



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Identificación de epitopes B conservados en antígenos de superficie del hemoparásito *Babesia bovis* para el desarrollo de nuevas medidas de control para la babesiosis bovina.

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Mariana Dominguez

Director de tesis: Dra. Mónica Jacobsen

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Patobiología, CICV y A, INTA Castelar

Buenos Aires, 2008

Identificación de epitopes B conservados en antígenos de superficie del hemoparásito *Babesia bovis* para el desarrollo de nuevas medidas de control para la babesiosis bovina

Resumen

Babesia bovis es un protozoo intraeritrocítico transmitido a los bovinos por la garrapata *Rhipicephalus microplus* y causante de importantes pérdidas económicas en vastas regiones cálidas del mundo. Esta Tesis se enfocó en el estudio de la familia de proteínas MSA-2 (Merozoite Surface Antigen-2) de *B. bovis* para evaluar su utilidad como candidatos vacunales y diagnósticos. En primer lugar, se encontró que un miembro de esta familia, MSA-2c, contiene epitopes B expuestos superficialmente que están conservados entre dos cepas argentinas; y asimismo epitopes B sensibles a la neutralización. Para ampliar estas observaciones, se obtuvieron secuencias predichas de aminoácidos de MSA-2c y otros dos miembros de esta familia (MSA-2a1 y -2b) de varios aislamientos de *B. bovis* de Argentina, México y USA. Se identificaron *in silico* epitopes B en zonas altamente conservadas. Se obtuvieron péptidos sintéticos de cuatro de ellos, y se produjeron antisueros murinos. Los sueros reaccionaron con la superficie de merozoitos de una cepa argentina y una mexicana, indicando que estos epitopes B predichos son realmente expresados en ambos parásitos. Dos de estos epitopes B resultaron además sensibles a la neutralización y constituyen por tanto atractivos candidatos para una vacuna multiepitópica. Por otra parte, se observó la presencia de anticuerpos anti-MSA-2c en abundantes muestras de suero de bovinos infectados experimental y naturalmente con *B. bovis*. Por ello, se exploró su utilidad como antígeno de diagnóstico. Se desarrolló un ELISA indirecto, que fue efectivo para infecciones experimentales pero solo parcialmente eficiente para infecciones de campo. Para mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo, se produjo un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c y se desarrolló un ELISA competitivo que es altamente prometedor para el diagnóstico serológico de muestras tanto bovinas como de otros animales que pueden actuar como reservorios de *B. bovis*.

Palabras claves: *Babesia bovis*, epitopes B, vacuna multiepitópica, candidatos vacunales y diagnósticos, ELISA indirecto, ELISA competitivo.

**Identification of conserved B-cell epitopes in surface antigens of the hemoparasite
Babesia bovis for the development of new control measures for bovine babesiosis**

Abstract

Babesia bovis is an intraerythrocytic protozoon, transmitted to bovines by *Rhipicephalus microplus* ticks, that causes important economic losses in vast warm regions of the world. This Thesis was focused on the study of the MSA-2 (Merozoite Surface Antigen-2) protein family of *B. bovis*, to evaluate their usefulness as vaccine and diagnostic candidates. First, it was found that one member of this family, MSA-2c, contains surface-exposed B-cell epitopes, that are conserved between two Argentine strains, and also, neutralization-sensitive B-cell epitopes. To deepen these observations, predicted amino acid sequences were obtained for MSA-2c and other two members of this family (MSA-2a1 and -2b) from several *B. bovis* isolates from Argentina, Mexico and USA. B-cell epitopes in highly conserved regions were identified *in silico*. Synthetic peptides were obtained for four of them and murine anti-sera were produced. All sera reacted with the surface of merozoites of an Argentine and a Mexican strain, indicating that these B-cell epitopes are actually expressed in both parasites. Two of these B-cell epitopes turned out to be neutralization-sensitive and thus, constitute attractive candidates for a multiepitopic vaccine. On the other hand, the presence of anti-MSA-2c antibodies was observed in abundant serum samples of *B. bovis*-experimentally and naturally-infected bovines. For this reason, its usefulness as diagnostic antigen was explored. An indirect ELISA was developed, that resulted effective for experimental infections, but only partially efficient for field samples. To improve the sensitivity and specificity of the assay, a monoclonal antibody against MSA-2c was produced and a competitive ELISA was developed. This assay is highly promising for the serological diagnosis of samples both from bovines and from other animals that can act as *B. bovis* reservoirs.

Key words: *Babesia bovis*, B- cell epitopes, multiepitopic vaccine, vaccine and diagnostic candidates, indirect ELISA, competitive ELISA

Los resultados de este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en numerosos Congresos nacionales e internacionales y en los siguientes artículos en revistas científicas internacionales con referato:

- *In silico predicted conserved B-cell epitopes in the Merozoite Surface Antigen -2 family of B. bovis are neutralization-sensitive.* **Dominguez, M.**, Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Mosqueda, J., Suarez, C., Florin-Christensen, M. Veterinary Parasitology, 2008, en prensa.
- *Water buffalos as carriers of Babesia bovis in Argentina.* Ferreri, L., Benitez, D., **Dominguez, M.**, Rodríguez, A., Asenzo, G., Mesplet, M., Florin-Christensen, M. and Schnittger, L. Annals of the New York Academy of Sciences 1149: 149-151. (2008).
- *Search for Babesia bovis vaccine candidates.* Florin-Christensen, M., Schnittger, L., **Dominguez, M.**, Mesplet, M., Rodriguez, A., Ferreri, L., Asenzo, G., Wilkowsky, S., Farber, M., Echaide, I., Suarez, C. Parasitologia Vol. 49, Suppl. 1: 9-12. (2007)
- *Use of a monoclonal antibody against Babesia bovis Merozoite Surface Antigen-2c for the development of a competitive ELISA test.* **Mariana Dominguez**, Osvaldo Zabal, Silvina Wilkowsky, Ignacio Echaide, Susana Torioni de Echaide, Gustavo Asenzo, Anabel Rodríguez, Patricia Zamorano, Marisa Farber, Carlos Suarez and Monica Florin-Christensen. Annals of the New York Academy of Sciences 1026: 1–6. (2004).
- *Babesia bovis merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle.* Wilkowsky S.E., Farber M., Echaide I., Torioni de Echaide S., Zamorano P.I., **Dominguez M**, Suarez C.E. and Florin-Christensen M. Molecular and Biochemical Parasitology 127 (2): 133-141. (2003).

Agradecimientos

A la Dra. Mónica Jacobsen, por su voto de confianza desde el primer momento, su excelente dirección en este proyecto y principalmente por ayudarme, aconsejarme y permitirme desarrollar y crecer en este camino de la investigación.

A los Dres. Ana María Sadir y Fernando Fernández del Instituto de Virología, que desde su lugar me dieron un espacio para poder desarrollar mi trabajo.

A todo el Instituto de Patobiología, desde su Director Luis Samartino y todas las personas que trabajan allí, por su recibimiento y buena predisposición para hacernos sentir cómodos.

A mis compañeros del grupo Parásitos Patógenos: Alicia, Lucas, Agustina, Marina, Gisela, Anabel, Gustavo y María.

Al Dr. Leonhard Schnittger por su colaboración en la búsqueda bibliográfica, su buena predisposición y enseñanzas y la oportunidad de acompañarlo en el curso de Misiones.

A la Dra. Silvina Wilkowsky del Instituto de Biotecnología por los resultados y fotos de inmunofluorescencia, neutralización y Western Blot con rMSA-2c, en la obtención de los cuales colaboré en mis comienzos en el grupo; y por su invaluable colaboración, ayuda y consejos cada vez que los necesité.

Al Lic. Gustavo Asenzo del Inst. de Virología por las fotos de la expresión y purificación de MSA-2c, la proteína EMA-1 y los datos correspondientes al ELISA indirecto contra rMSA-2c y RAP-1 con sueros de una infección experimental, que fueron parte de su tesina de licenciatura, en la obtención de los cuales colaboré ayudando a poner a punto los ELISAs.

Al Lic. Lucas Ferreri por los datos concernientes al ELISA competitivo utilizando sueros bubalinos, que fueron parte de su tesina de licenciatura, en la obtención de los cuales participé como colaboradora.

A la Dra. Marisa Farber del Instituto de Biotecnología por suministrar la proteína RAP-1 que se utilizó en los ensayos de ELISA indirecto y por su inmensa colaboración, apoyo y consejos en esta tesis.

A la Lic. Romina Petri del Instituto de Biotecnología, por los resultados correspondientes al ELISA indirecto anti RAP-1 utilizando sueros de muestras de campo, que fueron fruto de un trabajo colaborativo, y la foto de purificación de RAP-1.

A la Dra. Patricia Zamorano del Inst. de Virología por su dirección en mis comienzos y su co-dirección en la beca doctoral de CONICET, sus consejos y su colaboración junto a Valeria Olivera en el ensayo de linfoproliferación y en la determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal utilizado en esta tesis.

Al Dr. Osvaldo Zabal y su equipo de Cultivo de tejidos del Inst. de Virología por la colaboración en la obtención del anticuerpo monoclonal

A todos mis compañeros del Instituto de Virología, Vacunas y Biotecnología, Sala de lavado, Secretaría, y Campo Experimental con los que compartí todos estos años.

A mis compañeras de la facu y amiga/os Alea, Vanesa, Karina, Verónica, Carolina, Valeria, Sandra, Marian, Pitu, Cybele, Chechu, Lupe, Facundo, Cecilia, Ximena y Manuel que transitaron conmigo todas mis etapas desde estudiante hasta el presente.

Al grupo Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán.

A los Dres Ignacio Echaide y Susana Torioni de Echaide, y todo su grupo (Eugenia, Carolina, Trichi, Nerina, Paula, Mariano, Pablo, Mirta y Paola) de la EEA Rafaela, INTA Santa Fe, por proveerme de material para la extracción de ADN, sueros bovinos para los diferentes experimentos, los datos del ELISA de Mz con las muestras de campo y su colaboración en los experimentos de neutralización, inmunofluorescencia y ELISA de Mz y permitirme trabajar tan cómodamente en su laboratorio cuando los visito.

A Bibiana Cetra, Daniel Benítez y toda la gente de la EEA Mercedes, INTA Corrientes que me proveyeron material para la extracción de ADN y muestras de sueros bubalinos.

Al Dr. Mosqueda de la Univ. de Querétaro y a los Dres, Figueroa y Álvarez del CENID, México, y su grupo por proveerme de material de las cepas mexicanas y su colaboración en los experimentos de inmunofluorescencia y haber hecho mi estadía muy enriquecedora.

Al Dr. Carlos Suarez del USDA, Pullman por sus aportes en la discusión de los resultados.

Al CONICET, INTA, y los Subsidios pBID-OC-AR 1728 PICT 00054 (ANPCyT, Argentina; ME/PA03-BVIII/030 (intercambio científico México-Argentina) e INCO-CT-2005-0003691, MEDLABAB (Comisión Europea) por haberme brindado los medios para desarrollar esta tesis.

A mi consejero de estudios, el Dr. Esteban Hopp, por su ayuda y colaboración.

A mis padres, por su apoyo, consejos y siempre inculcarme el valor de la educación pero por sobre todo fomentar en mí los verdaderos valores para ser una persona de bien.

A mi hermana, sobris Nico y Barby, y ahijados Iñaqui y Vicky que trajeron a mi vida luz, sonrisas, alegría y felicidad y son muchas veces el motor que me impulsa a seguir adelante.

**A mi mamá y mi papá, que
siempre confiaron en mí.**

**A mis abuelos, que me guían y
acompañan siempre.**

ABREVIATURAS Y SIGLAS

%I: porcentaje de Inhibición.

%P: porcentaje de positividad.

°C: grados Celsius.

µg: microgramos.

µl: microlitros.

aa: aminoácido/s

Abs._{260 nm}: absorbancia medida a 260 nm.

Abs._{280 nm}: absorbancia medida a 280 nm.

Abs._{405 nm}: absorbancia medida a 405 nm.

Abs._{492nm}: absorbancia medida a 492nm.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Ady.: adyuvante.

