, sin embargo; se cree que se obtiene una menor subpoblación del parásito virulento o bien una regulación negativa de un gen de virulencia, la atenuación rara vez se lleva por completo y la reversión de la virulencia puede llegar a ocurrir. La atenuación ocurre generalmente después de 8 a 20 pases (Carson et al. 1990; Timms, Stewart & de Vos, 1990).

Aunque la vacunación de este tipo ha resultado muy eficaz, las vacunas atenuadas presentan ciertas desventajas. Debido a que las vacunas están constituidas por parásitos que conservan un grado de virulencia, el brote de la enfermedad en bovinos susceptibles después de una inoculación puede desencadenarse en cualquier momento; así mismo, por ser una vacuna que debe ser crecida en sangre de animales donadores, el riesgo de una transmisión de patógenos es muy alto. Por otra parte, los problemas de transportación en cadena fría que presenta este tipo de vacuna es una limitante para su uso en brotes de campo (Bock *et al*; 2004. Fish *et al*; 2008).

El uso de vacunas con parásitos inactivados o también conocidas como vacunas muertas, consiste en la aplicación de sangre infectada con parásitos inactivados. Un ejemplo de este tipo de vacunas son las que proceden de cultivos *in vitro*; las vacunas basadas en organismos derivados de cultivo, tienen menor riesgo de contaminación debido a que todos los componentes del cultivo son controlados de una mejor manera en comparación con la sangre de los animales donadores en las vacunas vivas atenuadas (Fish *et al*; 2008). Por otro lado, un cultivo a largo plazo, puede resultar en la pérdida de virulencia similar a la observada en vacunas vivas atenuadas con varios pases en

becerros esplenectomizados. Las vacunas procedentes de cultivo *in vitro* han sido utilizadas con resultados parciales en la inmunidad protectora, esto se debe en gran medida a la pérdida de inmunogenicidad de las clonas vacunales después de un cultivo a largo plazo (Fish *et al*; 2008; Vos and Bock; 2000).

GENOMA DE *B. bovis*

El genoma de *Babesia bovis* está compuesto de un genoma nuclear y dos genomas extracromosomales ricos en A+T: un apicoplasto y un mitocondrial (Tabla 2).

El genoma nuclear de 8.2 Mb de longitud consta de cuatro cromosomas de 2.62, 2.59, 1.73 y 1.25 Mb, tres acrocéntricos y un submetacéntrico. Este genoma contiene tres operones de RNAr, dos en el cromosoma tres y uno en el cromosoma cuatro. Dentro de las secuencias codificantes 44 secuencias codifican para RNAt distribuidos en los cuatro cromosomas y 3671 genes para proteínas nucleares; (Brayton *et al*; 2007).

El genoma apicoplasto es de 33 kb y codifica para 32 proteínas putativas, además de un conjunto de genes para RNAt y un gen para la subunidad pequeña y grande de RNAr. Este genoma es extremadamente rico en A+T (78.2%) en contraste al genoma nuclear (58.2%) (Brayton *et al*; 2007).

El genoma mitocondrial de 6 kb, contiene genes que codifican para tres proteínas putativas involucradas en la respiración mitocondrial (Brayton *et al*; 2007). Las proteínas caracterizadas hasta el momento han sido de gran ayuda para la construcción *in silico* de vías metabólicas como la de glucólisis, fosforilación oxidativa, biosíntesis pirimídica *de novo*, interconversión nucleotídica entre otras (Brayton K.2007).

Tabla 2. Características generales del genoma de *B. bovis*.

característica	<i>Babesia bovis</i>
Longitud del genoma nuclear (Mb)	8.2
Número de cromosomas	4
Composición total de G+C (%)	41.8
Longitud del genoma del apicoplasto (kb)	33
Longitud del genoma mitocondrial (kb)	6, circular
Densidad génica	2,228
Porcentaje codificante	70.2

GENOMA DE *B. bigemina*

Los estudios respecto al genoma de *Babesia bigemina* son limitados. Recientemente se está secuenciando el mismo en el Instituto Sanger; sin embargo hasta el momento sólo se tienen ESTs, los cuales representan porciones expresadas de genes, esto con el propósito de conocer los genes que se expresan en los diferentes estadios. A pesar de que el genoma de *Babesia bigemina* aun no se ha terminado de ensamblar se sabe que *Babesia bigemina* tiene un genoma nuclear de aproximadamente 10 Mb, distribuido en cuatro cromosomas (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesiabigemina.html>)

ANTECEDENTES DIRECTOS

El desarrollo de las fases sexuales de *Babesia* sp, y la subsecuente formación del cigoto es fundamental para que el parásito pueda invadir las células del intestino de la garrapata *B. microplus* y así continuar su ciclo biológico.

En parásitos existen pocos reportes de los mecanismos a nivel molecular que podrían estar participando en la formación y fertilización del cigoto, sin embargo de manera general se sabe que este proceso se divide en dos etapas: en la primera se lleva a cabo la interacción de los gametos, donde las moléculas de adhesión celular son expuestas en la superficie de éstos para unir a las dos células; y en la segunda etapa las membranas plasmáticas de los gametos se fusionan para dar lugar a la formación del cigoto (Liu *et al*; 2008).

En 1995 Mori T. y colaboradores caracterizaron al gen *gcs1* (“*Generative Cell Specific*”) en *Lilium longiflorum* mediante estudios en células generativas de polen, las cuales son progenitoras de células espermáticas.

La estructura primaria de la proteína GCS1 denota zonas hidrofóbicas en las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína. El análisis de la secuencia proteica muestra la presencia de una posible señal transitoria, un dominio transmembranal, y un dominio HAP2 al cual se le atribuye la función de la proteína (Mori *et al*; 2005).

La proteína GCS1, también llamada HAP2 se ha identificado en diversas plantas tales como: maíz, trigo, tomate, y de forma inesperada también en algunos parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium hominis*, *Theileria parva* y *Trypanosoma brucei*. Los análisis bioinformáticos sugieren la presencia del gen en la mayoría de los organismos eucariontes (fig.

5). El estudio de esta proteína ha sugerido que tiene una función relevante en la fertilización y que cuando este gen está ausente o mutado la formación del cigoto es bloqueada completamente indicando su relevancia en dicho evento (Fig. 6) (Liu *et al*; 2008; Goodman C and McFadden G; 2009, Blagborough A and Sinden R; 2009).

Liu y colaboradores, en 2008 realizaron estudios de fertilización en *Chlamydomonas* y *Plasmodium berghei*, en los cuales demostraron que la ausencia de la fusión gamética en individuos estériles, se debía a anomalías en el gen *hap2*, y que por lo tanto la fusión de la membranas gaméticas era gobernada por HAP2. Además, estos autores demostraron que esta proteína se expresa únicamente en gametocitos machos. En este estudio se infectaron ratones con gametocitos mutados los cuales tenían ausente el gen *hap2* y observaron que los gametocitos no fueron capaces de salir del interior de la célula hospedera, además los mosquitos *Anopheles stephensi*, al ser alimentados con sangre de estos ratones, fueron incapaces de transmitir el parásito (Liu *et al*; 2008).

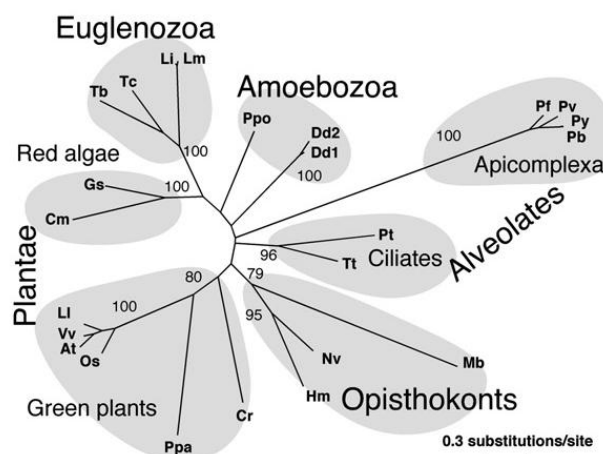


Figura 5. Árbol filogenético de organismos que tienen un gen homólogo a *gcs1* (Hirai *et al* 2008).

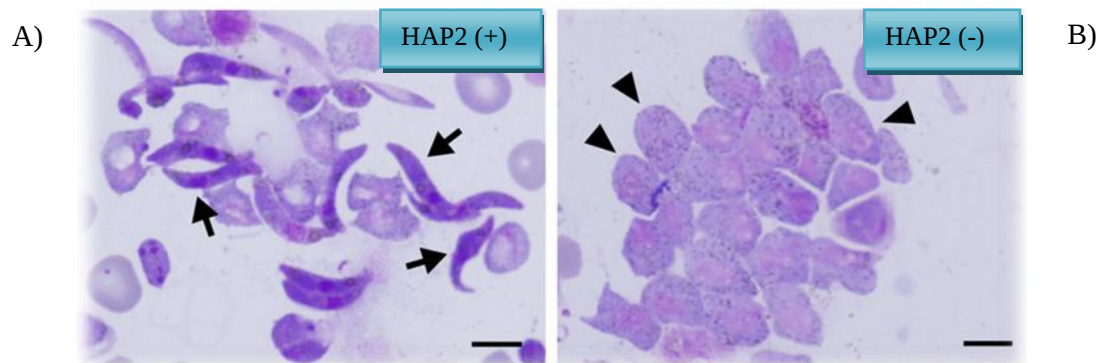


Figura 6. La proteína HAP2 es necesaria para la fertilización en *Plasmodium berghei*. A) Los gametocitos de *P. berghei* se fusionan y forman cigotos. B) Gametocitos de *P. berghei* mutados en el gen *hap2* no llevan a cabo la fusión de gametos, para dar paso a la formación del cigoto (Imágenes tomadas por Liu *et al*; 2008).

Hirai y colaboradores en el 2008, obtuvieron parásitos de *P. berguei* transgénicos en los cuales el gen *hap2* estaba fusionado al gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Con éstos parásitos infectaron eritrocitos murinos y detectaron que la proteína HAP2 sólo se expresaba en gametocitos machos; lo anterior pudo concluirse por los resultados de los ensayos de microscopía confocal al utilizar anticuerpos anti GFP y anticuerpos contra la proteína PBS21 (la cual es un marcador específico de gametos femeninos).

Recientemente, en estudios *in vivo* se ha demostrado que el gen *hap2* en *P. berghei* es un blanco potencial para bloquear la transmisión del parásito. Esto lo demostró Blagborough y colaboradores 2009, generando anticuerpos específicos contra la proteína HAP2, los cuales fueron mezclados con eritrocitos de ratón infectados con *P. berghei*. Esta mezcla fue usada para alimentar mosquitos del género *Anopheles*, posteriormente se disectaron los

intestinos de los mosquitos y se contaron los oquinetos formados. El resultado de este experimento fue la inhibición de la formación de oquinetos hasta un 81% (Blagborough A, Sinden R; 2009).

Se ha observado que en los diferentes organismos donde se ha identificado este gen, la proteína codificada presenta regiones y dominios conservados, los cuales posiblemente estén involucrados en la función de la proteína HAP2 (Fig. 8) (Liu *et al*; 2008).

Con base a los estudios ya realizados y los resultados obtenidos sobre esta proteína en *Plasmodium*, recientemente se ha propuesto una estrategia para lograr el bloqueo de la transmisión *in vivo* (Fig. 9). Esta consiste en inyectar a un organismo vertebrado con la proteína HAP2, también denominada molécula de vacuna bloqueadora de la transmisión (TBV), para estimular la respuesta inmunitaria contra esta molécula, de tal manera que el vertebrado ya infectado con *Plasmodium* tenga anticuerpos circulantes contra HAP2. Posteriormente, cuando un mosquito del género *Anopheles* se alimente del hospedero, ingerirá anticuerpos específicos contra HAP2, así como parásitos intraeritrocíticos, que más tarde en el lumen intestinal del mosquito darán origen a los gametocitos, los cuales al expresar HAP2 serán blanco de los anticuerpos contra este antígeno, impidiendo que dos gametocitos lleguen a fusionarse para dar origen al cigoto bloqueando el ciclo biológico de este parásito y la transmisión de la enfermedad (Hirai and Mori. 2009).

	SP	TM	AA length	AA identity to PbGCS1 (percentage)
Pb			827	100.0
Py			828	93.7
Pf			889	54.4
Pv			806	59.4

Figura 8. Regiones conservadas de la proteína HAP2 en *P. berghei* (Pb), *P. yoelii* (Py), *P. falciparum* (Pf) y *P. vivax* (Pv), tales como el péptido señal (SP) y la región transmembranal (TM) (Liu *et al*; 2008).

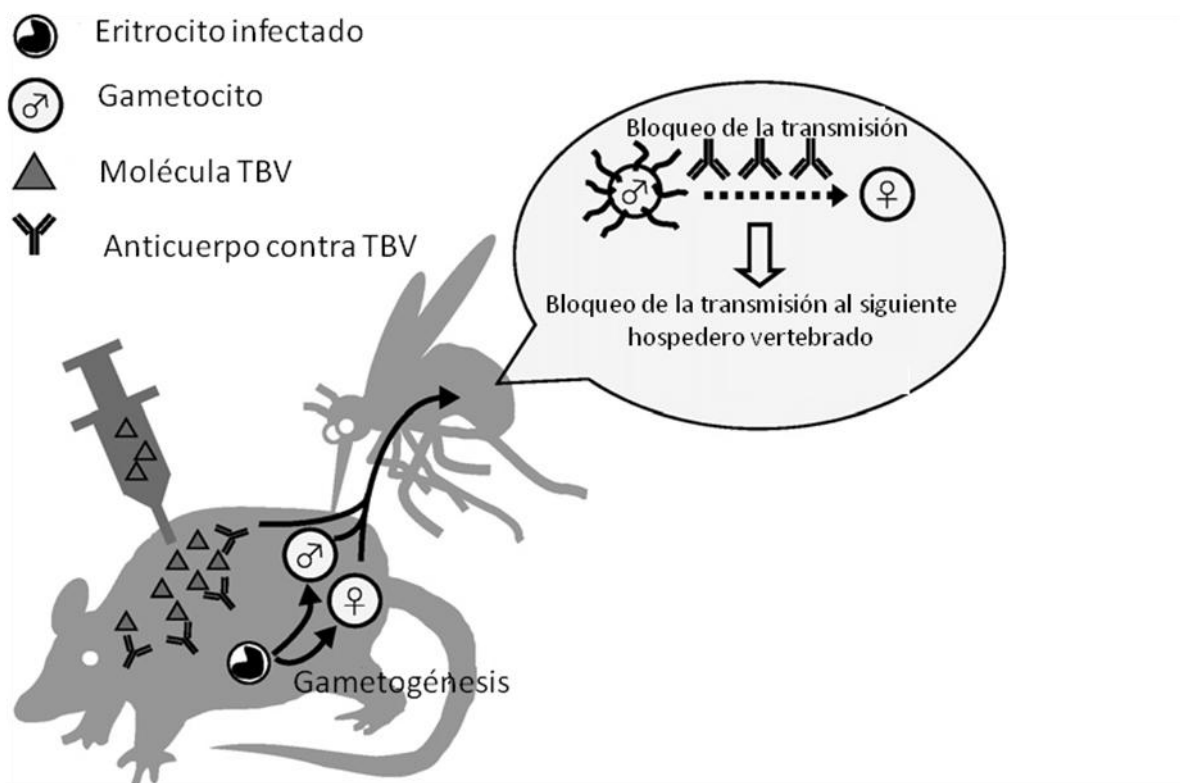


Figura 9. Representación esquemática del bloqueo de la transmisión de *Plasmodium* en un modelo vertebrado (Hirai and Mori. 2009).

Las proteínas de los gametocitos femeninos que podrían estar interactuando con la proteína HAP2 de los gametocitos machos aún no están caracterizadas; sin embargo recientemente se han propuesto algunas proteínas que pudieran

estar participando en este proceso como lo son: las proteínas SNARES las cuales participan en la fusión de membranas en eucariotes, así como en la fusión de membranas de virus envueltos y de virus no envueltos mediando la fusión de células infectadas con otras vecinas. Estas proteínas poseen dominios coiled-coil que contribuyen a la liberación de energía para la deformación de las membranas, además de contar con subunidades SNARES que se afilian con las membranas participantes para lograr una perfecta fusión (Fig. 10 a).

Las integrinas, las tetraspaninas y mioblastos son otras proteínas que juegan un papel relevante en el proceso de fusión célula-célula. Las primeras dos son proteínas transmembranales que participan en los procesos de adhesión del citoesqueleto y la matriz extracelular (Fig. 10 b) (Wong and Johnson; 2010).

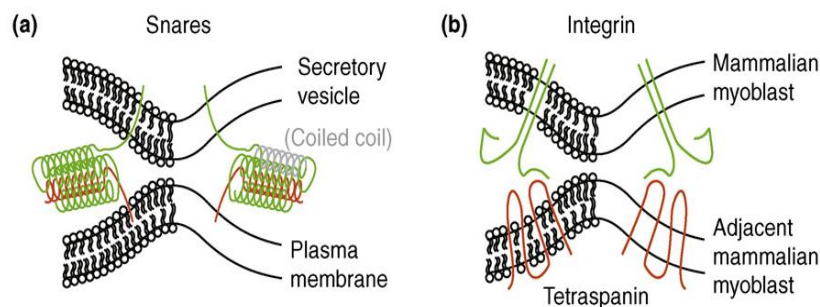


Figura 10. Ejemplo de proteínas que favorecen la fusión membranal (Wong and Johnson; 2010).

En *Babesia* sp, hasta el momento no existe ningún reporte de genes que se expresen en las fases sexuales por lo que resultaría de gran relevancia poder demostrar la presencia de *hap2* en el genoma de *Babesia bigemina* y su expresión en fases sexuales del parásito, lo que podría permitir a futuro la evaluación de esta proteína como candidata para una vacuna bloqueadora de la transmisión del parásito en su vector transmisor.

2.-HIPÓTESIS

La proteína HAP2 presenta regiones conservadas en cepas de *Babesia bigemina* de regiones geográficas diferentes y se expresa en fases sexuales del parásito.

3. OBJETIVO GENERAL

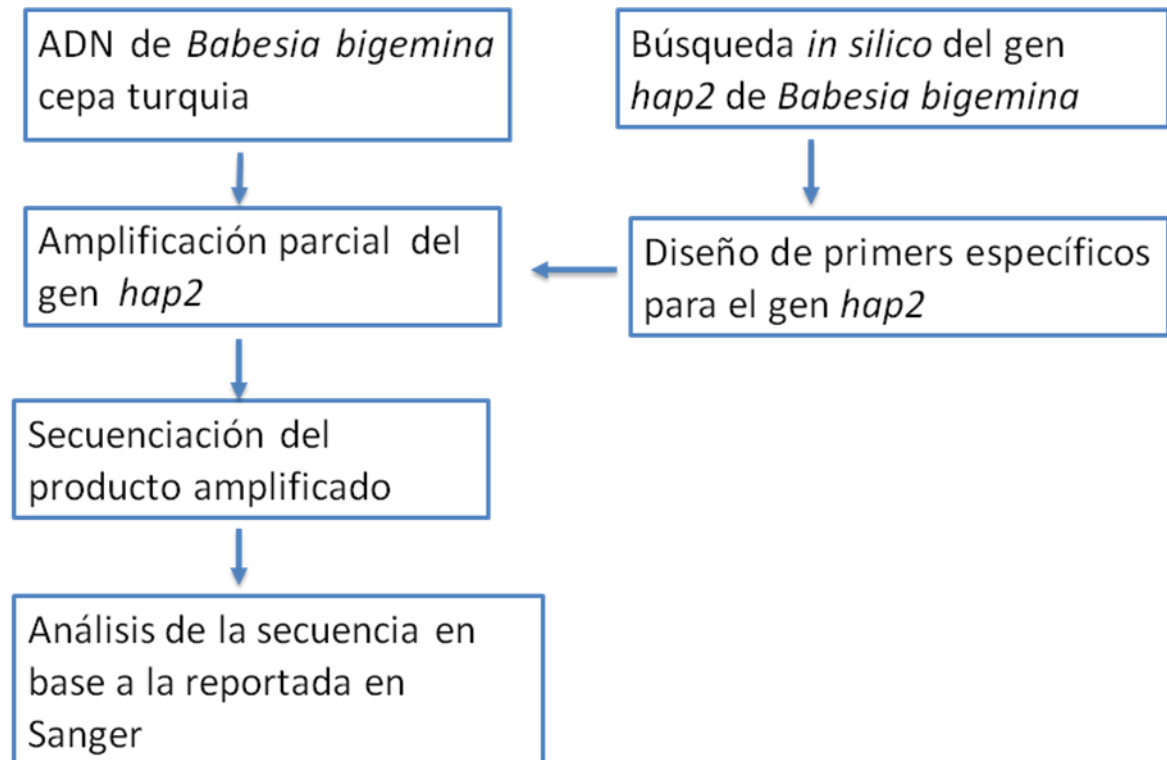
Identificar y caracterizar el gen *hap2* de *Babesia bigemina*.

OBJETIVOS PARTICULARES

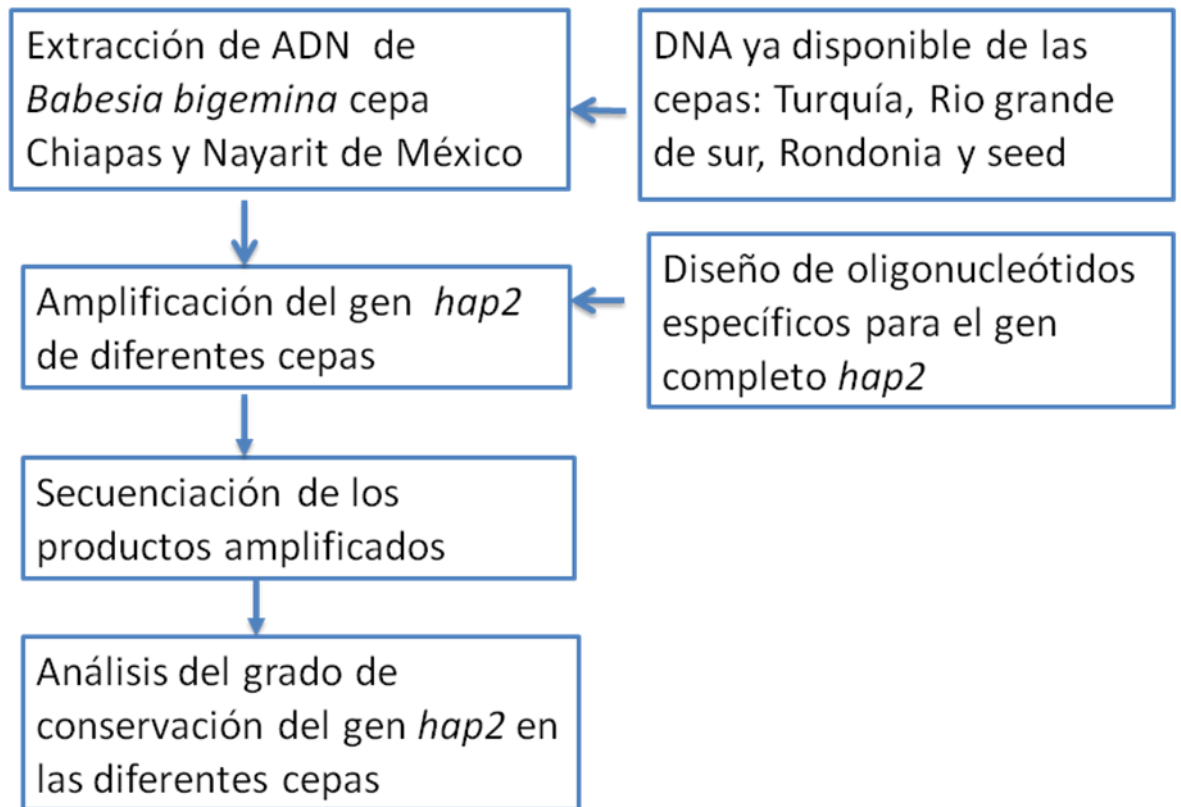
1. Identificar el gen *hap2* de *Babesia bigemina*.
2. Analizar el grado de conservación del gen *hap2* en cepas de *Babesia bigemina* de regiones geográficas diferentes.
3. Evaluar la expresión de la proteína HAP2 en fases sexuales del parásito y eritrocitos infectados con *Babesia bigemina*.