BSA: albúmina bovina.

cel.: células.

CICVyA Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas.

CNIA Centro Nacional de Investigaciones Agronómicas.

con.: concentración.

D.E.: desvío estándar

dH₂O: agua destilada.

dil: dilución.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

dpi: Días post infección ó días post inoculación.

dpv: días post vacunación.

ELISA: Enzime-Linked Immunosorbent Assay.

g: gramos

GPI: glicosilfosfatidilinositol.

h.: hora/s

IB: Instituto Biotecnología.

IE: índice de estimulación.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleuquina.

INF-γ: interferón gama.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
IP: índice de proliferación.
kDa: kilodaltons.
LB: medio Luria Bertani
LBA: medio Luria Bertoni Ampicilina
Log₁₀: logaritmo en base 10.
MAb anticuerpo monoclonal.
MB: Medio Básico.
min: minuto/s.
ml: mililitros.
mM: milimolar.
mz: merozoito/s.
NCBI: National Center for Biotechnology Information.
NK: células natural killer.
Nº: número/s.
NO: óxido nítrico.
ON: over night, toda la noche.
ORF: marco de lectura abierto (open reading frame).
Ova: ovoalbúmina o albúmina de clara de huevo.
p.i.: post-inoculación.
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb: pares de bases.
PBS: *buffer* fosfato salino.
PBST: *buffer* fosfato salino-Tween 20.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction).
PM: peso molecular.
Poli A: cola de poli Adenina.
PPE: porcentaje de eritrocitos parasitados.
R.E.: retículo endoplasmático.
s: segundo/s
Sne: suero normal equino.
Taq ADN polimerasa: polimerasa de ADN aislada de *Thermophilus aquaticus*.
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.
Vol: volumen.

I. Indice

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS Y SIGLAS	3
I. INTRODUCCIÓN	15
I. 1. <i>Babesia bovis</i>	15
I. 1.1. Clasificación filogenética.	15
I. 1.2. Estructura morfológica	15
I. 1.3. Ciclo de vida de <i>B. bovis</i>	17
I. 1.4. Invasión de los eritrocitos bovinos por los merozoitos de <i>B. bovis</i> .	20
I. 1.5. Generalidades sobre el vector: la garrapata de los bovinos	22
I. 1.5.1. Ciclo de vida del vector.	25
I. 1.5.2. Distribución en el mundo	26
I. 2. Babesiosis bovina	26
I. 2.1. Respuesta inmune	28
I. 2.2. Signos clínicos	30
I. 3. Medidas de control:	30
I. 3.1. Acaricidas	30
I. 3.2 Campaña de erradicación en U.S.A.	30
I. 3.3 La provincia de Corrientes y su plan de erradicación de la garrapata	32
I. 3.4. Diagnóstico	33
I. 3.5. Tratamiento o Quimioprofilaxis	34
I. 3.6. Vacunación	35
I. 4. Búsqueda de candidatos vacunales	39
H. Hipótesis	45
O. Objetivos.	46
O. I. Objetivo general	46
O. II. Objetivos específicos:	46
M. MATERIALES Y MÉTODOS	47
M. 1. Cepas Utilizadas	47
M. 2. Cultivo de <i>Babesia bovis</i>	48

M. 3. Extracción de ADN de eritrocitos bovinos infectados con <i>B. bovis</i> .	49
M. 4. Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de los genes de la familia VMSA.	50
M. 5. Electroforesis en gel de agarosa	52
M. 6. Clonado y secuenciación de los productos de PCR.	52
M. 6.1. Clonado en vector de secuenciación.	52
M. 6.1.1. Purificación del ADN plasmídico.	55
M. 6.2. Clonado en vector de expresión y transformación de células competentes	55
M. 6.3. Secuenciación automática de los productos amplificados	57
M. 7. Herramientas de bioinformática	57
M. 8. Síntesis y acoplamiento de los epitopes seleccionados	58
M. 9. Expresión y purificación de MSAs	59
M. 9.1. Selección de clones positivos para expresión de proteínas recombinantes.	59
M. 9.2. Inducción de la expresión en los clones seleccionados	60
M. 9.3. Purificación de plásmidos	61
M. 9.4. Purificación de proteínas recombinantes	61
M. 9.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la separación de proteínas	63
M. 10. Sueros de diferentes orígenes utilizados.	63
M. 10.1. Sueros murinos	63
M. 10.1.1. Antiseros contra proteínas recombinantes y contra merozoitos de <i>B. bovis</i> :	64
M. 10.1.2. Sueros anti-péptido	64
M. 10.2. Sueros bovinos	65
M. 10.2.1. Sueros de campo	65
M. 10.2.2. Sueros provenientes de infecciones experimentales con <i>B. bovis</i>	66
M. 10.2.3. Sueros de bovinos inmunizados con antígenos recombinantes de <i>B. bovis</i> .	66
(i) Inoculación con la proteína recombinante purificada MSA-2c	66
(ii) Inoculación experimental con mezcla de proteínas recombinantes purificadas	67
M. 10.3. Sueros bubalinos	67
M. 11. Detección inmunológica de proteínas: <i>Western Blot</i>	67
M. 11.1. Estudio de la reactividad de sueros murinos hacia la proteína MSA-2c	67
M. 11.2. Estudio de la reactividad de sueros bovinos hacia la proteína MSA-2c	68

	Indice
M. 12. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT)	69
M. 12.1. Fija	69
M. 12.2. Viva	70
M. 13. Experimentos de seroneutralización.	70
M. 14. Evaluación de respuesta inmune celular	71
M. 14.1. Ensayo de linfoproliferación	71
M. 15. Anticuerpos Monoclonales	72
M. 16. Técnica de ELISA	74
M. 16.1. ELISA Indirecto contra Merozoitos	74
i) Sueros de bovinos	74
ii) Sueros de ratón	75
M. 16.2. ELISA Indirecto contra MSA-2c y RAP-1.	75
M. 16.2.1. Preabsorción de los sueros bovinos	76
M. 16.3. Ensayo de ELISA para la determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal	77
M. 16.4 ELISA competitivo	77
M. 17. Análisis estadísticos	78
R. RESULTADOS	79
R. I. Resultados Capitulo I: MSA-2c de <i>B. bovis</i> es un candidato vacunal.	79
R. I.1. Producción de la forma recombinante de MSA-2c de la cepa R1A de <i>B. bovis</i> .	79
R. I.1.1. Amplificación del gen de interés por PCR.	79
R. I.1.2. Selección de clones positivos	80
R. I.1.3. Inducción de la expresión en los clones seleccionados	81
R. I.1.4. Purificación de proteínas recombinantes	82
R. I.2. Anticuerpos murinos contra MSA-2c derivada de R1A reconocen proteínas del merozoito de las cepas R1A y la australiana "S" de <i>B. bovis</i> .	83
R. I.3. La proteína MSA-2c posee epitopes B sensibles a la neutralización.	85
R. II. Resultados capitulo II: Estudio del polimorfismo de genes de la familia VMSA en distintas cepas de <i>B. bovis</i> .	88
R. II.1. Comparación de secuencias de MSA-2 de distintos aislamientos y cepas de <i>B. bovis</i> .	88
R. II.1.1. Obtención de ADN	88
R. II.1.2. Amplificación de los genes de la familia MSA-2	89
R. II.2. Análisis bioinformático de las secuencias	93

	Indice
R. II.2.1. Análisis de las secuencias de MSA-2c de distintos aislamientos	93
R. II.2.2. Análisis de las secuencias de MSA-2a y b	99
R. II.2.3. Análisis de una forma intermedia entre MSA-2a y 2-b	106
R. III. Resultados capítulo III: Búsqueda de epitopes B en los miembros de la familia MSA-2 y análisis de los mismos.	108
R. III.1 Análisis de las proteínas MSA-2c, MSA-2b y MSA-2a1.	108
R. III.2. Selección de epitopes para ensayos de inmunización de ratones	124
R. III.3. Reconocimiento de los sueros anti-péptido por merozoitos de <i>B. bovis</i>	126
R. III.3.1. ELISA	126
R. III.3.2. Inmunofluorescencia	128
R. III.3.3. Sensibilidad a la neutralización de los epitopes B seleccionados	129
R. III.3.4. Análisis de la potencial capacidad de los péptidos seleccionados de actuar como epitopes T.	131
R. IV. Resultados Capítulo IV: Desarrollo de métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina basados en un miembro del grupo MSA-2	134
R. IV.1. Epitopes B de la proteína MSA-2c son reconocidos específicamente por el sistema inmune de bovinos infectados con <i>B. bovis</i> .	134
R. IV. 2. Desarrollo de un ELISA indirecto.	136
R. IV. 2.1. Titulación de los antígenos.	137
R. IV. 2.2. Pre-absorción de los sueros	139
R. IV.2.3. Tipos de bloqueantes.	140
R. IV.3. Uso de los ELISAI para evaluar sueros provenientes de infecciones experimentales: comparación entre RAP-1 y MSA-2c en infecciones con R1A y S2P	141
R. IV.3.1. MSA-2c	142
R. IV.3.2. RAP-1	143
R. IV.3.3. Utilización del ELISA indirecto contra MSA-2c y RAP-1 para analizar muestras de campo.	145
R. IV.3.3.1. Calculo del cut-off	145
R. IV.3.3.2. Uso de los ELISAS indirectos para la detección de serología positiva para babesiosis bovina en muestras provenientes de zona endémica.	149
R. IV.4. Desarrollo de un ELISA competitivo.	151
R. IV.4.1. Obtención de un monoclonal y caracterización.	151
R. IV.4.2. Determinación del isotipo.	154
R. IV.4.3. Optimización de ciertos parámetros del ensayo.	154

R. IV.4.4. Uso del cELISA en muestras provenientes de infecciones experimentales y de campo.	156
R. IV.4.5. Uso del Elisa competitivo para la detección de anticuerpos anti <i>B. bovis</i> en el búfalo de agua.	158
R. IV.4.5.1. Tipos de bloqueantes.	159
R. IV.4.5.2. Dilución de los sueros a testear.	160
R. IV.4.5.3. Determinación del punto de corte.	161
R. IV.4.6. Evaluación de sueros bubalinos de campo con el cELISA.	163
D. DISCUSIÓN	165
D. 1. Caracterización molecular e inmunológica de la proteína de superficie del merozoito -2c (MSA-2c) para el desarrollo de nuevas vacunas a subunidades contra la babesiosis bovina	165
D. 2. Estudio del polimorfismo de genes de la familia VMSA en distintas cepas y aislamientos de <i>B. bovis</i>	168
D. 3. Predicción, selección y caracterización experimental de los epitopes B seleccionados.	170
D. 4. Desarrollo de métodos de diagnóstico basados en MSA-2c	173
D. 4.1. Análisis de MSA-2c como antígeno de diagnóstico: Comparación de MSA-2c y RAP-1 en ELISAs indirectos.	173
D. 4.2. Estudio de la expresión de antígenos de superficie de <i>Babesia bovis</i> en el curso de infecciones experimentales	174
D. 4.3. Un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c de <i>Babesia bovis</i> es adecuado para el desarrollo de un test de ELISA competitivo.	177
D. 4.4. Detección de infecciones por <i>Babesia bovis</i> y <i>B. bigemina</i> en búfalos de la provincia de Corrientes.	179
B. BIBLIOGRAFIA	183

I. Introducción

I. Introducción

I. 1. *Babesia bovis*

I. 1.1. Clasificación filogenética.

Los organismos del género *Babesia* sp. son protozoarios, es decir eucariotas unicelulares y pertenecen, dentro de los protistas, al grupo Alveolata. Este es un grupo reconocido recientemente y sus miembros se caracterizan por tener un sistema de sacos debajo de la membrana celular, llamados alvéolos. Los Alveolata se dividen a su vez en cuatro grupos: *Ciliata*, *Foraminifera*, *Dinoflagelata* y *Apicomplexa*. En estos últimos se agrupan las distintas especies de *Babesia*, junto con *Plasmodium* (entre ellos, *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria), *Eimeria*, *Theileria* y *Toxoplasma* (entre ellos, *Toxoplasma gondii*, causante de la toxoplasmosis), y se caracterizan por poseer organelas en su complejo apical llamadas roptrias y micronemas.