4.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo I. Identificar el gen *hap2* de *Babesia bigemina*.

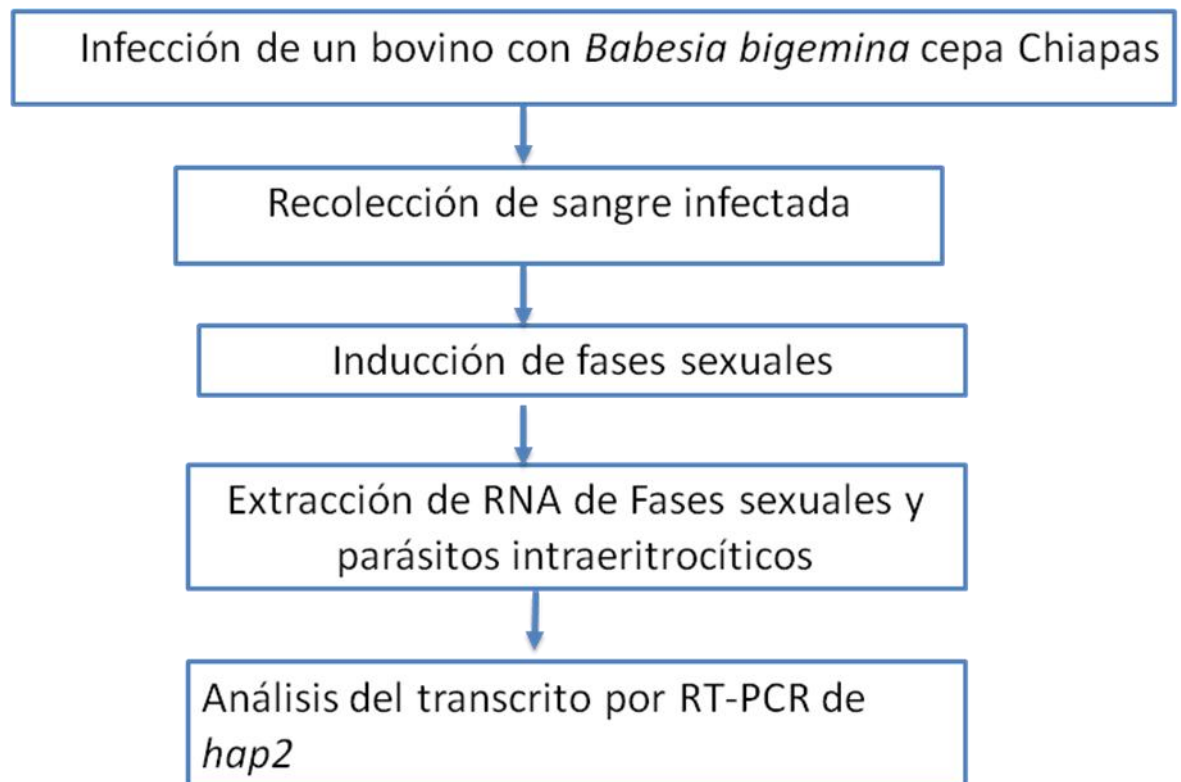


Objetivo II. Analizar el grado de conservación del gen *hap2* en cepas de *Babesia bigemina* de regiones geográficas diferentes.

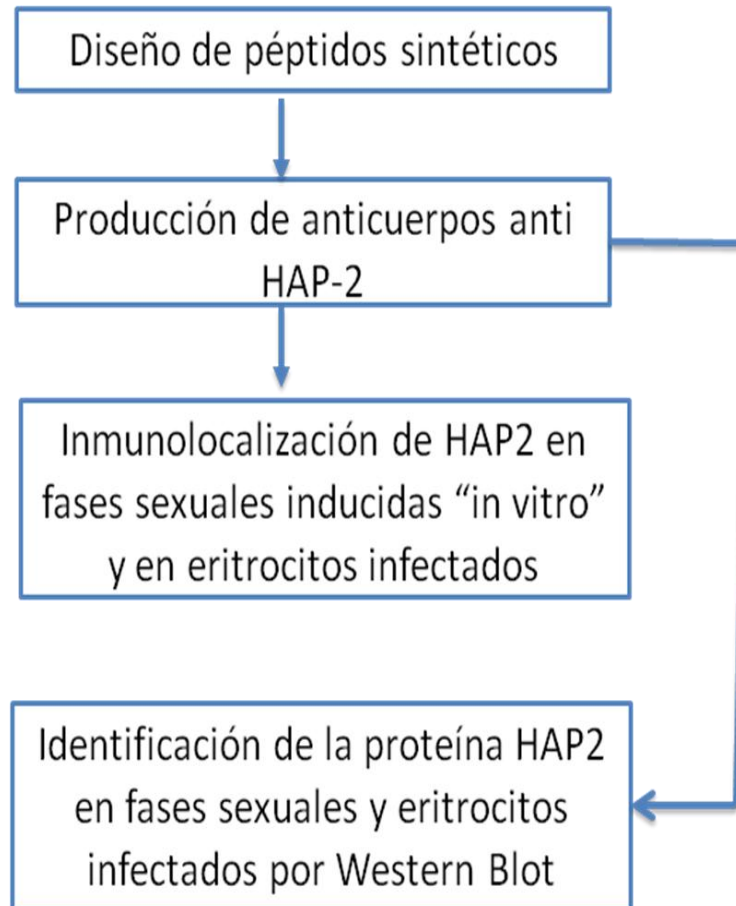


Objetivo III. Evaluar la expresión de la proteína HAP2 en fases sexuales del parásito y eritrocitos infectados con *B. bigemina*.

A) Evaluar la transcripción del gen *hap2*



B) Evaluar la expresión de la proteína HAP2



5.- METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO

Para la obtención de eritrocitos parasitados con *B. bigemina*, se realizó la inoculación intravenosa a un bovino, para esto, se utilizaron siete viales de sangre infectada con la cepa Nayarit. El bovino fue monitoreado a partir del tercer día post-inoculación hasta alcanzar una parasitemia de 4 al 6 %. Una vez obtenido el rango de parasitemia deseado, se procedió a colectar sangre en un matraz con perlas de vidrio y por medio de movimientos circulares realizar el desfibrinado de la sangre.

LAVADO DE SANGRE

La sangre infectada colectada, fue colocada en tubos de 50 ml y centrifugada a 9000 g por 20 minutos a 4°C para retirar el suero; posteriormente, la fase de eritrocitos se lavó 3 veces con solución de VYM centrifugando a 9000 g por 20 min; a 4°C. En cada lavado, se trató de retirar la mayoría de los glóbulos blancos; la fase eritrocítica fue utilizada para la inducción de fases las sexuales, extracción de DNA, preparación de laminillas para microscopía de fluorescencia y extracción de RNA.

INDUCCIÓN DE LAS FASES SEXUALES.

La inducción y purificación de las fases sexuales de *B. bigemina* se realizó a partir de una fase eritrocítica previamente lavada. Los parásitos se cultivaron en un volumen máximo de 20 % de medio M199 suplementado con 20 % de suero fetal bovino y 100 µm de ácido Xanturénico durante 18 hrs a 28°C en una

atmósfera de aire; al término de la incubación, el medio se depositó en tubos de 50 ml y se centrifugó a 9000 g por 25 min a 4°C, el sobrenadante se decantó, y por cada 2 ml de células se adicionaron 27 ml de percoll isosmótico al 47 % con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), posteriormente se realizó una centrifugación a 20000 g por 20 min a 4°C para realizar la separación de fases por gradiente de percoll. La fase superior de color marrón conteniendo los parásitos extracelulares o fases sexuales, se removieron cuidadosamente y se resuspendieron en PBS, esta mezcla se centrifugó a 9000 g por 20 min; y el sobrenadante fue eliminado; una parte del botón que quedó en el vial se resuspendió en Trizol y se almacenó a -20°C y otra parte se usó para hacer laminillas, que se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA se llevó a cabo con el kit PUREGEN (Gentra) para la cual se utilizó un volumen final de 300 µl de eritrocitos, que fueron lisados con 900 µl de solución de lisis RBC, la muestra se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente invirtiendo diez veces durante la incubación, se centrifugó a 13000 g por 20 seg el sobrenadante se removió y la muestra se colocó en hielo por un minuto, al lisado celular se le adicionaron 100 µl de solución para precipitar proteínas, se agitó gentilmente por 20 segundos para tener una mezcla homogénea de la solución de precipitado y el lisado celular, la cual fue centrifugada a 13000 g por 1 minuto; el sobrenadante que contenía el DNA se puso en un vial estéril que contenía 300 µl de isopropanol al 100%, la mezcla se invirtió 5 veces de manera cuidadosa y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto, el sobrenadante se removió y en el vial se observó un botón

blanco que contenía el ADN, se colocaron 300 µl de etanol en el vial para lavar la pastilla; el etanol se retiró centrifugando por 1 minuto a 13000 g, el vial se invirtió y fue secado con papel absorbente. Una vez seco se añadieron 100 µl de solución hidratante y se incubó durante 5 min a 65°C, para posteriormente almacenarlo a -20°C hasta su uso.

IDENTIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DEL GEN *hap2* DE *B. bigemina*.

La secuencia del gen *hap2* de *B. bigemina* fue identificada mediante herramientas bioinformáticas; primero se buscó la secuencia de *hap2* de *B. bovis* en la base de datos NCBI, usando como sonda la secuencia del gen *hap2* de *Plasmodium berghei* reportada en el año 2008, por Hirai *et al*, posteriormente, la secuencia identificada de *B. bovis* se usó como sonda para la búsqueda del gen *hap2* de *B. bigemina* en la base de datos del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>) el resultado hizo referencia a un contig específico, y en la base de datos Expasy se buscaron los marcos de lectura abiertos ORF (Open Reading Frame) para identificar al gen *hap2*; posteriormente en la base de datos Genscan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) se realizó la predicción de posibles intrones, y la secuencia peptídica codificante de la proteína HAP2, dicha secuencia fue utilizada para realizar la búsqueda del dominio HAP2 usando la base de datos P FAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y mediante un alineamiento en ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) se comparó contra los dominios de: *B. bigemina*, *B. bovis*, *P. berghei*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania braziliensis*.

La secuencia peptídica también se utilizó para determinar si la proteína tiene un péptido señal mediante el programa SIGNAL P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y un dominio transmembranal usando el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); por último se determinó la localización celular de la proteína usando el programa PSORT (<http://psort.hgc.jp/>).

AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR Y PURIFICACIÓN DEL GEN *hap2*

Con base en la secuencia encontrada del posible gen *hap2* de *B. bigemina* se diseñaron iniciadores BigHAP2 F y R (5'GGAAGGTTGGTTGCAGGG 3' y 5'CGCTGAATGTGAACGAGTC 3') los cuales fueron usados para obtener un amplicon de 1485 pb, correspondiente al gen *hap2* a partir de DNA genómico de *B. bigemina* de la cepa Turquía-Turquía; disponible en el laboratorio de la UACM. El amplicón se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

El producto de PCR fue purificado mediante el kit QUIAGEN siguiendo las especificaciones correspondientes; el amplicon fue secuenciado y la secuencia obtenida fue comparada contra la ya reportada en la base de datos del Instituto de Sanger, usando el programa CLUSTALW.

CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *hap2* DE DIFERENTES REGIONES GEOGRÁFICAS DEL MUNDO.

Para la obtención del gen completo *hap2* de *B. bigemina* de diferentes regiones geográficas: Chiapas-México, Nayarit-México, Turquía-Turquía, Rondonia-Brasil, Rio grande da sur-Brasil y Seed-México; se diseñaron 3 juegos de

oligonucleótidos (Tabla 2). Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit QIAGEN; después de haber purificado los amplicones, éstos fueron clonados en el vector TOPO TA (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del kit. Posteriormente el vector recombinante se utilizó para transformar bacterias DH5 α químicamente competentes, las cuales una vez transformadas fueron sembradas en cajas petri con medio LB agar-ampicilina (100mg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche, 10 clonas recombinantes se pasaron a medio LB líquido conteniendo ampicilina 100 mg/ml y se incubaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente a partir de los cultivos bacterianos se purificó el DNA plasmídico con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega). El DNA plasmídico se corrió en un gel de agarosa al 1% para determinar posibles colonias con inserto con base en el tamaño del vector, el DNA plasmídico de las colonias candidatas fue sometido a digestión usando las enzimas *Eco-RI* y *Hind III* por 2 hrs a 37 °C y los fragmentos de DNA se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

ANÁLISIS DEL GRADO DE CONSERVACIÓN DE *hap2* EN DISTINTAS CEPAS DE *B. bigemina*.

El DNA plasmídico de 3 clonas de cada cepa se utilizó para obtener las secuencias del gen *hap2* correspondiente a cada cepa. Las secuencias fueron editadas usando el programa BIOEDIT, y con éstas se realizó un alineamiento múltiple en el programa ClustalW para evaluar el grado de conservación entre las diferentes cepas.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación, clonación y secuenciación del gen *hap2*

Oligonucleótido	Secuencia
HAP2-F1	5'GATAAGAATTCATGACGCATGCCGTGCTGAAC 3'
HAP2-F2	5'GTGTGGTGTCAACGTCACGG 3'
HAP2-F3	5'CAATTGCGACCAGGAGGGCC 3'
HAP2-R1	5'TGCTTCGATTTGCGCACCTCC 3'
HAP2-R2	5'TGCACGCTCTGCTCCTCCGA 3'
HAP2-R3	5'GATAAGAAGCTTCTACACCTCGTCGCTATGGC 3'

EXTRACCIÓN DE RNA

Las fases sexuales de *B. bigemina* y de eritrocitos infectados con *B. bigemina* fueron utilizados para realizar extracción del RNA mediante el método de Trizol (Invitrogen). Las muestras lisadas mediante la adición de 800 µl de Trizol almacenadas anteriormente se descongelaron; y a cada lisado se les añadió un volumen de 160 µl de cloroformo, las muestras se agitaron vigorosamente por 15 seg; para su posterior incubación por 2 minutos a 30 °C, después del tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a una temperatura de 4 °C obteniendo una separación de fases; la fase acuosa conteniendo el RNA, fue removida cuidadosamente a tubos estériles, se realizó

la precipitación del RNA, usando 500 µl de isopropanol, seguido de una posterior incubación a 30°C por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 g por 10 min a 8 °C; el sobrenadante se decantó y cada botón se lavó con 1000 µl de etanol al 75 %. Las muestras fueron homogenizadas y el etanol fue removido por centrifugación a 7500 g por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se decantó y los botones conteniendo el RNA fueron resuspendidos en agua libre de RNasas.

ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *hap2* MEDIANTE RT-PCR

Una vez obtenido el RNA de *B. bigemina* de fases sexuales inducidas y de eritrocitos infectados se realizó una prueba de PCR de transcripción reversa para amplificar el cDNA. La transcripción reversa se hizo con el kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) siguiendo las especificaciones correspondientes; usando 1 µg de RNA total. Un volumen de 5µl de cDNA se utilizó para realizar una PCR, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, usando primer específicos para el gen *hap2* y para *hsp20* que es un gen que se expresa constitutivamente en *B. bigemina* por lo cual se utilizó como control de carga.

DISEÑO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Se realizó el diseño del péptido sintético: HRRVFVDVYAFDGDAGVVP con base en en la secuencia de la proteína predicha HAP2 de *B. bigemina* y *B. bovis*. Las secuencias de estas proteínas fueron alineadas en el programa CLUSTALW para buscar regiones expuestas extracelulares que estuvieran conservadas entre ambas especies; posteriormente usando el programa Antigenic se analizaron las regiones para determinar la presencia de péptidos

inmunogénicos para ser usados en el diseño del péptido sintético; una vez que se encontró el péptido candidato tomando en cuenta los valores más altos de antigenicidad se mandó a sintetizar acoplado a la proteína inmunogénica KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin).

El péptido sintético acoplado a KLH se usó para efectuar cuatro inmunizaciones con intervalos de 15 días, de manera subcutánea, con 50 µg de péptido y con 2 ml de adyuvante Montanide 740 (Sepic, Francia); colectando suero preinmune e inmune.

IMUNOLOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HAP2 EN FASES SEXUALES Y ERITROCITOS INFECTADOS.

Las fases sexuales y los parásitos intraeritrocíticos se extendieron en laminillas así como los eritrocitos de bovino sin infectar, usados como control negativo de tejido. Dos laminillas de cada muestra se fijaron con acetona al 100% por 15 min. y se dejaron secar por 15 min. Una vez que estaban completamente secas, se colocaron 20 µl de anticuerpo primario anti-HAP2 o suero preinmune (1:100); las muestras se incubaron en una cámara húmeda por 30 min a 37°C. Pasado ese tiempo se lavaron dos veces con PBS y una con agua destilada durante 5 min en un agitador magnético. Posteriormente las laminillas se dejaron secar a 37 °C por 15 min, para después colocar 20 µl del conjugado cabra anti-conejo IgG-FITC (Thermo Scientific) a una dilución 1:100. Nuevamente las laminillas se incubaron a 37°C por 30 min y después se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua destilada por 5 min. Se dejaron secar y en cada muestra se colocó una gota de glicerina fosfatada diluida 1:10; a cada una se le colocó un portaobjeto que fue fijado con barniz, para

posteriormente examinar las laminillas en un microscopio de fluorescencia con objetivo 100X y un filtro específico para FITC.

IDENTIFICACIÓN DE HAP2 DE *B. bigemina* MEDIANTE WESTERN BLOT

La identificación de HAP2 se hizo en fases sexuales, fases asexuales (parásitos intraeritrocíticos) y como control negativo se usaron eritrocitos sin infectar, estas muestras se lavaron 5 veces con PBS con el fin de eliminar restos de hemoglobina, a cada muestra se le agregó azul de bromofenol con β mercaptoethanol y fueron sonicadas por 40 S.

Las proteínas totales de las muestras correspondientes se corrieron en un gel de acrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 V por 1 hr y la membrana se tiñió con rojo de Ponceau al 1% para verificar la correcta transferencia. La membrana se bloqueó con TBS-Tween-leche 5% a 4 °C toda la noche. Al día siguiente la membrana se lavó 5 veces con TBS-Tween-leche 0.5% por 20 min cada uno; posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-HAP2, a una dilución 1:4000 por 1hr, pasado el tiempo de incubación se lavó la membrana 5 veces por 20 min con TBS-Tween-leche 0.5%. Subsecuentemente, se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP a una dilución 1:5000 por 1 hr. Y finalmente se realizaron 5 lavados de 20 min con TBS-Tween-leche 0.5%, el revelado se realizó por quimioluminiscencia usando el kit GE Healthcare ECL Western blotting.

6.- RESULTADOS

BUSQUEDA BIOINFORMATICA DEL GEN *hap2* EN *B. bigemina*

La secuencia nucleotídica de *B. bovis* encontrada en la base de datos del NCBI usando como sonda la secuencia de *P. berghei*; codifica para una proteína de membrana de 757 aminoácidos la cual tiene una identidad del 21% con la sonda. La secuencia *hap2* de *B. bovis* se usó, posteriormente, como sonda para hacer un BLAST en la base de datos del Instituto Sanger contra el genoma de *B. bigemina*. Un ORF fue encontrado en el contig 4163 con una longitud de 68050 pb, específicamente de la posición 16603 a la 17313 pb con una identidad del 59%. Mediante un análisis bioinformático de identificación de ORFs (Open Reading Frames) se encontró el ORF de 2771 pb (fig.11). Esta secuencia contiene tres intrones que se encuentran en las posiciones: 1248-355, 384-768 y 806-976 pb. La secuencia codificante es de 2343 pb de largo y codifica para una proteína madura de 746 aminoácidos con un peso molecular estimado de 82 KDa (fig.12). Tal como se esperaba, la proteína tiene un péptido señal de 36 aminoácidos; ésta es una característica que se ha reportado en las proteínas HAP2 (fig 13). De igual forma esta proteína cuenta con un motivo HAP2 que comienza en el aminoácido 357 y termina en el 405. El alineamiento de los dominios HAP2 de *P. berghei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania braziliensis* y *B. bovis* contra *B. bigemina* se presenta en la figura 14 mostrando regiones conservadas de la proteína.

El análisis de la secuencia peptídica usando el programa TMHMM indicó que esta proteína tiene 3 regiones: una intracelular, una transmembranal y una extracelular (fig.15). La localización celular de la proteína fue determinada

usando el programa PSORT el cual indicó que es una proteína integral de membrana.

La amplificación del gen *hap2* con los iniciadores diseñados BigHAP2F y BigHAP2R dio como resultado un amplicón de 1485 pb en la cepa Turquía (Fig. 16).