De acuerdo al NCBI (National Center for Biotechnology Information, NIH), la ubicación taxonómica actual de *Babesia* sp. es la siguiente:

Phylum:	Apicomplexa
Clase:	Pyroplasma
Orden:	Pyroplasmida
Familia:	Babesiidae
Género:	<i>Babesia</i>

Tabla I. 1.: Ubicación taxonómica de *Babesia* sp. según el NCBI.

El Phylum Apicomplexa está constituido actualmente por más de 300 géneros que a su vez incluyen cerca de 4600 especies de organismos.

I. 1.2. Estructura morfológica

Los Apicomplexa son parásitos intracelulares obligados durante su fase proliferativa y constituyen, probablemente, la principal zoonosis del ser humano.

Con la excepción de algunos gametos de ciertas especies, no poseen cilios ni flagelos.

Poseen complicados ciclos biológicos, con fases sexuales en huéspedes definitivos y asexuales en intermediarios.

El estudio de la estructura de los miembros del Phylum Apicomplexa no fue posible hasta la aparición del microscopio electrónico, que reveló la existencia de una característica exclusiva del grupo: el complejo apical.

La estructura interna del merozoito de un apicomplexa se puede observar en el esquema de la Figura I. 1.

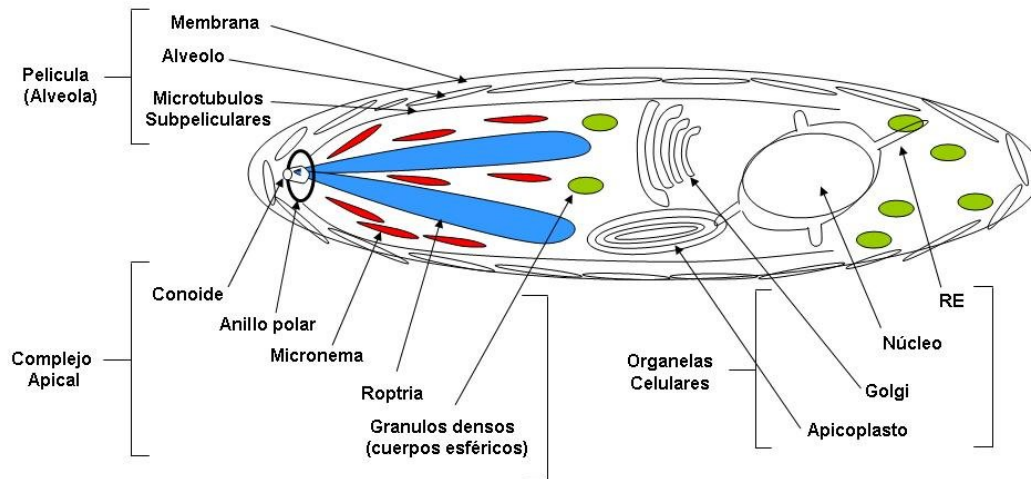


Figura I. 1.: Representación gráfica de un protozoo del grupo Ampicomplexa

En la misma podemos observar que el complejo apical está formado por una serie de estructuras membranosas, situadas en el polo apical del organismo. Está constituido por estructuras claramente diferenciadas como: uno o más anillos polares, un conoide formado por una espiral de microtúbulos, roptrias o toxonemas (generalmente entre 2 y 8), los gránulos densos y los cuerpos esféricos, numerosos micronemas y microtubulos subpelículaes que se extienden desde el anillo polar hasta prácticamente el polo posterior. El contenido de las roptrias es exocitado durante la invasión a la célula hospedadora, por lo cual se ha postulado que el complejo apical tiene un rol fundamental en el proceso de invasión.

Existen usualmente dos formas morfológicamente distintivas de babesia. Una es pequeña, redondeada o con forma de pera y cuando se encuentra unida a otra, forma un ángulo obtuso. El otro tipo es grande, también tiene forma de pera u oval, pero en pareja forma un ángulo agudo. *B. bovis* se encuentra en el primer grupo, como podemos observar en la Figura I. 2., donde se ven eritrocitos infectados por merozoitos que de a pares forman ángulos obtusos.

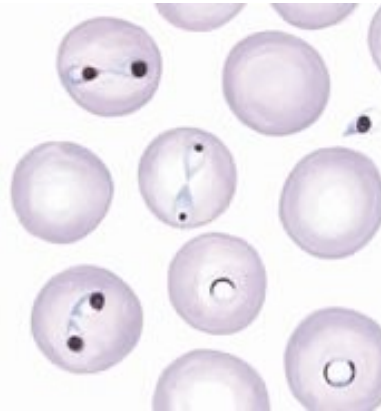


Figura I. 2.: Eritocitos bovinos infectados con *Babesia bovis* y teñidos con Giemsa. Los merozoitos cuando están de a pares forman ángulos obtusos dentro del eritrocito.

Típicamente hay al menos una babesia del tipo grande y otra del tipo pequeña en cada especie de vertebrado susceptible. En el caso del ganado se han identificado así formas grandes y pequeñas como podemos observar en la Tabla I. 2., y este puede ser el caso en otros animales. (Kuttler K., 1988).

Hospedador	1.0-2.5 μ M (pequeña)	2.5-5.0 μ M (grande)
Bovino	<i>B. bovis</i> <i>B. divergens</i>	<i>B. bigemina</i> <i>B. major</i>
Caballo	<i>B. equi</i>	<i>B. caballi</i>
Oveja	<i>B. ovis</i>	<i>B. motasi</i>
Cerdo	<i>B. perroncitoi</i>	<i>B. troutmanni</i>
Perro	<i>B. gibsoni</i>	<i>B. canis</i>
Gato	<i>B. felis</i>	<i>B. herpailuri</i>
Hombre	<i>B. microti</i> (pleomórfica) <i>B. divergens</i>	

Tabla I. 2.: Algunas de las babesias más comunes que afectan a las distintas especies animales y al hombre.

I. 1.3. Ciclo de vida de *B. bovis*

B. bovis atraviesa al menos tres etapas reproductivas: gamogonia (formación y fusión de gametos en el interior del intestino de la garrapata, esporogonia (reproducción asexual de los

esporozoitos en las glándulas salivales) y merogonia (reproducción asexual en el bovino) (Homer, M. J. et al., 2000), como se grafica en la Figura I. 3.

En el vector: Cuando una garrapata pica un animal portador, los eritrocitos infectados llegan al intestino, donde el parásito comienza a sufrir gametogénesis. Algunos de estos gametocitos muestran una organela con forma de cabeza de flecha, llamadas Strahlenkörper o cuerpo rayado, que probablemente estén involucrados en la fusión de las gametas. Una vez formados los cigotos invaden las células basófilas del epitelio intestinal, donde comienzan a dividirse. Toman entonces una forma de bastón llamado esporoquineto. Estos esporoquinetos son liberados a la hemolinfa que los conduce a otras células de la garrapata a las cuales infecta y en las cuales vuelve a dividirse para formar nuevos esporoquinetos. Dentro de las células infectadas se encuentran los oocitos. Esto significa que hay una transmisión transovárica de la garrapata hembra a su descendencia. Iguales ciclos de división mencionados ocurren en los estados de larva, ninfa y adulto de la garrapata. Un último proceso de división ocurre en las glándulas salivales, donde comienza un ciclo de múltiples divisiones que dan lugar a la formación de un esporoblasto multinucleado. Luego por gemación surgen los esporozoitos que llegarán a la madurez sólo después que la larva comienza a alimentarse, formando roptrias y micronemas, que permiten la capacitación para invadir un bovino. Es importante aclarar que sólo en el estado larval de la garrapata puede transmitirse *Babesia bovis*, en estado de ninfa ya pierde esta capacidad, a pesar de mantener la infección. Asimismo la larva pierde la infección después que ha ocurrido la transmisión. De esta forma, la infección en la población de garrapatas esta basada solamente en la infección alimentaria de las hembras de garrapatas durante la alimentación seguido por la transmisión transovárica a sus huevos en menor proporción (Kakoma, I., 1993 y Friedhoff, K. T., 1988).

En el bovino: En el momento que la larva de la garrapata se alimenta de la sangre del bovino, los esporozoitos de *B. bovis* presentes en las glándulas salivales pasan al torrente sanguíneo. Estos buscarán invadir únicamente eritrocitos. La entrada se produce por endocitosis en varias etapas. Primero el parásito se une por su región ecuatorial y luego sufre una reorientación, para acomodar su región apical, adyacente a la membrana del eritrocito. Se libera el contenido de las roptrias y se produce una invaginación de la membrana del eritrocito envolviendo al parásito y formando por último una vacuola parasitófora alrededor del mismo. La capa superficial del parásito se pierde y la vacuola se desintegra, quedando en contacto la membrana de *B. bovis* con el citoplasma del eritrocito como puede observarse en la Figura I. 4. *Babesia* es el único miembro de los Apicomplexa que no posee vacuola parasitófora dentro

del eritrocito. El parásito, entonces, comienza a dividirse por fisión binaria, formando dos células hijas, llamadas trofozoitos. Los trofozoitos maduran, formando nuevamente roptrias y micronemas en su interior, dando lugar a un merozoito. El merozoito haciendo protusión sobre la membrana, lisa el eritrocito y vuelve al torrente sanguíneo para invadir nuevos eritrocitos (Friedhoff, K.T., 1988; Igarashi, I., 1988).

En la Figura I. 3. se esquematiza este ciclo.