La secuencia obtenida fue analizada en el programa BIOEDIT, con el cual se determinó una secuencia consenso. Ésta secuencia fue alineada contra la reportada en la base de datos del Instituto Sanger, obteniéndose un 98 % de similitud y el dominio HAP2 en común.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo predicho mediante herramientas bioinformáticas, y lo reportado acerca de las características del gen *hap2*.

```

ATGACGCATGCCGTGCTGAACCGGTCTTACAAGTCGCCGCTGCGAGGAGCAGCATGCCTG
CTGGCGCTGCTGATCGGGGCCGCGGTGCGGCCGCGCTCGGCCGTCATCATCAGCCCCGTG
AGACAGTGCATCGACAAGGGCGGCCGAGCGTCGCCGAAGGCGACTGCGAGTGGCGTTTCG
CACACCAACATCGACGTGAAGGGTGGAGAGGTGCGTGACAGTGTGGCGCATGCGGACGC
TTCGCAGGAAACAGCGAGCTACGTGCTCAGGCGCAAGGACAAGCCCAACAGCGGGCTCTA
CATACACATCCAAACGTCGTTAACCCTCTGTCTGACGAGCTGGAGTACATCATGGTTAG
CGAGCGATTTGCGCGCACAAAAGTCGCAGGACGTGCCGTCCCAGTACCGGGAGCACAAAC
GCAGCGTGGACTACTCGGCGATGACGGGCGGCTGCAACAACCTGCGATGCGCTTGAGCTGG
AGATTTGCTCCAAGCCCGACGCCCTGCCGCCGAGCATACAGGAGAGCTTCAACAACAAGG
CGTGCTGCGTGTGTGGTGTCAACGTACGGAATACTCCCCCGCGCCGACTTCTCCTGCA
CCGGCTTCGGGGCCGCTTCATGCACGGCAAGTGCCTGTCATGAGCTGCCTCGAGGTGCG
TCGGGCCGTTGGTACTCCATTTTCAAGCCCGCTACCCGCCGACCATAACCGGAGGGTGT
TCGTGACGTGTACGCCCTTCGACGGAGACGCCGCGTGGTGCCAGACGGTAAGTGCGGCT
CGTGTACGCGTCACATCCGCGCAGTTGCGAAGAATGGGTACTACACGAGCGACGACGCG
GACGAAACGCGTTACCTCAAGGAAGCCGTCTACAAGGACAAGCACCTCAAGGCCACCCTC
TCCGCCGAGAAGCAAGCGGTCAAGAACGAGGAGCTCGATGTCACGCTGACGATCATCACG
CAGCAGTGGCTCGACGGTAACGCGCCGAGAAAGATGGACAAGTTTCGTGCGCGTGCCTTCG
TGGCCGGAGACCGACAAGACCGTGCAGGGGAGCTCGAGGAAGGTTGGTTGCAGGGTTCGTG
TCGGACATGGCGCGCAGTACAATTGCGACCAGGAGGGCCGGGACCCGCACGAATGCGAGC
ACGACGACGTCCGCTGCCGCATGGAGAAGTGCGCCCTGAACGTGCGCACCATCGAGTCGG
ACGCCATCGACACCACGGGCACGCAGTGCACAAAGATCGGCGTGTGATGGGCACGTGGG
GCAACGAGGGCAGGCTGTGCAACACCGCGCCGAACAGCTGCATCCAGAACCAGCTGGGCT
GGTACCTCAGCGAGCGAAAGGAACGGGTAGGGTCAGGGCGCGAACGTCTTCACGGTGTTC
AGGCGCTGCTGCCGAAGCTGTACGGCGTCCAGCCGATGCTGGCGCGAAGGGAGGTGCGCA
AATCGAAGCAGGCGGCCGCCATGGAGGAGCCGGAGGACTTGGCCGAGGAATCCCGCAGCC
CCACGGCCAAGAGCGCTTGGAGGGGGCCCGCGACTTACGGCGCTGAAGACGAAGGTGAGG
AAGACGAAGACGAAGACGAAGACCAAGAACCCGACGAGTGGCACGACGACACCTACGTGC
ACGCCGTGCGGTACTCCATAGCGAAGGCGGACACGTGCGCAATCGAAATCAACACCTTCG
ACGCCACCGTCAACCCAGATCATCGCGGAGGCGGTGGGGTTTCATCGTGAGCGCCACCATGG
ACGGGCCGTGCAAGGTGGCGAGCCACGAGGCGTGCACGATGAAGATCGTGACCAAGAACG
CCGGGAAGATACGCGCCAAGTTACGCCACCGCATCCAGTGTACGAGGCCGAGAGCCTC
ACACGAGCCCCGCGGCCCTCTTCGGAGGAGCAGAGCGTGCAGGTGGAGCCGAACAGCACGA
CGTCGTGCGTGGTGGCGATCAAGATCCTCTCCGGCGAGGGCTCGGACAAGCTGGAGTGGC
AGGTGCAGTTGTACTCATCGACGGTCAGCCTGCTCGAAACGTTTCGTGGTCAAGGCGTCGC
TCGCCACGCCACCATCACCGTGGGCCCGGACGTCCGCTCGTTGACAAATTCACCGACA
CGTCCAAGGAGGACCACGCGTGAAGATCGGTGCCATGCTGTGCGACAACATGTGCACCT
GCAACGCGGGCGAGGTGGGCTGCTTCTTCCGCAATTTTCGAAAGTGCATGAGACACGCT
TCAACAAGTACTACACTTGGTTCGTGCTGGGCATCACGGGGCTCAGCTTCCTCGCGCTGC
TGCCGGTGTTCATCCCGCTGGCGCGCGTGGTCTTCGGCAAGATCTCGGAGGGCCGCGCCC
GCGCCAGGATCCGGCGTGAGGCCGCGCAGGAGATCGAGCGGATCCGGCGCGAGTTCCATC
ACGACGAGGAGAGGTACGGCCGGCCGAGTTTCAGGTGCGGCCATAGCGACGAGGTGTAGA
GTACGGGGGAATGCAACATTATCACGCGCTGTCACAGCAGTTCAATTTTATCATACGCGA
ACTCGACTCGTTACATTACGCGCCCTCGAGGCCCTTCGAAGCGGAGGGGTGCTCGAAGCG
CTTGGGGTTGCGCAGGATCTCCTGGGCCAGCATCTCGAACACCGCCGAGATGTTCTGCCC
GGTCTTGGCGCTGGTCTCGACGAAGAGCAGCGCCTGCTCCTGCGCGTAGGAGCGCGCGTT
CTCCAGCGTGCGCGCTGCTCCTCGTTGGCGCCAGCAGGTCCACCTTGTGGCCACCAG
CACCACGATGG

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica en formato FASTA del gen *hap2* encontrada en la base de datos del Instituto Sanger

```

MTHAVLNRSYKSPLRGAACLLALLIGA AVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS
HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSLTTLSELEYIMSQDVPSQYREHNRS
VDYSAMTGGCNCDALELEICSKPDALPPSIQESFNNKACCVCGVNVTDYSPRADFSCTG
FGAAFMHGKCVSMSCLEVVGWPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNGY
YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTITQQWLDEDGQVRRRA
FVAGDRQDRAGELEEGWLQGRVGHGAQYNCDQEGRDPHECEHDDVRCRMEKCALNVRTIE
SDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNELRLCNTAPNSCIQNQLGWYLSERKERVGSGRERPHG
VQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPEDLAEESRSPTAKSAWRGPATYGADEDEG
EEDEDEDEDQEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAVGFIVSAT
MDGPCKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQSVQVEPNS
TTSSVVPKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDVRSFDFKFT
DTSKEDHALKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGITGLSFLA
LLPVFIPLARVVFGKISEGRARARIRREAAQEIERIRREFHHDEERYGRPEFRSRHSDEV

```

Figura 12. Secuencia predicha de la proteína HAP2

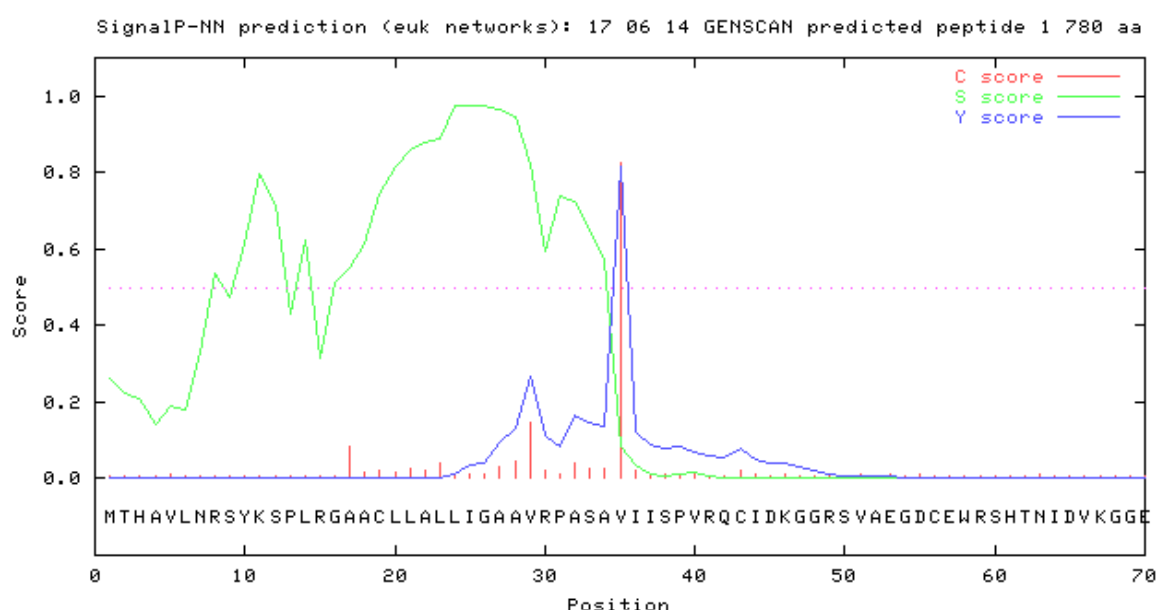


Figura 13. Localización del péptido señal que comprende del aminoácido 1 al 36 en la secuencia de la proteína HAP2. Análisis bioinformático utilizando Signal P, V 3.0.

<i>Plasmodium b</i>	1	MMLPKYMF	DL	SGKT	CGKL	GVSL	NTWR	KSEG	NFCG	SEAG	YCIS	NNLK	KYYD	50
<i>Leishmania</i>	1	MMLPTNL	VTLD	GRECD	KVGVS	YEAF	A-SQ	GNKC	NLRP	GSCL	SSQ	LEDY	RT	49
<i>B.bov</i>	1	RVIEPSA	VDVI	GATCD	KIGVS	MGTW	GDE-K	RLCN	QHEG	ICIQ	NQLA	WYFK	49	
<i>B.big</i>	1	RTIESDA	IDITG	TCODK	IGVSM	GTWG	NE-G	RLCN	TAPN	SCIQ	NQLG	WYLS	49	
<i>Toxoplasma g</i>	1	IILDKDY	VS	VTGYE	CDKVG	TGLDR	WGDM	RGEF	CNLL	PGTC	ITGOL	RKEKE	50	

Figura 14. Alineamiento del dominio HAP2 de los parásitos: *Plasmodium berghei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania braziliensis*, *Babesia bovis* y *Bigemina bigemina*.

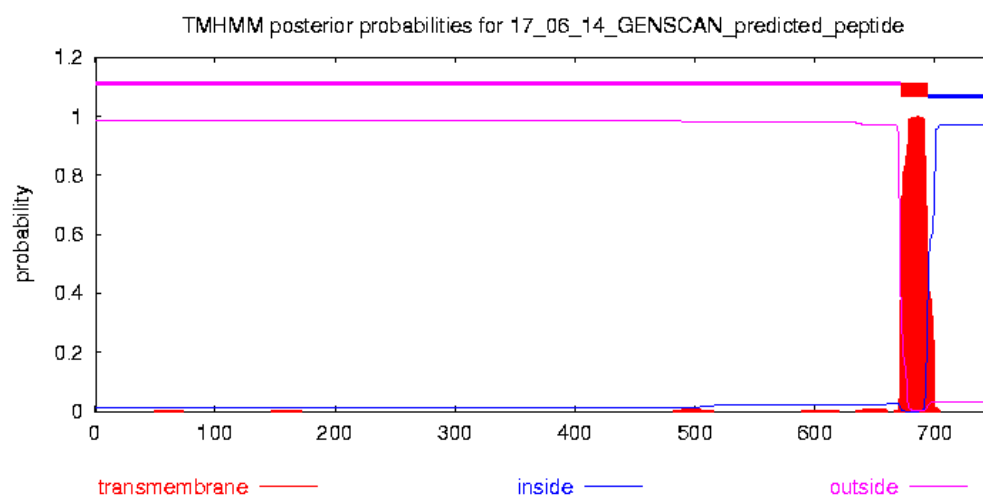


Figura 15. Análisis de la presencia de hélices transmembranales de la proteína HAP2 de *Babesia bigemina* de 780 aminoácidos, la cual está compuesta por tres regiones: una intracelular (azul), una transmembranal (rojo) y una extracelular (rosa). Análisis bioinformático utilizando el programa TMHMM.

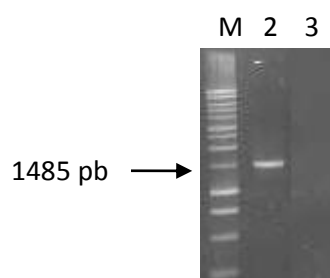


Figura 16. Amplificación parcial por PCR del gen *hap2* de *Babesia bigemina* cepa Chiapas; carril 1: Marcador de peso molecular de una Kb; 2: Turquía; 3: Control negativo de la PCR.

AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *hap2* DE CEPAS DE REGIONES GEOGRÁFICAS DIFERENTES.

La amplificación de la región codificante del gen *hap2* de las cepas: Nayarit-México, Chiapas-México, Río grande da sur-Brasil, Seed-México, Rondonia-Brasil y Turquía-Turquía se logró con los iniciadores HAP2-F1 y HAP2-R3, teniendo un amplicón de aproximadamente 2459 pb (Fig. 17). Los fragmentos de DNA amplificados, correspondientes a cada cepa, fueron purificados, clonados y secuenciados usando la metodología anteriormente mencionada. Las secuencias obtenidas se editaron en BIOEDIT y los alineamientos para determinar el grado de conservación de las secuencias se realizaron en CLUSTALW.

La secuencia obtenida del gen *hap2* de *B. bigemina* de la cepa Chiapas la cual es usada como cepa de referencia tiene un 99 % de similitud con las secuencias de la cepa Seed y Nayarit y 98 % con la de: Rondonia, Turquía y Río grande da sur. Es importante señalar que las secuencias presentan diferencias en el número de nucleótidos y aminoácidos como se muestra en la

tabla 3. Por otra parte, el dominio HAP2 se encuentra totalmente conservado en cinco cepas y presenta un cambio de un aminoácido en la cepa Chiapas como se muestra en la figura 18.

El análisis de las secuencias consenso ha demostrado que tanto la secuencia del gen como de la proteína HAP2 de *B. bigemina* se encuentra muy conservada, incluso en cepas de regiones geográficas diferentes; y que la estructura de la proteína no cambia en ninguna de ellas tal como lo reportó Hirai en el 2008, al analizar secuencias de HAP2 de *Plasmodium*.

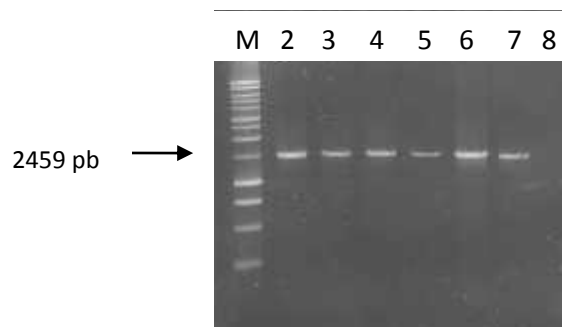


Figura 17. Amplificación del DNA codificante del gen *hap2* de cepas de *B. bigemina* de regiones diferentes. Carril 1: Marcador de 1 Kb; 2: cepa Chiapas-México; 3: cepa Nayarit-México; 4: cepa Río grande da sur-Brasil; 5: cepa Turquía-Turquía; 6: cepa Seed-México; 7: cepa Rondonia-Brasil; 8: Control negativo de la PCR.

Tabla 3. Variación en el número de nucleótidos del gen *hap2* entre diferentes cepas de *B. bigemina* , así como el número de aminoácidos de la proteína.

Cepa	No. de nucleótidos	No. de aminoácidos
Chiapas	2474	778
Nayarit	2447	777
Rio grande da sur	2447	777
Turquía	2474	784
Seed	2474	778
Rondonia	2450	768

Nayarit	MTHAVLNRSYKSPLRGAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS	60
RS	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS	60
Ro	MTHAVLNRSNKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS	60
Turq	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS	60
Chiapas	MTHAVLNRSYKSPLRVAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS	60
Seed	MTHAVLNRSYKSPLRGAACLLALLIGAAVRPASAVIISPVRQCIDKGGRSVAEGDCEWRS *****	60
Nayarit	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSLTTLSELEYIMSQDVPSQYREHNRS	120
RS	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSFTTLSELEYIMSQDVPSQYREHNRS	120
Ro	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSLTTLSELEYIM--DVPSQYREHNRS	118
Turq	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSFTTLSELEYIM--DVPSQYREHNRS	118
Chiapas	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSLTTLSELEYIMSQDVPSQYREHNRS	120
Seed	HTNIDVKGGEETASYVLRKDKPNSGLYIHIQTSLTTLSELEYIMSQDVPSQYREHNRS *****	120
Nayarit	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG	180
RS	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG	180
Ro	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG	178
Turq	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG	178
Chiapas	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG	180
Seed	VDYSAMTGGCNCNDALDLEICSKPDALPPSIQDSFNNAKCCVCGKNVTDYSPRADFSCTG *****	180
Nayarit	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY	240
RS	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY	240
Ro	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY	238
Turq	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY	238
Chiapas	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY	240
Seed	FGAAFMHGKCVSMSCLEVGPWYSIFKPAYPPTIHRRVFVDVYAFDGDAGVVPDVAKNKY *****	240
Nayarit	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK	300
RS	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK	300
Ro	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK	298
Turq	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK	298
Chiapas	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK	300
Seed	YTSDDADETRYLKEAVYKDKHLKATLSAEKQAVKNEELDVTLTIIITQQWLDGNAPQKMDK *****	300
Nayarit	FVAVPSWPETDKTVQGSSRKGCVGHAQYNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI	360
RS	FVAVPSWPETDKTVQGSSRKGCVGHAQYNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI	360
Ro	FVAVPSWPETDKTVQGSSRK-----YNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI	350
Turq	FVAVPSWPETDKTVQGSSRKGCVGHAQYNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI	358
Chiapas	FVAVPSWPETDKTVQGSSRK-----YNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI	352
Seed	FVAVPSWPETDKTVQGSSRK-----YNCQDQGRDPHDCEHDDVRCRMEKCALNVRTI *****	352
Nayarit	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCNTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSHERPH	420
RS	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCNTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSHERPH	420
Ro	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCNTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSHERPH	410
Turq	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCNTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSHERPH	418
Chiapas	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCSTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSLERPH	412
Seed	ESDAIDTTGTQCDKIGVSMGTWGNRGLCNTAPNSCIQNQLGWYLSEKERVSGSHERPH *****	412
Nayarit	CVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPESLAEESRSS-TAKSAWRGPATYGAED	479
RS	CVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPEDLAEESRSS-TAKSAWRGPATYGAED	479
Ro	CVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPESLAEESRSSMSKSAWRGPATYGAED	470
Turq	CVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPESLAEESRSS-TAKSAWRGPATYGAED	477
Chiapas	CVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPESLAEESRTS-TAKSAWRGPATYGAED	471
Seed	GVQALLPKLYGVQPMLARREVRKSKQAAAMEEPENLAEESRTS-TAKSAWRGPATYGAED *****	471
Nayarit	E-----GEDEDEQEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV	530
RS	E-----GEDEDEQEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV	530
Ro	E-----GEDEDEQEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV	521
Turq	EDEGEDEDEGEDEDEDEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV	537
Chiapas	EDEGEDEDEGEDEDEDEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV	531
Seed	EDEGEDEDEGEDEDEDEPDEWHDDTYVHAVAYSIAKADTSRIEINTFDATVTQIIAEAV * *****	531
Nayarit	GFIVSATMDGPKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	590
RS	GFIVSATMDGPKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	590
Ro	GFIVSATMDGPKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	581

Turq	GFIVSATMDGPKVASHQACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	597
Chiapas	GFIVSATMDGPKVASHEACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	591
Seed	GFIVSATMDGPKVASHQACTMKIVTKNAGKIRAKFSHRIQCYEAEKPHTSPAASSEEQS	591
	*****:*****	
Nayarit	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	650
RS	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	650
Ro	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	641
Turq	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	657
Chiapas	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	651
Seed	VQVEPNSTSSVVPIKILSGEGSDKLECEVQLYSSTVSLLETFFVKASLATPTITVGPDV	651

Nayarit	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	710
RS	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	710
Ro	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	701
Turq	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	717
Chiapas	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	711
Seed	RSFDKFTDTSKEDHELKIGAMLSDNMCTCNAGEVGCFFRNFGKCMRHAFNKYYTWFVLGI	711

Nayarit	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	770
RS	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	770
Ro	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	761
Turq	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	777
Chiapas	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	771
Seed	TGLSFLALLPVFIPLARVVFVKISEGRARARIRREAAQEIERIRREIHHDEERYGRPEFR	771
	*****:*****	
Nayarit	SRHSDEV	777
RS	SRHSDEV	777
Ro	SRHSDEV	768
Turq	SRHSDEV	784
Chiapas	SRHSDEV	778
Seed	SRHSDEV	778

Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína HAP2 de cepas de *B. bigemina* de regiones geográficas diferentes. En amarillo se encuentra señalado el dominio HAP2, el cual está conservado en el 100 % en las 5 diferentes cepas: Nayarit, Río grande da Sur, Rondonia, Turquía y Seed. Por su parte la cepa Chiapas presenta un cambio de una Aspargina por una cisteína.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *hap2*