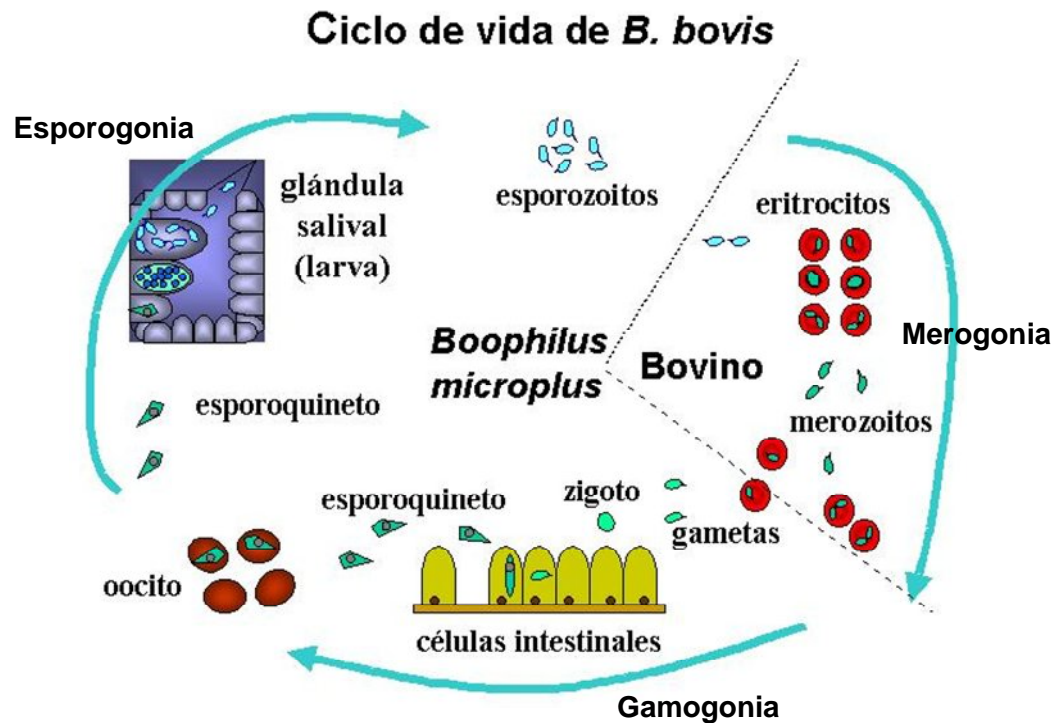


Figura I. 3.: Ciclo de vida de *Babesia bovis*

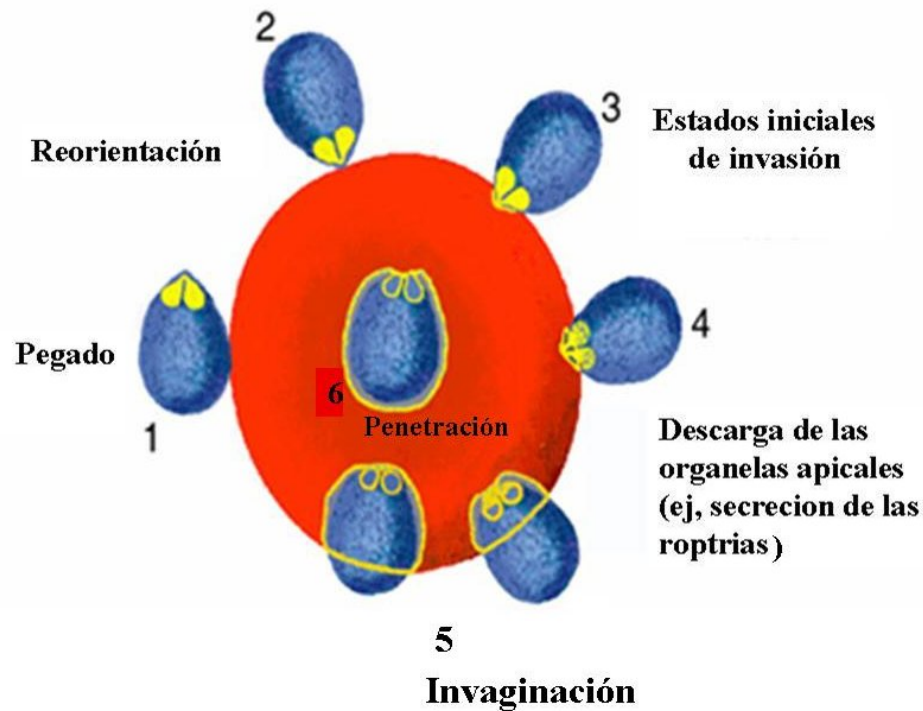


Figura I. 4.: Proceso de invasión de los merozoitos de *B. bovis* al eritrocito. Los pasos principales consisten en: 1) pegado o contacto del merozoito al eritrocito, 2) reorientación del merozoito, 3) fusión de las membranas del merozoito y eritrocito, 4) liberación del contenido de las organelas apicales, 5) invaginación del merozoito, 6) entrada o penetración.

I. 1.4. Invasión de los eritrocitos bovinos por los merozoitos de *B. bovis*.

El proceso de invasión de los eritrocitos por los parásitos de *B. bovis* es considerado muy similar al que ocurre en *Plasmodium*, el cual ha sido bien estudiado (Igarashi, I. *et al.*, 1988; Bannister, I. and Mitchell, G., 2003; Preiser, P. *et al.*, 2000). Durante el ciclo de crecimiento asexual en el hospedador mamífero, los merozoitos extracelulares invaden el eritrocito del hospedador y se multiplican asexualmente en el eritrocito invadido. (Yokoyama, N. *et al.*, 2002, 2003; Kumar, S. *et al.*, 2004). Los apicomplexa utilizan varias moléculas del protozoo (ligandos) en su proceso de invasión (Preiser, P. *et al.*, 2000; Sam-Yellowe, T.Y., 1996). Durante este proceso algunas de las moléculas de superficie ubicadas sobre los merozoitos deben funcionar como factores de reconocimiento del hospedador, mientras que el producto de las roptrias y micronema deben ser secretados desde las organelas de los merozoitos en el punto de invaginación de la membrana de manera de hacer estrechas uniones en el eritrocito del hospedador y luego llevar a cabo su penetración y subsecuente internalización en el eritrocito (Preiser, P. *et al.*, 2000; Sam-Yellowe, T.Y., 1996). En *B.*

bovis, se conoce que los merozoitos poseen al menos cinco glicoproteínas en su superficie: MSA-1, MSA-2a1, MSA-2a2, MSA-2b, MSA-2c, y estas moléculas pertenecen a la familia de antígenos variables de la superficie del merozoito (VMSA) (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002; Hines, S.A. *et al.*, 1989; Cowman, A.F. *et al.*, 1994, Jasmer, D.P. *et al.*, 1992) como se verá con más detalle en la sección I. 4. Con el uso de anticuerpos específicos, se mostró que cada proteína de VMSA se expresaba en la superficie de los merozoitos extracelulares vivos y se confirmó que se coexpresaban sobre un mismo merozoito. Antisueros individuales contra MSA-1, MSA-2a, MSA-2b, y MSA-2c inhibieron significativamente la invasión de los merozoitos a los eritrocitos bovinos. Finalmente se demostró la inhibición estadísticamente significativa del pegado de los esporozoitos a los eritrocitos utilizando antisueros específicos para MSA-1, MSA-2a, MSA-2b y MSA-2c. Estos resultados indican un rol importante de las proteínas de esta familia en el pegado inicial y subsecuente invasión a los eritrocitos del hospedador y avalan la hipótesis de que los esporozoitos y merozoitos utilizan moléculas de superficie y mecanismos comunes en la invasión de los eritrocitos. (Goff, W.L. *et al.*, 1988, Mosqueda, J. *et al.*, 2002 a,b; Palmer, G.H. *et al.*, 1991; Reduker, D.W. *et al.*, 1989, Hines, S.A. *et al.*, 1989, Jasmer *et al.*, 1992; Yokoyama, N. *et al.*, 2006).

Por otra parte se desarrolló un ensayo de pegado a los eritrocitos con un lisado de merozoitos que probó la habilidad de RAP-1 (proteína asociada a las roptrias 1) de pegarse a los eritrocitos bovinos y los anticuerpos específicos anti-RAP-1 previnieron la interacción de los mismos. Mas aún, los anticuerpos inhibieron significativamente la proliferación de *B. bovis* en el cultivo *in vitro* (Yokoyama, N. *et al.*, 2002). Estos hallazgos indican que RAP-1 tiene un rol funcional e imperativo para la invasión de los eritrocitos por los merozoitos y esporozoitos.

Recientemente fueron identificadas por un grupo de investigación de la Universidad de Utrecht (Gaffar, F.R. *et al.*, 2004a,b) otras dos moléculas relacionadas con la invasión de eritrocitos, las cuales son productos de los micronemas de los merozoitos de *B. bovis*. Una es un homólogo del antígeno de la membrana apical 1 (AMA-1) y la otra es un homólogo a la proteína anónima relacionada a la thrombopondin (TRAP), denominadas BbAMA-1 y BbTRAP respectivamente en *B. bovis*. Esencialmente, la preincubación de los merozoitos extracelulares con anticuerpos específicos anti BbAMA-1 y anti-BbTRAP redujeron la invasión de los eritrocitos por *B. bovis* (Gaffar, F.R. *et al.*, 2004a)

Como se mencionó anteriormente, el proceso de invasión de los eritrocitos es complejo y requiere múltiples interacciones ligando-receptor. Gaffar, F.R. *et al.* (2003) investigaron la invasión de los merozoitos de *B. bovis* a los eritrocitos de diferentes especies de manera de

testear la hipótesis de que la estricta especificidad observada *in vivo* para el hospedador bovino se debe a interacciones receptor-ligando entre los merozoitos y eritrocitos específicas del hospedador. Claramente se observó que los merozoitos de *B. bovis* eran capaces de invadir todas las especies testeadas aunque con una eficiencia variable. Sorpresivamente se observó que los eritrocitos humanos fueron invadidos en promedio, mejor que los eritrocitos bovinos. En cambio los eritrocitos caprinos fueron pobremente invadidos mientras que la eficiencia relativa de invasión en eritrocitos equinos, ovinos y porcinos varió entre el 47 y 53%. Se observó también en otras especies excepto en los eritrocitos de cabra el subsecuente desarrollo intracelular y duplicación para formar los piroplasmas característicos con forma de pera como normalmente ocurre en los eritrocitos bovinos. A pesar del desarrollo intracelular aparentemente normal observado en eritrocitos de otras especies, solamente en los eritrocitos bovinos se observó un rápido incremento de la parasitemia en medio libre de suero, con lo cual a pesar de la eficiente invasión de los eritrocitos humanos, otros estadios posteriores podrían estar bloqueados, como por ejemplo, el egreso del merozoito de la célula después de la maduración intracelular. Esto sugiere que la especificidad por el hospedador está determinada por factores que operan tardíamente en los eritrocitos dentro del ciclo de *B. bovis*.

La remoción de los residuos de ácido siálico debido a la incubación enzimática de los eritrocitos con neuroaminidasa previo a la invasión condujo a la reducción en la eficiencia de la invasión de aproximadamente el 80%, que fue observado para varias especies. Por otra parte, la preincubación de los merozoitos con azúcares que contienen residuos de ácido siálico disminuyó la eficiencia de la invasión alrededor del 45%, mientras que la incubación justo antes de la invasión no produjo cambios significativos. Estas observaciones demuestran que la invasión es dependiente de la presencia de ácido siálico contenido en los receptores de membrana sobre los eritrocitos que interactúan con los ligandos en los merozoitos, los cuales probablemente ya están accesibles durante la preincubación previa a la invasión (Gaffar, F.R. *et al.*, 2003).

I. 1.5. Generalidades sobre el vector: la garrapata de los bovinos

Las garrapatas son ácaros cosmopolitas, ectoparásitos temporales obligados. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, el vector de *B. bovis* y *B. bigemina* en Argentina, es originaria de India y fue introducida en América por el ganado traído por los colonos europeos.

R. microplus es garrapata de un solo huésped, el macho puede medir de 3 a 4 mm, mientras que la hembra de 10 a 12 mm. En la figura I. 5. se puede observar la diferencia de tamaño entre un ejemplar adulto hembra y macho.



Figura I. 5: *Rhipicephalus microplus*. A la izquierda puede observarse un ejemplar macho, mientras que a la derecha, de mayor tamaño se encuentra una hembra.

Las larvas pueden sobrevivir hasta 7 meses sin alimentarse y en verano, unos dos meses. El término del desarrollo está dado en unos 45 días. Se localizan en toda la piel del animal, especialmente en las zonas del codo y entrepierna como puede observarse en la figura I. 6.

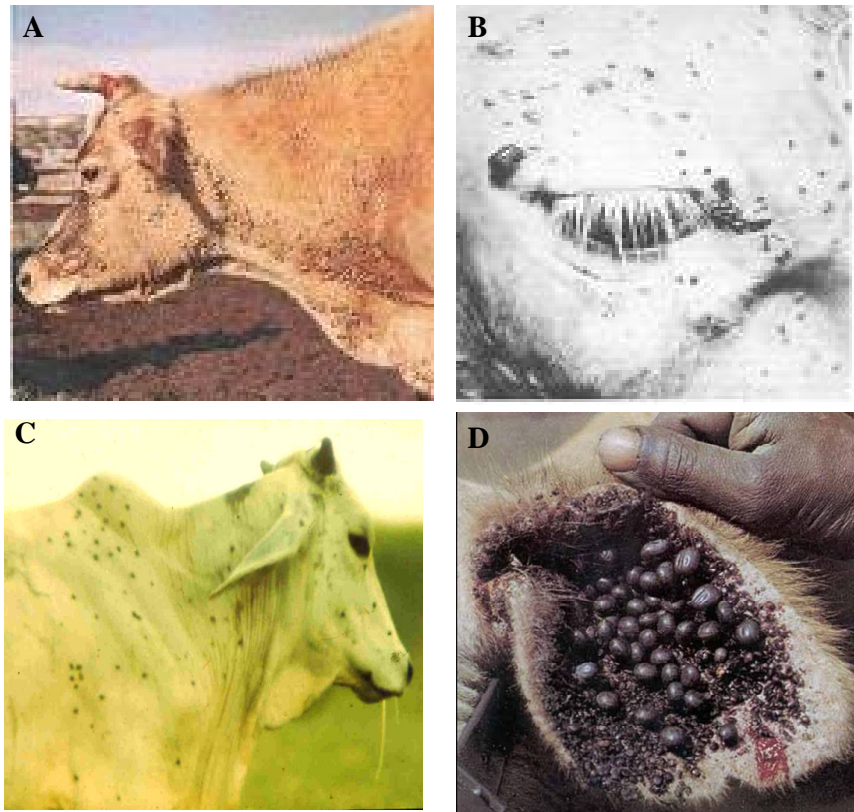


Figura I. 6.: Bovino infectado con la garrapata *R. microplus*, transmisora de la babesiosis bovina: La garrapata se localiza en todo el cuerpo del animal, principalmente en el cuello (A y C), cara (B) y otras zonas como por ejemplo las orejas (D).

La clasificación taxonómica de *R. microplus* es la siguiente: Phylum: Arthropoda; Clase: Arácnida; Orden: Parasitiformes; Suborden: Metastigmata; Familia: Ixodidae; Género y especie: *Rhipicephalus microplus* (antes conocida como *Boophilus microplus*).

En la siguiente figura a modo de ejemplo podemos observar la imagen de una hembra de *R. microplus* alimentándose sobre un bovino, como así también el aspecto de una hembra alimentada cuando se desprende del animal y luego desovando.

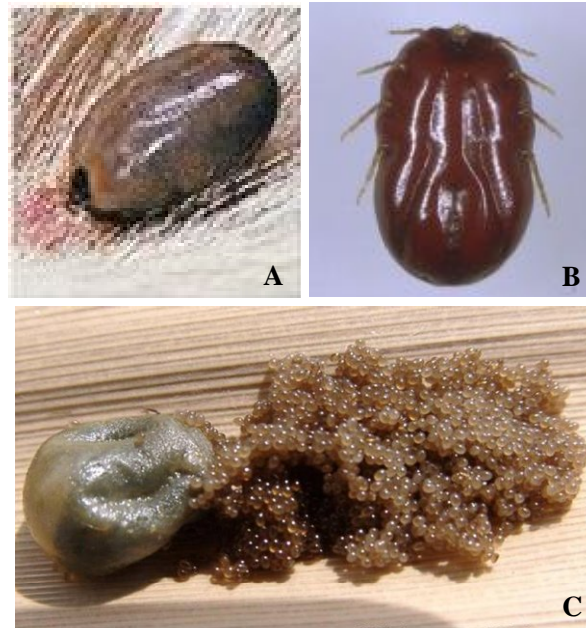


Figura I. 7.: Hembra de *R. microplus*. La fotografía A corresponde a una hembra alimentándose sobre el animal; la B corresponde al aspecto de una hembra alimentada cuando se desprende del bovino y finalmente la C a la hembra de garrapata desovando.

I. 1.5.1. Ciclo de vida del vector.

Una vez que los huevos eclosionan, las larvas permanecen en el pasto hasta que pasa el hospedador, trepan al bovino, y comienzan a alimentarse de su sangre. La larva muda a ninfa, y siguiendo con la alimentación muda a adulto. Los machos (gonandros) y las hembras (partenoginas), se aparean y una vez esto la hembra sigue succionando sangre hasta observarse ingurgitadas, aquí se la denomina teleogina. Las teleoginas se desprenden del hospedador y comienza la puesta de huevos (3.500 a 4.000), a partir de los cuales se originan las neo - larvas. La duración del ciclo oscila entre 20 a 41 días y depende de las condiciones del ambiente, ya que para el desarrollo de éste, se requiere de inviernos benignos, con temperaturas no inferiores a los 14 °C.

Observando este ciclo podemos dividirlo en dos: uno de vida libre (independiente del hospedador) el cual incluye a los estadios de huevo, neo-larva, y teleogina recién desprendida. El otro, parasitario, ligado al bovino, va desde la larva hasta la teleogina.

I. 1.5.2. Distribución en el mundo

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* esta distribuída a nivel mundial entre los paralelos de latitud 32° norte y 30° sur como podemos observar en la Figura I. 8. Esta región brinda el marco climático óptimo para su desarrollo.

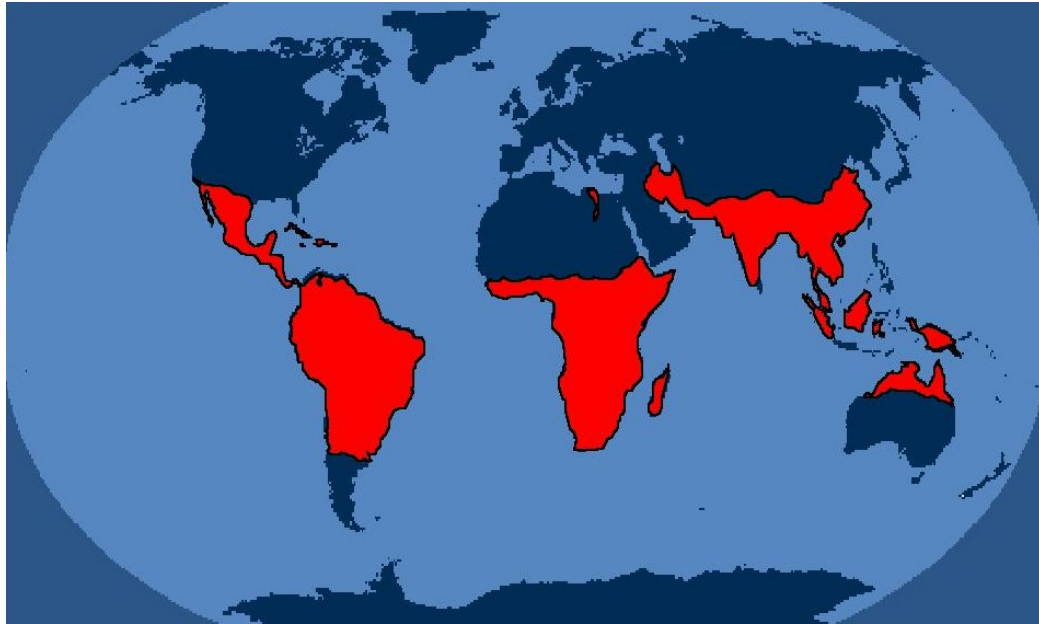


Figura I. 8: Distribución de *R. microplus* a nivel mundial. La ubicación geográfica del vector de *B. bovis*, la garrapata *R. microplus* esta entre las latitudes 32° N y 30° S.

I. 2. Babesiosis bovina

La babesiosis, también llamada babesiasis y piroplasmosis, es una enfermedad capaz de infectar un amplio rango de vertebrados. Es producida por parásitos protozoarios intraeritrocíticos pertenecientes al género *Babesia* sp. Todas las especies de *Babesia* son, generalmente, específicas de un huésped. Se las ha encontrado en bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos y humanos. Se caracteriza por fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria y, en varios casos, muerte. Todas las babesias estudiadas hasta la actualidad son transmitidas por garrapatas de la familia Ixodidae (Kuttler, K. L., 1988).

La babesiosis bovina, también llamada fiebre esplénica, fiebre de la garrapata, agua roja o fiebre de Texas es una de las enfermedades más importantes para la producción ganadera de regiones tropicales y subtropicales del globo. Se estima que hay 1.200 millones de cabezas de ganado distribuídas en todo el mundo de las cuales la mayoría está potencialmente expuesta a *Babesia* spp. Esta enfermedad es provocada por diversos agentes etiológicos tales

como *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. divergens*, *B. jakimovi*, *B. ovata* y *B. occultans*. La principal forma de transmisión es por garrapatas. Por otra parte, la transmisión prenatal o iatrogénica (vacunaciones, descornes u operaciones con material contaminado con sangre de animales enfermos) es epidemiológicamente insignificante (Kuttler, K. L., 1988).

Babesia bovis y *B. bigemina*, junto con *Anaplasma marginale* provocan el complejo patológico conocido popularmente como "síndrome de la Tristeza Bovina" o "Piroplasmosis". La primera denominación es porque la enfermedad se manifiesta en un comienzo con aislamiento del rodeo, inapetencia y malestar. La segunda denominación se debe a la forma de pera del parásito dentro de los glóbulos rojos infectados.

Geográficamente, la distribución de *B. bovis* corresponde a la distribución de su vector, la garrapata de los bovinos, *R. microplus*. En Argentina, la babesiosis es una enfermedad endémica en las provincias del norte, principalmente las provincias de Chaco, Formosa, Salta, San Juan, Santiago del Estero, Jujuy, La Rioja, Catamarca y Norte de Santa Fe y Córdoba junto con la región Mesopotámica, ya que observaciones recientes han mostrado que la distribución de *R. microplus* se ha extendido al norte de la provincia de Entre Ríos.



Figura I. 9.: Zona endémica para la babesiosis en Argentina y países limítrofes. Por encima del paralelo 30° Sur se encuentran las condiciones óptimas para el desarrollo de la garrapata y la transmisión de la enfermedad.

Esta región incluye una población estimada de 22 millones de bovinos. Las pérdidas económicas directas en la producción pecuaria (por pérdida de peso o mortalidad) y láctea, y los costos de tratamiento y prevención mediante vacunas vivas en el país, se han estimado en 38,9 millones de dólares al año (Draghi, M.G. *et al.*, 1997). La provincia de Corrientes es una de las regiones de Argentina más afectadas por esta enfermedad, debido a que presenta las condiciones óptimas para el desarrollo del vector.

Por otra parte, esta provincia se caracteriza por la producción creciente de un tipo de ganado alternativo: el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) o ganado bubalino. Este tipo de ganado empezó a explotarse en el país a principio del siglo XX y hoy día se cuenta con escasos datos sobre el estado sanitario de los mismos, aunque observaciones recientes han mostrado que pueden ser parasitados por *R. microplus* (Benitez, D. *et al.*, 2007).

I. 2.1. Respuesta inmune

Diferentes mecanismos de la respuesta inmune contribuyen a la defensa del bovino contra la infección por *Babesia*. En los primeros momentos de la infección y cuando los merozoitos se encuentran libres en el torrente sanguíneo, juegan un rol importante las inmunoglobulinas de tipo G (IgG), evitando la unión del parásito al eritrocito.

Una vez dentro del glóbulo rojo, las células pertenecientes al sistema inmune innato controlan los niveles de parasitemia dentro del organismo infectado, confiriéndole resistencia contra la babesiosis, específicamente, las células NK (natural killer) y los macrófagos (además de los productos solubles producidos por estos últimos). Esta inhibición parece estar controlada por la producción de factores solubles, como IFN- γ de las células NK y Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), óxido nítrico (NO), y ROSs (especies reactivas del oxígeno) de los macrófagos. Los linfocitos T también parecen ser responsables de la disminución de la parasitemia, más específicamente los linfocitos T CD4⁺ que producen IFN- γ . Se ha observado que la transferencia de linfocitos T obtenidos de animales inmunes es suficiente para conferir inmunidad a *B. microti* en ratones naive. Ha sido propuesto que el IFN- γ está directamente involucrado en la degradación intraeritrocítica del parásito, pero esto no ha sido comprobado (James, M. A. *et al.*, 1988 y Homer, M. J. *et al.*, 2000).

En el caso de *B. bovis* Brown, W.C. *et al.* (2006a) postularon que los mecanismos de inmunidad requieren tanto de la inmunidad innata como adaptativa que incluye tanto células T helper del tipo CD4⁺ (T CD4⁺) y anticuerpos neutralizantes. Varios trabajos han descrito este modelo de mecanismos inmunes protectivos para *B. bovis* (Goff, W.L. *et al.*, 1998;

Brown, W.C. and Palmer, G.H.,1999; Brown, W.C., 2001) en el cual la resolución de la infección aguda en animales *naive* con parásitos virulentos de *B. bovis* depende de una respuesta inmune innata lo suficientemente fuerte para conducir a la activación de los macrófagos vía IFN- γ y los productos derivados de los parásitos, resultando en la eliminación de los organismos por fagocitosis y producción de metabolitos tóxicos por parte de los macrófagos, incluyendo el óxido nítrico (NO). En los animales persistentemente infectados que han controlado la parasitemia, o en animales inmunizados satisfactoriamente, las células T CD4+ antígeno específicas son centrales para la respuesta adaptativa a través de la producción de IFN- γ . Además de la activación de los macrófagos para un *clearance* eficiente del organismo, el IFN- γ potencia la producción de anticuerpos IgG2 con una fuerte actividad opsonizante y capacidad neutralizante (Estes, D.M. and Brown, W.C., 2002; Homer M. J. *et al.*, 2000), los cuales junto con las IgG1, se vió que protegen pasivamente al ganado contra el desafío con cepas homólogas (Mahoney, D.F., 1986). De esta forma, la infección aguda con *B. bovis* en animales *naive* esta mayoritariamente lograda por la activación de la respuesta inmune innata en el bazo, mientras que la protección contra la enfermedad clínica en animales persistentemente infectados o vacunados depende de la rápida activación de la memoria y las células T CD4+ efectoras que secretan IFN- γ y proveen colaboración para la producción de anticuerpos protectivos.