La expresión a nivel transcripcional del gen *hap2* fue evaluada mediante RT-PCR en fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro* y en fases sexuales intraeritrocíticas, como se muestra en la figura 19. El resultado de este experimento, mostró la presencia de transcritos en fases sexuales, indicando que el gen *hap2* se expresa en fases sexuales inducidas de manera *in vitro*. Cuando se analizó la transcripción de *hap2* en las fases eritrocíticas asexuales también se observó la amplificación. Los controles negativos de eritrocitos no infectados y RT- no evidenciaron el amplicón (Fig.19).

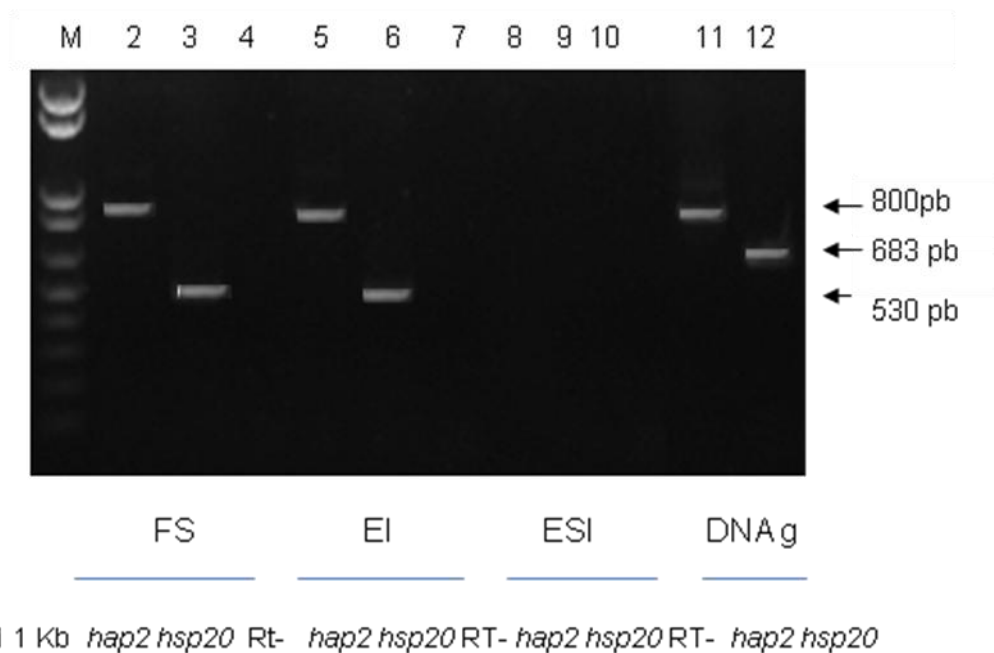


Figura 19. Análisis de la expresión transcripcional de los genes *hap2* y *hsp20* de *B. bigemina* mediante RT-PCR. Carril: 1: Marcador de DNA de 1Kb; carril 2: transcripción de *hap2* en fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro* (FS); carril 3: Transcripción de *hsp20* en FS; carril 4: Control RT- de *hap2* en FS; carril 5: Transcripción de *hap2* en eritrocitos infectados (EI); carril 6: Transcripción de *hsp20* en EI; carril 7: control RT- de *hap2* en EI; carril 8: Transcripción de *hap2* en eritrocitos no infectados; (ESI) carril 9: Transcripción de *hsp20* (ESI); carril 10: Control RT- en eritrocitos no infectados (ESI); carril 11: Amplificación del gen *hap2* a partir de DNA genómico; carril 12: Amplificación del gen *hsp20* a partir de DNA genómico.

LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HAP2

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias, usando los anticuerpos policlonales contra la proteína HAP2, indican que la proteína HAP2 en *B. bigemina* es expresada en fases sexuales inducidas *in vitro*, así como en fases asexuales eritrocíticas y está ausente en eritrocitos de bovino sin infectar (Fig.

20); lo que se coincide con los resultados del análisis de la expresión del gen *hap2* a nivel transcripcional, antes mencionado.

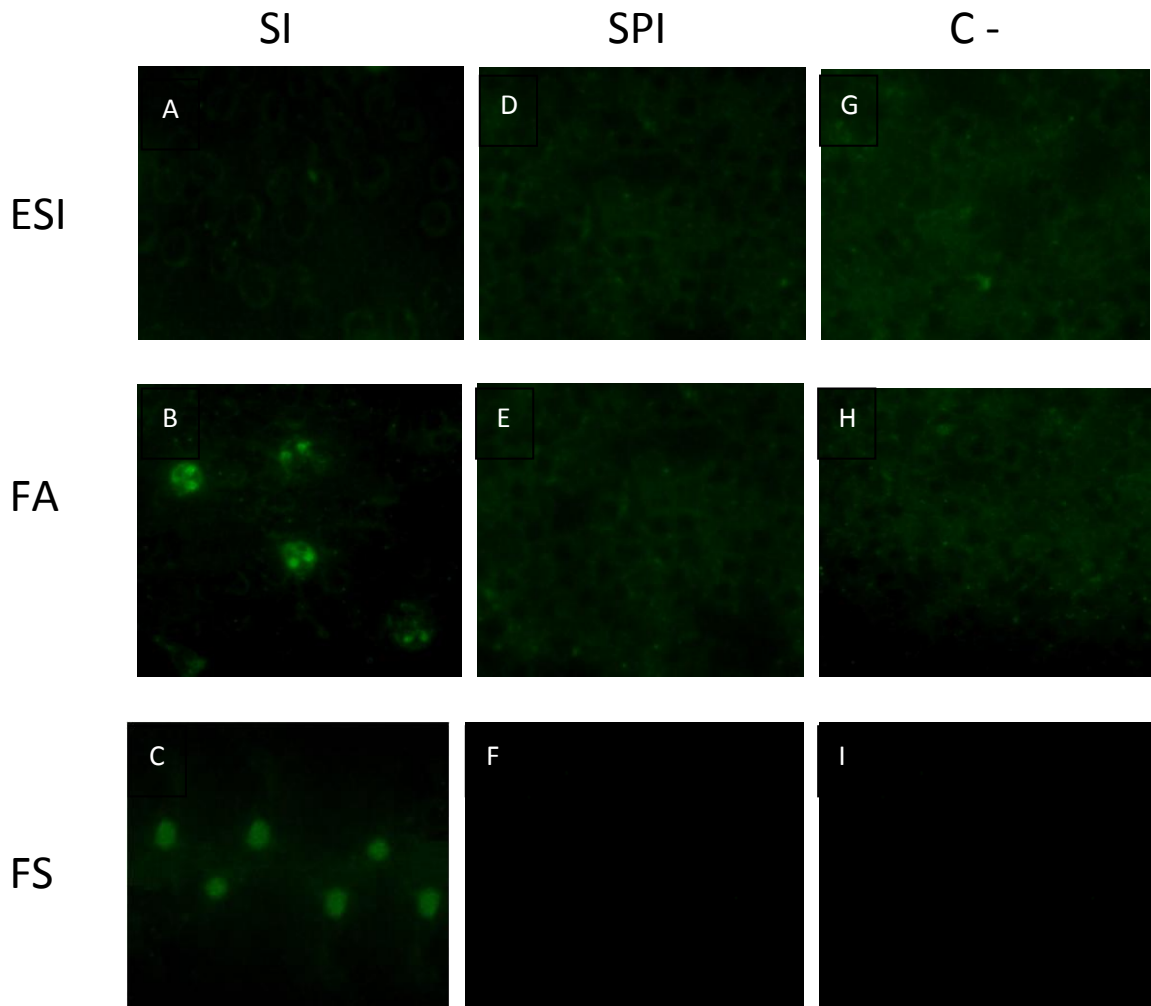


Figura 20. Localización de la proteína HAP2 en *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia. A) Ausencia de la proteína HAP2 en eritrocitos sin infectar (ESI) usando suero inmune B) Localización de la proteína HAP2 en fases intraeritrocíticas asexuales (FA) y C) Fases sexuales (FS) de *B. bigemina*, con suero inmune contra HAP2. D-F) El suero preinmune no indicó reconocimiento de HAP2 en ninguna de las muestras. G-I) Controles negativos; muestras incubadas sólo con el conjugado FITC para descartar la obtención de una señal inespecífica provocada por el conjugado.

IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA *HAP2*

La proteína *HAP2* fue identificada mediante Western blot usando anticuerpos policlonales contra *HAP2* obtenidos anteriormente a partir de péptidos sintéticos; los resultados obtenidos en este experimento fueron congruentes con los que ya se tenían de la RT-PCR y las inmunofluoresencias, debido a que la proteína *HAP2* fue identificada únicamente en muestras de fases sexuales indicadas *in vitro* y en fases intraeritrocíticas asexuales, corroborando una vez más que *HAP2* está ausente en eritrocitos no infectados. El suero preinmune no presentó reconocimiento inespecífico en ninguna de las muestras, lo que nos indicó que la banda que nosotros observamos usando el suero inmune correspondía a la proteína *HAP2*. (Figura 21).

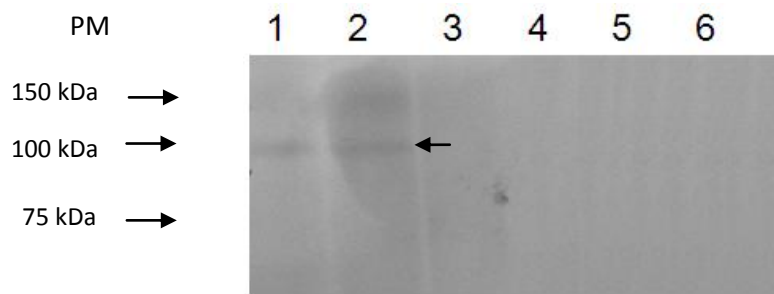


Figura 21. Extractos proteícos de fases intraeritrocíticas asexuales, fases sexuales inducidas *in vitro* y eritrocitos no infectados, se corrieron en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue revelada con un anticuerpo específico anti-HAP2 (carriles 1-3) y suero preimmune carriles (4-6). Carriles 1 y 4: fases asexuales intraeritrocíticas; carriles 2 y 5: fases sexuales inducidas *in vitro*; carriles 3 y 6: eritrocitos no infectados. La proteína HAP2 fue identificada en fases intraeritrocíticas asexuales y fases sexuales inducidas *in vitro* con un peso molecular aparente de 82 kDa, indicadas con una flecha en los carriles 1 y 2 de la figura.

7.- DISCUSIÓN

Los parásitos de *B. bigemina* se caracterizan por tener una fase sexual que es de vital importancia para poder completar exitosamente su ciclo biológico. En esta fase, la unión y fusión de los gametocitos, que dan lugar al cigoto, son pasos críticos; por lo que es de relevancia encontrar proteínas que estén participando en este importante evento.

El proceso para la formación del cigoto es esencial para la mayoría de los organismos eucariontes, y es justamente por esta razón que diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar moléculas claves que puedan ser utilizadas como blancos potenciales para el bloqueo de la transmisión. Recientemente, se ha reportado el papel de la proteína HAP2 en diferentes organismos como *Lilium longiflorum*, *Plasmodium berghei*, *Arabidopsis thaliana* entre otros, donde se ha evidenciado es indispensable para que se lleve a cabo la fusión de los gametos. Cuando HAP2 se encuentra ausente o mutada, la fusión de los gametocitos es imposible y por consecuencia la continuidad del ciclo biológico se ve interrumpida.

En estudios realizados con *Plasmodium berghei*, un parásito apicomplejo causante de la malaria, se ha demostrado que la proteína HAP2 es esencial para la fertilización de los patógenos. Hirai y colaboradores en el 2008 mediante mutagénesis generaron parásitos mutados que tenían ausente el gen *hap2*. Ellos observaron que, a pesar de que la morfología de los parásitos mutados fue indistinguible de los normales y de que en la sangre las fases sexuales eritrocíticas se desarrollaron normalmente; estos parásitos, sin embargo, no mostraron infectividad en mosquitos. Estos hallazgos resaltaron la

importancia de este gen en la reproducción sexual, pero no es el desarrollo de las fases asexuales (Hirai *et al.* 2008). Hasta el momento no se ha reportado la presencia función precisa de esta proteína.

Debido a la importancia económica de la babesiosis bovina en México causada por *B. bigemina*, y basados en el hecho de que este protozoario apicomplejo también tiene una fase de multiplicación asexual en la sangre de los bovinos infectados y una fase de multiplicación sexual en el hospedero vector; en este trabajo nos propusimos identificar y caracterizar mediante el uso de herramientas bioinformáticas al gen *hap2* en dicho patógeno. Esta molécula, estudiada en diferentes especies incluyendo parásitos apicomplexos, se encuentra muy conservada, ya que su estructura cuenta con una región transmembranal, un péptido señal y un dominio HAP2 al cual hasta el momento se le atribuye la función (Hirai *et al.* 2008) .

El gen que nosotros en este trabajo encontramos en *B. bigemina* tiene un tamaño de 2771 pb y codifica para una proteína de 746 aminoácidos. Al analizar la secuencia peptídica predicha de esta proteína encontramos que cuenta con las características ya reportadas para las proteínas HAP2 de otros organismos, lo que indica que, posiblemente *B. bigemina* sí cuenta con un homólogo HAP2, con una posible función similar a la ya reportada. Posteriormente, amplificamos el gen *hap2* a partir de DNA genómico de *B. bigemina*, cuya secuencia confirmó la presencia de este gen en el genoma de este parásito.

Después se evaluó el grado de conservación de esta proteína en cepas de *B. Bigemina* de regiones geográficas diferentes, pues hasta el momento sólo

existen reportes acerca del grado de conservación de esta proteína entre diferentes especies y no entre cepas de la misma especie. En *B. bigemina* se ha reportado que GP45 que es una proteína antigénica de superficie, está ausente en al menos dos aislados de Puerto Rico y no se transcribe en un aislado mexicano (Fisher *et al* 2001). De manera análoga, el gen *msa-1* se ha estudiado en diferentes aislados mexicanos de *B. bovis* encontrándose variabilidad significativa entre ellos, a pesar de pertenecer a una misma región geográfica (Borgonio V. *et al* 2007). Esto mismo se observó con los genes *msa-2b* y *msa-2c*, que codifican antígenos de superficie de *B. bovis*, sugiriendo que la variabilidad alélica en genes de *Babesia* es elevada. En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *hap2* de *B. bigemina*, y con ellos se amplificó y secuenció el gen en 6 cepas de regiones geográficas diferentes. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de este gen en las 6 cepas analizadas, observándose diferencias en el número de nucleótidos, así como algunas mutaciones que en su mayoría son silenciosas pues la proteína codificante no se altera. Las secuencias obtenidas presentaron entre el 98 y 99 % de conservación entre las diferentes cepas. Con estos resultados pudimos evaluar el grado de conservación que tiene esta proteína de *B. bigemina* en distintas regiones geográficas distintas del mundo; lo que indica que *hap2* es un gen extremadamente conservado.

Un análisis significativo que se realizó fue el del grado de conservación del dominio HAP2, encontrándose un 100 % de conservación de este dominio entre las diferentes cepas sin importar que procedieran de regiones geográficas tan distintas como Brasil o Turquía. Estos resultados sugieren que la proteína HAP2 es de vital importancia para *B. bigemina* y que posiblemente el dominio

HAP2 en esta especie, al igual que en las demás especies estudiadas, sea el responsable de la función de esta proteína como se ya ha planteado (Hirai *et al* 2008; Liu *et al*; 2008).

Posteriormente, evaluamos si el gen *hap2* se estaba expresando en fases sexuales como se ha reportado en los diferentes organismos ya antes mencionados. Para esto, se usó la técnica de RT-PCR con la que se amplificó un fragmento del transcrito *hap2* en fases sexuales. Con el fin de incrementar la confiabilidad de los resultados, usamos como control de carga el gen *hsp20* que tiene un intrón, por lo que cuando se amplifica este gen se aprecian claramente las diferencias de tamaño entre amplicones de DNAc y de DNAg. Basados en estudios realizados en *Plasmodium berghei* donde la expresión de esta proteína únicamente ocurre en gametocitos y gametos pero no en fases asexuales eritrocíticas (Hirai *et al* 2008), hipotetizamos que la expresión de la proteína HAP2 de *B. bigemina* estaba limitada a las fases sexuales por lo que se esperaba observar ausencia del transcrito de este gen en estadios intraeritrocíticos asexuales. Como control de estadio del parásito se usó DNAc a partir de eritrocitos infectados, sin embargo los resultados obtenidos no concordaron con los esperados pues se observó presencia de transcritos de *hap2* tanto en parásitos intraeritrocíticos asexuales como en las fases sexuales, lo que nos indica que el gen *hap2* de *B. bigemina* tiene una actividad transcripcional distinta a la reportada en otras especies de parásitos apicomplexos. Este resultado fue corroborado en 6 ocasiones y, por lo tanto indica que *hap2* se expresa a nivel transcripcional en fases sexuales y asexuales. Posteriormente, evaluamos mediante herramientas de bioinformática si la proteína HAP2 presenta un dominio adicional al dominio

HAP2 que indicara una segunda posible función de esta proteína y que pudiera ser la razón por la que esté presente en los estadios que estábamos analizando; no obstante la secuencia aminoacídica no presentó un segundo dominio que coincidiera con los reportados a la fecha y que indicara una función adicional.