La mayoría de las especies de *Babesia* son altamente hospedador específicas y a menudo la esplenectomía es necesaria para establecer la infección en un hospedador natural (Mahoney, D.F., 1972). Se observó que los bovinos con infecciones de larga data podían reactivar la infección si eran esplenectomizados (Callow, L.L., 1977). Por otra parte los animales susceptibles que habían sido esplenectomizados desarrollaban parasitemias mucho más altas a la infección primaria con *Babesia* que los animales intactos. Estas observaciones implican que el bazo juega un rol importante en la respuesta inmune hacia *Babesia spp.*, al eliminar los eritrocitos infectados (Bock, R. *et al.*, 2004).

En adición al NO, otros productos secretados por los macrófagos activados son importantes para la activación de las respuestas inmune innata y adaptativa. Estos incluyen IL-12, TNF- α e IL-18. La IL-12 activa a las células natural killer (NK) a producir niveles aumentados de IFN- γ , prima las células Th1 que producen IFN- γ bajo la estimulación antigénica y estimula la producción de IFN- γ por las células Th1 y T $\gamma\delta$ (Brown, W.C. *et al.*, 1996). El TNF- α , en conjunto con IFN- γ , activan la producción de NO por los macrófagos (Adler, A. *et al.*, 1994; Goff, W.L. *et al.*, 1998). La IL-18 también actúa en forma sinérgica con la IL-12 promoviendo la producción de IFN- γ (Shoda, L.K.M. *et al.*, 1999).

I. 2.2. Signos clínicos

La babesiosis está principalmente relacionada con una anemia aguda. Se observan cuadros febriles coincidentes con niveles detectables de parásitos en sangre, producto de una lisis eritrocítica extensiva que lleva a la anemia, ictericia, hemoglobinuria, hipoxia y en algunos casos hasta la anoxia. La fiebre usualmente persiste mientras la parasitemia aumenta y los bovinos pueden llegar a presentar temperaturas corporales de 41°C. La anemia aguda empalidece las mucosas, debilita los músculos, favorece la depresión, deshidratación, anorexia, aumento de la frecuencia cardíaca y el distress respiratorio. Este conjunto de signos clínicos es conocido (junto con el cuadro causado por *B. bigémina* y *Anaplasma marginale*) como “tristeza bovina”, dado el decaimiento general de los animales infectados, y su apartamiento del rodeo, como se mencionó anteriormente. En el caso de las infecciones por *B. bovis*, en particular, frecuentemente está afectado el SNC (Sistema Nervioso Central): ya que muchos de los eritrocitos infectados quedan adheridos a los capilares del cerebro, provocando infarto cerebral (Uilenberg, G. *et al.*, 1995). También ocurren con frecuencia casos agudos con rápida muerte de los animales infectados.

I. 3. Medidas de control

I. 3.1. Acaricidas

Una forma indirecta de combatir la babesiosis se basa en el control del vector mediante el uso de acaricidas, pero hay grandes problemas con el uso de estos compuestos ya que han quedado seleccionadas las garrapatas que han desarrollado resistencia a la mayoría de los productos químicos que se comercializan.

I. 3.2. Campaña de erradicación en U.S.A.

Es interesante señalar que la mayoría de los llamados “países en desarrollo” o “países subdesarrollados” son áreas endémicas de babesiosis, anaplasmosis e infestación de la garrapata *R. microplus*. Los esfuerzos de estos países para importar ganado con gran potencial de producción desde Europa del este y América del Norte son casi siempre complicados por la presencia de babesiosis endémica la cual, cuando se transmite al ganado susceptible, invariablemente crea problemas en la salud animal. Las pérdidas por muerte en animales adultos pueden ser grandes si estas infecciones no se controlan por quimioterapia, vacunación o manejo del vector. La prevalencia de garrapatas del ganado, babesiosis y

anaplasmosis está entre los factores más importantes que dificultan la introducción de ganado más productivo y el mejoramiento del ganado existente en los países en desarrollo.

Probablemente el programa individual más exitoso para el control de la babesiosis fue llevado a cabo en Estados Unidos desde 1907 a 1940 donde la garrapata de los bovinos fue esencialmente erradicada. Con la excepción de algunas áreas en Florida, la erradicación de la garrapata fue completada en 1940 y abarcó un área de 1.813.000 km², que se extendían desde al costa del Atlántico a Texas y norte de Oklahoma, Arkansas, Tennessee y Virginia, más un área extensa en el sur de California. La erradicación fue consumada por baños sumergiendo todo el ganado bovino y otros tipos de ganado infectado por garrapatas en una solución de arsénico cada dos semanas. En general, las líneas de cuarentena estrictamente impuestas progresaron de oeste a este y de norte a sur. Debe señalarse que *Boophilus annulatus* era la única garrapata presente en Estados Unidos, con la excepción de unas pocas ciudades en Florida y sur de Texas donde se encontraba *Rhipicephalus microplus*.

La erradicación en estas áreas de Texas y Florida fue la más dificultosa. Otro factor que contribuyó al éxito de este programa fue que las grandes áreas con un medio ambiente ligeramente adecuado para el desarrollo de estas garrapatas, también poseían inviernos anuales sustanciales en que la garrapata muere. Además, había un número muy bajo de rumiantes salvajes (ciervos) en estas áreas, lo cual permitió que la erradicación ocurriera por remoción de todo el ganado de estas pasturas por períodos extensos, durante los cuales las garrapatas morían. El descanso de las pasturas no podía ser un método viable por mucho tiempo porque en muchas áreas, las poblaciones de zorros presentes eran tan grandes que las garrapatas podían mantenerse indefinidamente en ausencia de ganado bovino. Otro factor significativo para el éxito en el programa de erradicación de la garrapata fue su popular apoyo por parte de los productores ganaderos, ya que los esfuerzos por mejorar el ganado existente en el sur importando ganado de cría superior desde Europa o desde los estados del norte a menudo se frustraron por la alta mortalidad y pérdidas en la producción de ese ganado cuando se los movilizaba a las zonas con garrapatas. No fue hasta que las garrapatas fueron erradicadas que la industria del ganado se desarrolló hasta el nivel alcanzado en el presente en el sur de los Estados Unidos (Kuttler, K. L. *et al* 1988).

En 1906 fue estimado que las pérdidas anuales asociadas con garrapatas y babesiosis era de US\$ 130 millones (US\$ 1.000 millones con el dólar actual); el costo de erradicación de la garrapata fue muy modesto en comparación. Desde 1907 hasta 1938 se estimó que las apropiaciones federales para el programa de la garrapata fueron aproximadamente de US\$ 46 millones.

El resultado final de este programa fue la eliminación de la babesiosis de Estados Unidos. Desde la erradicación de la garrapata, una línea de cuarentena permanente creando una zona *buffer* fue establecida a lo largo de la frontera con México, al sur de la cual hay babesiosis y garrapatas. Por lo tanto, se requiere de una vigilancia epidemiológica constante con un programa de baños cuando es necesario. En consecuencia, ha habido muy pocos reportes de brotes significativos de babesiosis en Estados Unidos desde esta campaña de erradicación (Kuttler, K. L. *et al* 1988).

I. 3.3. La provincia de Corrientes y su plan de erradicación de la garrapata

El 18 de Marzo de 2004 se aprobó el “Plan de Control y Erradicación de la Garrapata común del Ganado Bovino en la provincia de Corrientes”. En esta provincia, la garrapata ocasiona altas pérdidas económicas directas a los productores agropecuarios, incidiendo directamente en la economía pecuaria de la región y de la nación.

En este plan se delimitaron tres Zonas: de Erradicación, Indemne e Infectada de acuerdo a la situación epidemiológica como podemos observar en la Figura I. 10.



Figura I. 10.: Divisiones de la provincia de Corrientes respecto de la prevalencia de *R. microplus*. donde se ubican: la Zona Indemne; Zona de Erradicación; Zona Infectada.

Se considera Zona Indemne al territorio de la provincia libre de la presencia de garrapatas *R. microplus* donde se haya comprobado su erradicación en todos los

establecimientos o exista un porcentaje menor al uno por ciento (1%) de establecimientos infectados. La Zona de Erradicación es el territorio de la provincia apto para el desarrollo del parásito, donde los establecimientos se encuentran bajo proceso de eliminación de la garrapata. Finalmente, la Zona Infectada es un territorio también apto para la evolución del parásito pero donde las actividades de control serán voluntarias sin existir la obligatoriedad de la erradicación.

Los objetivos del plan son, por un lado, la reducción de las pérdidas económicas producidas por la garrapata erradicando esta parasitosis y por otro lado, el plan se propuso alcanzar en tres años la categoría de “limpios” (es decir, sin garrapatas) para el ochenta y cinco por ciento de los establecimientos de la Zona de Erradicación, y en cinco años en condiciones epidemiológicas como para incorporarla a la Zona Indemne. Por último, el plan se propone lograr la inexistencia de focos de garrapatas y enfermedades conexas.

I. 3.4. Diagnóstico

No hay ningún síntoma clínico específico de la Babesiosis y de la Anaplasmosis. Por lo tanto, es frecuente que se confundan con otras enfermedades como Hemoglobinuria bacilar, Leptospirosis, Botulismo, Rabia pasesiante, Carbuncho, Leucosis, intoxicaciones, fasciolosis, etc. (Grupo de Parasitología de la EEA INTA Rafaela, 2003).

Para la identificación de los bovinos infectados puede utilizarse la observación microscópica del parásito en frotis de sangre teñidos. Este método es bastante sensible, económico y relativamente fácil de implementar en un laboratorio medianamente equipado. Sin embargo, es considerado por algunos autores como tardío, extenuante y dependiente de considerable experiencia por parte del técnico microscopista. Independientemente de las citadas desventajas, el método ha sido y continúa siendo utilizado como la primera herramienta de trabajo para la identificación y confirmación de los organismos protozoarios, especialmente en los casos de la babesiosis bovina con presentación en forma aguda.

En la etapa crónica, las parasitemias decrecen y los parásitos son detectables sólo a través de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Estas técnicas son útiles para los estudios de la biología del parásito e inmunología, pero los problemas asociados a la contaminación de amplicones (productos ADN de previas amplificaciones), el elevado costo de los materiales y reactivos necesarios y de menor utilidad para los estudios epizootiológicos poblacionales, son algunas de las condiciones que limitan el amplio uso de esta técnica.

La determinación del *status* inmunológico de los bovinos se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos circulantes producidos por el hospedero hacia los antígenos babesiales y algunos basados en la identificación misma de los antígenos parasitarios. La persistencia de anticuerpos pudiera ser un problema en términos epidemiológicos. Por ejemplo, ciertos animales en áreas endémicas pueden tener un elevado nivel de anticuerpos reactivos en la ausencia del parásito. En los países donde se producen y comercializan vacunas anti-Babesia, los animales inmunizados pueden tener anticuerpos que confundirían el diagnóstico. Idealmente, los anticuerpos anti-Babesia debieran ser detectados con antígenos purificados bien definidos. Sin embargo, tales antígenos son difíciles de obtener y el uso de antígenos crudos puede disminuir la especificidad de una prueba diagnóstica dada la similitud de epítopes presentes en diferentes especies de *Babesia*. Además, en la detección de antígenos babesiales con anticuerpos policlonales se presenta el problema de reacción cruzada con otras especies. Es de esperarse que el clonado de genes que codifican por péptidos inmunodominantes y específicos de especie, así como el uso de anticuerpos monoclonales incrementaría la especificidad de este tipo de pruebas. La técnica más usada actualmente, la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), es engorrosa para implementar, permite procesar sólo de 100 a 150 muestras por operador por día y carece de objetividad, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Se han desarrollado distintas pruebas inmunoenzimáticas (ELISAs) basadas en antígenos crudos con especificidad variable. La utilización de proteínas recombinantes permitiría no sólo mejorar cualitativamente los ELISAs, sino que facilitaría su producción y estandarización (Echaide, I. *et al.*, 2002).

I. 3.5. Tratamiento o Quimioprofilaxis

El tratamiento de la babesiosis es distinto al de la Anaplasmosis. Por lo tanto es muy importante confirmar mediante la remisión de muestras a un laboratorio cuál es la enfermedad que está afectando a los bovinos. La quimioterapia se utiliza sobre animales enfermos cuando surgen brotes de la enfermedad. En el mercado sólo se encuentran dos drogas: a) Diminazene (comercialmente Ganaseg, Atrisan y Beronal), que actúa sobre *B. bovis* y *B. bigemina* y tiene un amplio margen terapéutico, el cual se aplica a razón de 3,5 a 5 mg/kg de peso durante 1 a 3 días, según la evolución del animal, y b) Imidocarb (comercialmente Imizol), cuya dosis es de 1,2 mg/kg de peso en una sola dosis y ha demostrado ser muy efectivo como agente terapéutico y también se lo ha utilizado como

profiláctico, ya que se va eliminando y metabolizando lentamente, previniendo durante 60 días la infección (Alcaraz, E. *et al.*, 2002).

Estas sustancias eliminan completamente al parásito. Si durante ese período el animal es infectado, ocurre una infección subclínica con una consecuente inmunidad protectora; si por el contrario no ocurre una infección, esto lleva con el tiempo a una disminución de la respuesta inmune. En caso de que el animal sea infectado en este momento, el grado de la enfermedad será más grave, llevando posiblemente a la muerte del animal (Kuttler, K. L. *et al* 1988).

I. 3.6. Vacunación

La mayoría de los bovinos son resistentes a la exposición a esta enfermedad cuando la infección primaria se produce durante los primeros siete meses de edad (Trueman, K.F. and Blight, G.W., 1978; Levy, M.G. *et al.*, 1982). Se ha especulado que esto ocurre gracias a una transferencia de inmunidad pasiva a través del pasaje de IgG en el calostro de la vaca al ternero en etapas tempranas (Goddeeris, B., 1998), en las características bioquímicas de los eritrocitos de los bovinos jóvenes, que puede ser desfavorable para el desarrollo del parásito y en el rol del bazo de los animales jóvenes en controlar mejor la infección a través de la eritrofagocitosis (Riek, R. F., 1963). Por otra parte otras posibles explicaciones que hipotetizaron otros autores se basan en la abundancia de células T $\gamma\delta$ en los animales jóvenes, que en rumiantes puede comprender más del 70% de los linfocitos T circulantes (Hein, W.R. and Mackay, C.R., 1991), o bien en el decremento de la respuesta inflamatoria, que en la infección de otros hemoparásitos tales como la malaria, se vio contribuye a la patogénesis de la enfermedad (Clark, I.A. and Jacobsen, L.S., 1998).

Tanto los animales jóvenes como los adultos responden a la infección primaria con una respuesta inmune de tipo Th I (Goff, W.L. *et al.*, 2003a, 2002a y 2002b; Shoda, L.K.M. *et al.*, 2002; Stich, R.W. *et al.*, 1998;). Zintl, A *et al.* (2005) en su trabajo postularon que la diferencia en el resultado de la infección podía al menos ser parcialmente explicada por la localización y momento en que ocurre la respuesta inflamatoria: en los animales jóvenes la producción de óxido nítrico ocurre en forma temprana y parece estar concentrada en el bazo (Court, R.A. *et al.*, 2001; Goff, W.L. *et al.*, 2001). Por otra parte existe evidencia de que en los animales adultos ocurre una respuesta inflamatoria tardía y sistémica que es ineficiente y probablemente contribuye a la patogénesis. De esta forma, la resistencia innata en los bovinos jóvenes a *B. bovis* parece depender de una respuesta temprana Tipo I que está mayormente confinada en los órganos linfoides, principalmente en el bazo y por lo tanto en estos animales,

la actividad oxidativa en la circulación periférica tiende a permanecer baja (Hüsler, B.R. and Blum, J.W., 2001).

Pasado ese período la resistencia natural decrece. Para mantener esta inmunidad natural en un rodeo debe existir una elevada tasa de transmisión (tasa de inoculación) del parásito entre el vector y el hospedador. Esto se ve reflejado en los estudios epidemiológicos donde se observan las denominadas áreas endémicas o enzoóticas. Estas regiones poseen todos los elementos necesarios para mantener la enfermedad: el agente, el vector, el animal susceptible y el mecanismo adecuado de transmisión. De esta forma, la babesiosis se mantiene en forma subclínica. Sin embargo, cuando la tasa de inoculación no es lo suficientemente elevada para asegurar una transmisión continua del parásito entre el vector y la población animal, entonces pueden resultar brotes de babesiosis (Young, A. S. *et al.*, 1988).

Como se mencionó anteriormente, la babesiosis bovina se caracteriza por afectar a los bovinos adultos que no se inmunizaron naturalmente. Por lo tanto, en aquellos establecimientos en que la tasa de inoculación es baja, es necesario recurrir a la inmunización artificial de los terneros para prevenir la ocurrencia de casos clínicos. Para la prevención de la babesiosis y de la anaplasmosis se utilizan en muchos países del mundo vacunas vivas. En nuestro país, la vacuna más utilizada contiene eritrocitos parasitados con cepas de *B. bovis* y de *B. bigemina* atenuadas en su patogenicidad por pasajes seriados de terneros esplenectomizados con sangre infectada (Callow, L.L. *et al.*, 1979) y con *Anaplasma centrale*, especie naturalmente menos patógena para los bovinos y que brinda inmunidad cruzada parcial contra *Anaplasma marginale*.

En la Argentina también se producen vacunas vivas atenuadas a partir de cultivos *in vitro* de la cepa vacunal de *B. bovis* R1A. En las Estaciones Experimentales Agropecuarias del INTA de Mercedes (Corrientes) y de Rafaela (Santa Fe) se producen vacunas que están aprobadas por el SENASA (CERTIFICADO N° 98153 y ESTABLECIMIENTO ELABORADOR N° 8259) y cuya composición es de 10^7 eritrocitos infectados con *Babesia bovis* atenuada, 10^7 eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* atenuada, 10^7 eritrocitos infectados con *Anaplasma centrale* y solución salina balanceada en cantidad suficiente para 3 ml, administrándose 3 ml/animal en forma subcutánea o intramuscular (Grupo de Parasitología de la EEA INTA Rafaela, 2003).

La multiplicación de los microorganismos produce una reacción postvacunal leve que generalmente cursa sin manifestaciones clínicas, aunque por razones de seguridad es conveniente mantener a los animales inoculados en observación. La reacción por *B. bovis* y *B.*

bigemina ocurre entre los días 7 al 20 post-inoculación (d.p.i.) y la de *A. centrale* entre los días 40 y 60 post-inoculación.

La vacuna viva está indicada para uso exclusivo en bovinos de 4 a 10 meses de edad clínicamente sanos y en buen estado nutricional, ya que en animales adultos pueden llegar a producirse reacciones post-vacunación graves e incluso la muerte si no se controlan adecuadamente. Se sugiere la vacunación de los animales en las siguientes situaciones:

a) En las terneras de reposición del área enzoótica, donde la tasa de inoculación es insuficiente para que los animales se infecten durante los primeros meses de vida.

b) En los bovinos originarios de las zonas libres de babesiosis y anaplasmosis que van a ser trasladados a las zonas enzoóticas.

c) Para prevenir muertes durante la reinfestación de zonas donde la garrapata ha desaparecido.

d) Protección de animales en áreas enzoóticas, donde la población de garrapatas no es suficiente como para que se infecten durante los primeros meses de vida, cuando todavía son relativamente resistente. (Vanzini, V. *et al.*, 1994).

e) En los establecimientos ganaderos donde habitual o esporádicamente se presenten casos clínicos de "tristeza" o bien cuando el análisis de anticuerpos indica riesgos de ocurrencia de brotes.

Para determinar cuándo la tasa de inoculación es baja, y por lo tanto es necesario utilizar la vacuna, se debe realizar un análisis para detectar los anticuerpos contra los tres parásitos en la sangre de una proporción (10%) de las terneras de 7 a 9 meses de edad. Si menos del 80 % de las terneras tiene anticuerpos es conveniente aplicar la vacuna, porque el riesgo de ocurrencia de brotes de "tristeza" cuando sean adultos es muy alto. Por el contrario, si más del 80 % de las terneras tiene anticuerpos, no se justifica económicamente aplicar la vacuna.

La vacuna viva para prevenir la babesiosis y la anaplasmosis bovinas es efectiva para inducir una sólida respuesta inmunitaria en más del 90% de los bovinos vacunados, aplicada en animales jóvenes de 10 a 12 meses de edad. La máxima expresión y mantenimiento de su potencialidad inmunológica se logra en vacunos sanos, mantenidos en condiciones favorables de alimentación y ambientales.

Para el caso de *B. bovis* y *B. bigemina* no existen evidencias en la Argentina de rupturas de inmunidad o enfermedad en animales vacunados por acción de cepas antigénicamente diferentes (Echaide, I., comunicación personal).

Ahora bien, en situaciones especiales (bovinos inmunodeprimidos o estresados) se han observado algunos casos de ruptura de inmunidad en los animales vacunados. Los casos

comprobados de ruptura de inmunidad ocurrieron siempre en bovinos adultos (toros y hembras preñadas) que habían nacido en la zona libre de *R. microplus* y fueron trasladados a la zona infestada por garrapatas. No existen evidencias de ruptura de inmunidad en los bovinos vacunados nacidos en la zona de garrapatas (Grupo de Parasitología de la EEA INTA Rafaela, 2003).

Entre las posibles causas que producen una caída en las defensas y que contribuyen a la ruptura de la inmunidad en los bovinos provenientes de la zona libre de garrapatas se pueden mencionar: i) Inmunosupresión producida por la picadura de la garrapata *R. microplus*.; ii) inmunosupresión fisiológica por acción de las hormonas en las hembras gestantes; iii) la actividad reproductiva o productiva, el servicio en los toros, la lactancia en las hembras; iv) las temperaturas elevadas y la falta de sombra; v) el cambio de alimentación y en la calidad del agua de bebida.

Por otra parte, en Australia, donde también se aplican vacunas vivas atenuadas, se han reportado varios casos de fallas vacunales. Especialmente durante el período 1988-1992 un incremento anormal de fallas asociadas a la vacuna contra *B. bovis* fue reportado. A pesar de que no pudo ser encontrada una única causa para la carencia de protección se consideraron varios factores posibles: **i)** records de vacunación inapropiada (ganado no vacunado), **ii)** abuso de la vacuna resultando en la reducción de la potencia, **iii)** uso de la vacuna inapropiada (por ej. Vacunación con *B. bovis* y desafío con *B. bigemina*), **iv)** calidad y consistencia de la vacuna, **v)** reversión a la virulencia de los parásitos vacunales, **vi)** desarrollo de aislamientos de campo contra los cuales la cepa vacunal no es adecuadamente protectora, **vii)** falla del sistema inmune de los animales para responder a la cepa vacunal y **viii)** inadecuada inmunogenicidad de la cepa vacunal (Bock, R.E. *et al.*, 1992, 1995; Lew, A.E. *et al.*, 1997).