Como paso siguiente, se realizó la localización de la proteína HAP2 en las fases sexuales y asexuales, empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta en laminillas con muestras de fases sexuales inducidas *in vitro* y eritrocitos infectados. Los resultados obtenidos de este experimento fueron congruentes con los evidenciados anteriormente por RT-PCR; pues la proteína HAP2 fue localizada tanto en fases sexuales inducidas de manera *in vitro* como en fases asexuales intraeritrocíticas. Con estos resultados podemos afirmar que HAP2 de *B. bigemina* se transcribe y expresa en fases sexuales y asexuales y, por lo tanto presenta una expresión diferente a la reportada para este gen en otros organismos.

Finalmente, la inmunodetección de la proteína HAP2 fue realizada por Western Blot, usando anticuerpos específicos. Los resultados indicaron señal positiva de expresión en muestras de proteínas totales tanto de fases sexuales de *B. bigemina* como de fases asexuales intraeritrocíticas. Esto es congruente con los hallazgos en la expresión transcripcional del gen *hap2* (RT-PCR) y con la localización de la proteína por inmunofluorescencia. Por todo lo anterior podemos afirmar que la expresión del gen *hap2*, así como de la proteína HAP2 en *Babesia bigemina* se presenta en fases sexuales y asexuales y es distinta a lo que se ha reportado para otros genes *hap2* en otras especies de parásitos apicomplexos, donde se sabe tiene actividad transcripcional exclusivamente en

estadios sexuales, y HAP2 ha sido localizada e identificada únicamente en gametocitos o fases sexuales. Por otro lado, en el 2007 Brayton y sus colaboradores al reportar el genoma completo de *B. bovis*, una especie de *Babesia* muy parecida a *B. bigemina*, indican que debido al pequeño tamaño del genoma de estos parásitos, las rutas enzimáticas presentan una reducción metabólica; por lo que genes que se han demostrado tienen actividad transcripcional exclusiva de algún estadio en otros parásitos apicomplexos, en *Babesia* se han visto expresados constitutivamente. Esta información podría explicar la razón por la cual la expresión del gen *hap2*, así como la localización e identificación de la proteína *hap2*, en *B. bigemina* no correlaciona con lo ya reportado para otros géneros de parásitos apicomplexos con genomas más grandes.

Al hacer una búsqueda bibliográfica se encontró que la proteína de membrana p67 en *T. parva* es expresada únicamente en esporozoitos. En *B. bovis* existe una proteína homóloga a p67, y por RT-PCR se ha visto que ésta es transcrita en fases asexuales y en quinetos, que son dos fases distintas a los esporozoitos (Brayton *et al* 2007). El genoma de *B. bovis* hasta la fecha es uno de los más pequeños cuando de apicomplexos se habla; posiblemente ésta sea la razón por la que ciertos genes tienen una expresión en estadios distintos a lo reportado en otros organismos. Consistentemente, el análisis de las vías enzimáticas ha revelado una reducción metabólica, lo que pudiera sugerir que estos genes posiblemente tienen una segunda función que no ha sido reportada.

Es este trabajo demostramos que existe un gen homólogo al gen *hap2* en el genoma de *B. bigemina*; y que tanto el gen como la proteína se encuentran

conservados en cepas de distintas zonas geográficas del mundo. También se demostró que el gen contiene una secuencia codificante para el dominio HAP2 que está totalmente conservado entre las cepas analizadas y que el gen se transcribe y se expresa en fases sexuales y en fases asexuales de *B. bigemina*.

8.-CONCLUSIONES

- 1.- Mediante técnicas bioinformáticas y moleculares se identificó el gen *hap2-like* en *B. bigemina*.
- 2.- El gen *hap2-like* y el posible dominio funcional en *B. bigemina* se encuentra altamente conservado en cepas de regiones geográficas diferentes.
- 3.- El gen *hap2-like* de *B. bigemina* es transcripcionalmente activo en fases intraeritrocíticas asexuales y fases sexuales inducidas *in vitro*.
4. La proteína HAP2 de *B. bigemina* se expresa tanto en fases intraeritrocíticas asexuales como en fases sexuales inducidas *in vitro* y está ausente en los eritrocitos no infectados.

9.- PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar ensayos por microscopía confocal de la proteína HAP2 en fases intraeritrocíticas asexuales y fases sexuales inducidas *in vitro*.
- 2.- Clonar y expresar el dominio HAP2 para producir anticuerpos específicos y demostrar mediante ensayos *in vitro* el bloqueo de la formación de los cigotos en *B. bigemina*.
- 3.- Mutar el dominio HAP2 para confirmar *in vivo* la función de esta proteína en la formación de cigotos de *B. bigemina*.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Bautista C; Alvarez, J; Mosqueda J; Falcon A; Ramos J; Carmen Rojas C; Figueroa J and Kub M; Enhancement of the Mexican Bovine Babesiosis Vaccine Efficacy by Using *Lactobacillus casei*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*. 2008;1149,126-130
2. Blackman, M.J., Bannister, L.H., Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol*; 2001;117,11–25.
3. Blagborough Andrew and Sinden Robert; *Plasmodium berghei* HAP2 induces strong malaria transmission-blocking immunity in vivo and in vitro. *Vaccine* 2009; 27,5187–5194.
4. Bock R; Jackson L; De Vos A and Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology*; 2004;129, S247–S269.
5. Boue O., Redondo M.,Montero C., Rodriguez M., de la Fuente, J., Reproductive and safety assessment of vaccination with GAVAC (TM) against the cattle tick (*Boophilus microplus*); *Theriogenology*; 1999;51,1547–1554.
6. Brayton K; Lau A; Herndon D; Hannick L; Kappmeyer L; Berens S; Bidwell S; Brown W; Crabtree J; Fadrosch D; Feldblum T; Forberger H; Haas B; Howell J; Khouri H; Koo H, Mann D; Norimine J; Paulsen L;

- Radune D; Ren Q;. Smith R; Suarez C; White O, Wortman J; Nene V;
Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of
Apicomplexan Hemoprotezoa. PLoS Pathogens; 2007; 3:10,1401- 1413
7. Brown W. C., Ruef B. J., Norimine J., Kegerreis K. A., Suarez C. E.,
Conley P. G., Stich R.W., Carson K. H. And Rice –Ficht A. C. A novel
20-kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina*
stimulates memory CD4(+) T lymphocyte responses in *B. bovis*-immune
cattle. Molecular and Biochemical; Parasitology; 2001; 118, 97–109.
 8. Buening, G.M., Figueroa, J.V.: Development and application of DNA
probe and PCR diagnostic methods in bovine babesiosis. In: Use of
applicable biotechnological methods for diagnosing
haemoparasites. Uilenberg, G., Permin, A., & Hansen, J.W. (eds.) Food
and Agricultural Organization of the United Nations, Rome; 1994, 38-45.
 9. Buening, G.M.: Diagnosis of babesiosis: Past, present and future.
Memorias Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal.
Garrapatas y enfermedades que transmiten; 1991,180-89.
 10. Carson C. A; Timms P., Cowman A; F; and Stewart N. P; *Babesia*
bovis: evidence for selection of subpopulations during attenuation;
Experimental Parasitology; 1990; 70, 404–410.

11. De Vos A. J. and Jorgensen W. K; Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In Tick Vector Biology; Medical and Veterinary Aspects; 1992, 159–174
12. De waal D; Combrink M; Live vaccines against bovine babesiosis. Veterinary parasitology; 2006; 138, 88-96
13. Figueroa, J.V., Buening, G.M.: Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. Vet. Parasitol; 1995;75, 75-92
14. Figueroa, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S. and Buening, G.M.; Detection of Babesia bigemina-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. J. Clin. Microbiol; 1990; 2576-82.
15. Fish L., Leibovich B., Krigel Y., McElwain T. and Shkap V. Vaccination of cattle against B. bovis infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. Vaccine; 2008; G29-G33.
16. Florin-Christensen M; Suarez CE; Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF. The Babesia bovis merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. Infect. Immun ;2002; 70,566–3575.

17. Gaffar F.R., Yatsuda A.P; Franssen F F; de Vries E; 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.; 2004; 136,25–34.
18. Garcia-Garcia J.C., Montero C., Redondo M., Vargas M., Canales M., Boue O., Rodriguez M., Joglar M., Machado H., Gonzalez I.L., Valdes M., Mendez L., de la Fuente J.,. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*.; Vaccine; 2000;18,2275–2287.
19. Goodman C; and McFadden I; Gamete Fusion: Key protein Identified. Current Biology; 2008.18:13
20. Hirai M; Arai M; Mori T; Miyagishima S; Kawa S, Kita K; Kuroiwa T; Terenius O; and Matsuoka H. Male Fertility of Malaria Parasites Is Determined by GCS1, a Plant-Type Reproduction Factor. Current Biology; 2008;18,607–613.
21. Hiraia M; Morib T. Fertilization is a novel attacking site for the transmission blocking of malaria parasites. Acta trop; 2009;1-5
22. Homer M; Delfin I; Telford III S; Krause P; Persing D. Babesiosis. Clin. Microbial. Reviews; 2000; 22,251-469

23. Howell, S.A., Well, I., Fleck, S.L., Kettleborough, C., Collins, C.R., Blackman, M.J., A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. J. Biol. Chem; 2003; 278,23890–23898
24. Hunfeld P; Hildebrandt and Gray J. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease;
International Journal for Parasitology; 200; .38,1219–1237
25. Liu Y; Tewari R, Ning J.. The conserved plant sterility gene HAP2 functions after attachment gametes of fusogenic membranes in Chlamydomonas and Plasmodium. Genes Dev. 2008; 22, 1051-1068
26. Mori T; Kuroiwa H; Tetsuya T; and T Kuroiwa T; GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. Nature cell; 2005; 8,64-71
27. Mosqueda J; McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., *Babesia bovis* Merozoite Surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. Infect. Immun; 2002; 70: 11: 6448–6455.
28. Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are

- expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect. Immun*; 2002; 70: 3,1599–1603.
- 29.Okamura M; Yokoyama N; Takabatake N; Okubo K; Ikehara Y ; Igarashi I; *Babesia bovis*: Subcellular localization of host erythrocyte membrane components during their asexual growth. *Experimental Parasitology*; 2007; 116, 91–94
- 30.Shoda L. K., Palmer G. H., Florin-Christensen J., Florin-Christensen M., Godson D. L. and Brown W. C. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor α , and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and Immunity*; 2000; 68, 5139–5145.
- 31.Suarez CE, Palmer GH, Florin-Christensen M, Hines SA, Hötzel I, McElwain TF; Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus; *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 127:2,101-12.
- 32.Timss P., Stewart N. P. and De vos A. J.;. Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. *Infection and Immunity*; 1990; 58, 2171–2176.

- 33.Starcovici, C., Bemerkungen u"ber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte H"moglobinurie des Rindes
- 34.(Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). Zbl. Bakt., I. Abt. 1893; 14, 1–8.
- 35.Suarez CE, Palmer GH, LeRoith T, Florin-Christensen M, Crabb B, McElwain TF; Intergenic regions in the rhostry associated protein-1 (rap-1) locus promote exogenous gene expression in Babesia bovis. Int J Parasitol. 2004; 34:10, 1177-84.
- 36.Uilenberg Gerrit; Babesia—A historical overview; Veterinary Parasitology; 2006; 138, 3–10
- 37.Willdsen P; Tick control: Thoughts on a research agenda. Veterinary parasitology; 2006; 138,161-168
- 38.Yokoyama N; Okamura M and Igarashi I; Erythrocyte invasion by Babesia parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage; Vet. Parasitol; 2006; 138,22-32.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la IBT. Marisol Karina Rocha Martínez

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Dra. Mavil López Casamichana

Dr. Israel López Reyes