Si bien estas vacunas son eficientes para conferir protección, siendo que la inmunidad contra babesiosis perdura como mínimo 4 años (máximo período evaluado) y contra la anaplasmosis es para toda la vida, en ausencia de reinfecciones, conllevan algunas desventajas o inconvenientes, entre ellos: (i) tienen a veces reacciones post-vacunales, que en ocasiones pueden desembocar en la enfermedad, especialmente en el caso de animales mayores al año; (ii) tienen corta vida media y deben transportarse siguiendo una estricta cadena de frío; (iii) se corre el riesgo de transmisión conjunta de otros microorganismos patógenos y (iv) de reversión de las cepas atenuadas a virulentas (Jenkins, M.C., 2001).

Existe por tanto la necesidad de producir una vacuna que confiera protección como las vacunas atenuadas pero sin las desventajas de éstas. Una solución podría ser la formulación de una vacuna a subunidades para esto es importante identificar antígenos superficiales,

inmunodominantes y que tengan epitopes B y T conservados entre distintas cepas. Deben a su vez provocar altos títulos de IgG2, dado que se considera que es el isotipo de inmunoglobulina involucrado en la protección contra la infección con *Babesia*. Así, el modelo aceptado actualmente de inmunidad adquirida contra estos parásitos se basa en la producción de IFN- γ por linfocitos T helper del tipo CD4+, estimulando por un lado la producción de IgG2 que tienen fuerte actividad opsonizante, y por otro, la activación de macrófagos que fagociten a los parásitos (Homer M. J., *et al.*, 2000)

I. 4. Búsqueda de candidatos vacunales

La inmunidad asociada a la aplicación de vacunas vivas atenuadas puede contribuir a una respuesta inmune protectora por proveer una continua fuente de estimulación antigénica y que es requerida para el mantenimiento de la respuesta efectora de las células T de memoria (Belkaid J. *et al.*, 2002). Este tipo de inmunidad conferida por dichas vacunas es por lo tanto la base para el uso de vacunas vivas de *Babesia* atenuadas por pasaje a través de bovinos esplenectomizados (De Vos, A. and Bock, R.E., 2000).

La inmunidad seguida a la inmunización con vacunas vivas atenuadas de *B. bovis* se sabe perdura después que los parásitos han sido eliminados por el tratamiento con drogas (Dagliesh, R.J. *et al.*, 1993). La capacidad de conferir algún nivel de inmunidad protectora seguida a la inmunización con parásitos muertos o extractos de parásitos después del desafío con cepas homólogas o heterólogas, ha provisto la razón para el desarrollo de vacunas a subunidades (Wright, I.G. *et al.*, 1992; Edelhofer, R. *et al.*, 1998).

Los antígenos parasitarios que se han investigado, son aquellos señalados como blanco del sistema inmune y/o aquellos implicados en funciones esenciales para la supervivencia del parásito, tales como la invasión al eritrocito o la variación antigénica, la cual es un factor esencial notable del parásito para escapar del sistema inmune del hospedero bovino (Allred, D.R. *et al.*, 1993). El cultivo *in vitro* de *Babesia* y las herramientas de ingeniería genética, han facilitado considerablemente el estudio de las interacciones hospedero-parásito y permitido la caracterización de tales antígenos. Cuatro grupos de antígenos han sido particularmente estudiados con el fin de probar su potencial inmunoprotector mediante la inoculación de proteínas recombinantes: **1)** los presentes en la superficie de eritrocitos infectados; **2)** los presentes en la superficie de los merozoitos; **3)** los presentes en las organelas del complejo apical; y **4)** los excretados-secretados en el sobrenadante de cultivo *in vitro*.

Con respecto al primer grupo de antígenos, los estudios de inmunofluorescencia realizados con sueros de animales inmunes sobre eritrocitos infectados con *B. bovis* o *B. bigemina*, han demostrado que la superficie de los eritrocitos parasitados era antigénicamente diferente de aquella de los eritrocitos sanos (Curnow, J.A., 1968; Curnow, J.A. *et al.*, 1973a; 1973b, Ahrens, K.P. *et al.*, 1992; Allred, D.R. *et al.*, 1993; Ross, J.P. and Lohr, K.F., 1968). Entre los antígenos descritos en la superficie de los eritrocitos parasitados con los mencionados parásitos, se encuentran aquellos que son polimórficos entre distintos aislamientos y los cuales estarían involucrados en el fenómeno de variación antigénica y señalados como implicados en un mecanismo de escape inmune. Se trata de dos proteínas designadas como VESA 1 el cual está compuesto por una proteína de 128 kDa (VESA-1a) y de una proteína de 113 kDa (VESA-1b). VESA-1a se localiza sobre la fase extracelular de la membrana plasmática del eritrocito parasitado, a nivel de las protuberancias denominadas "knobs" y existe una hipótesis que afirma que VESA-1a permitiría a *B. bovis* escapar al sistema inmune del hospedero según un proceso hasta ahora desconocido, en el que intervendría sobre el DNA del parásito, permitiendo una variación antigénica rápida de la proteína dentro de las poblaciones clonales (O'Connor, R.M. *et al.*, 1997). No obstante su localización, la cual la hace un blanco de elección, VESA-1a no ha sido estudiada en ensayos de vacunación. Pero debido a su variación extrema, se trata de un blanco de elección igualmente importante para comprender los mecanismos de escape inmune.

El segundo grupo de antígenos son los ubicados en la superficie del merozoito y que están expuestos al sistema inmune del hospedero durante el breve período extracelular precedente a la invasión del eritrocito por el merozoito. Sin embargo, esta fase donde el merozoito es libre, es suficiente para inducir una respuesta inmune ya que los sueros inmunes de bovinos infectados por *B. bovis*, reconocen los antígenos de superficie de 42 kDa (MSA-1, Merozoite Surface Antigen-1) y de 44 kDa (MSA-2, Merozoite Surface Antigen-2) (Goff, W.L. *et al.*, 1988; Hines, S.A. *et al.*, 1989; Hines, S.A. *et al.*, 1992). Estas dos moléculas, que presentan un cierto grado de polimorfismo antigénico entre los distintos aislados geográficos (Palmer, G.H. *et al.*, 1991) han sido reagrupadas dentro de una familia de antígenos variables de superficie del merozoito designada VMSA. La capacidad del suero de bovino inmune para proteger contra una infección por *B. bovis*, así como la capacidad de anticuerpos provenientes de animales vacunados y dirigidos contra la proteína recombinante rMSA-1 para neutralizar la infectividad de los merozoitos *in vitro*, sugieren un importante papel de la proteína MSA1 en la protección inmune contra *B. bovis* (Hines, S.A. *et al.*, 1989; Hines, S.A. *et al.*, 1992). MSA-1 es altamente inmunodominante y reconocida como una banda proteica mayor en

Western blots por suero de bovinos que se recuperaron de la infección (Brown, W.C. *et al.*, 1991). MSA-1 fue un atractivo candidato vacunal porque está codificada por un gen de copia única, está expuesta en la superficie del merozoito, es altamente inmunogénica en su estado nativo, y los anticuerpos contra la forma nativa o recombinante de MSA-1 neutralizaron la infectividad de los merozoitos *in vitro*, sugiriendo su importancia en la invasión de los mismos (Hines, S.A. *et al.*, 1992; Hines, S.A. *et al.*, 1995b; Suárez, C.E. *et al.*, 2000; Mosqueda, J. *et al.*, 2002a). Sin embargo, cuando se la testeó MSA-1 no fue un inmunógeno efectivo, ya que los animales vacunados con la molécula rMSA-1 a pesar de que produjeron una elevada cantidad de anticuerpos, no fueron protegidos contra un desafío con cepa homóloga virulenta (Hines, S.A. *et al.*, 1992, Hines, S.A. *et al.*, 1995b)

La caracterización del locus genómico correspondiente a MSA-2 en la cepa mexicana Mo7 (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002) mostró que contiene 4 genes relacionados, organizados en tandem, a los que se denominó: *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* y *msa-2c* como se puede observar en la figura I. 11, de los cuales todos se expresan como proteínas de 30-44 kDa y despiertan la respuesta de anticuerpos bajo la infección (Jasmer, D.P. *et al.*, 1992; Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002; Berens, S.J. *et al.*, 2005).

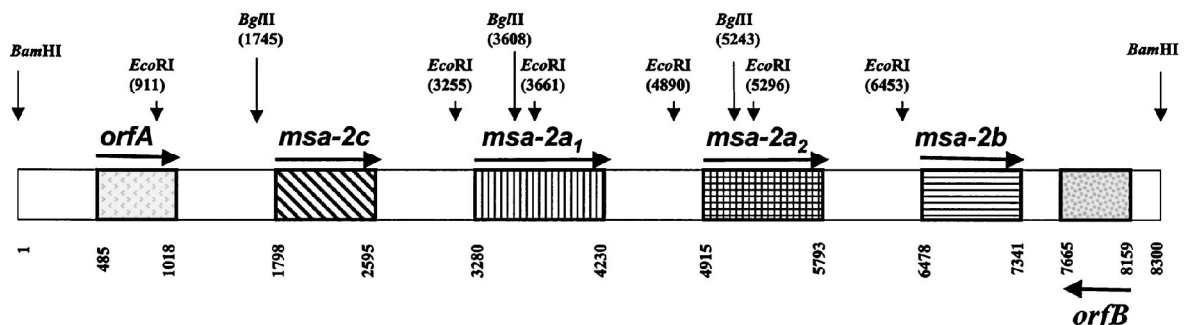


Figura I. 11.: El locus *msa-2* de la cepa Mo7 de *B. bovis* tiene 2 genes organizados en tandem, el mapa de dicho locus se baso en la secuenciación de un fragmento geonómico de 8,3 kilobases (kb). Los marcos de lectura abierta (ORF) se indican por rectángulos estampados. Las flechas horizontales indican la orientación de la cadena de ADN codificante. El *orfA* no muestra homología significativa con otros genes conocidos, y el *orfB* muestra una fuerte homología a varias thiolasas y acetyl-CoA acetyltransferasas. Los sitios de restricción para las enzimas BamHI, BglII, y EcoRI se indican con flechas verticales.

MSA-2a1 es la proteína original de 44-kDa descrita por Jasmer, D.P. *et al.* (1992). Anticuerpos específicos para MSA-2a₁, MSA-2a₂, MSA-2b y MSA-2c bloquearon significativamente la unión e invasión de los merozoitos a los eritrocitos (Mosqueda, J. *et al.*, 2002b). Estos cuatro genes fueron también identificados en la cepa argentina R1A y se

encontró un moderado a alto grado de conservación en las secuencias de nucleótidos, siendo msa-2c el más conservado de los cuatro con un porcentaje de identidad del 88.7% (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002).

El tercer grupo de antígenos estudiados como posibles antígenos vacunales debido a sus implicaciones dentro del proceso de invasión del eritrocito por el merozoito y de la disolución de la vacuola parasitófora son los antígenos del complejo apical de *Babesia sp.* contenidos dentro de organelas como las roptrias, micronemas o cuerpos esféricos (McElwain, T.F. *et al.*, 1991; Wright, I.G. *et al.*, 1992; Ushe, T.C. *et al.*, 1994). Los antígenos de las roptrias que pertenecen a una familia multigénica (RAP, “rhoptry-associated proteins”) han sido identificadas en las especies *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Suarez, C.E. *et al.*, 1991b; Dalrymple, B.P. *et al.*, 1993b; Skuce, P.J. *et al.*, 1996). RAP-1 es un antígeno de 60 kDa que es reconocido por anticuerpos y células T de bovinos naturalmente inmunes (Norimine, J. *et al.*, 2002). Aún cuando la función de las proteínas RAP no ha sido dilucidada perfectamente, el hecho de que anticuerpos monoclonales anti-RAP-1 inhiban el crecimiento de *B. bigemina in vitro* (Figueroa, J.V. *et al.*, 1991), sugiere la implicación de las moléculas RAP-1 en el mecanismo de invasión y la importancia de estas moléculas a nivel inmunológico. Además, las moléculas RAP-1 de *B. bovis* y de *B. bigemina* poseen epitopes de células T cooperadoras, los cuales se encuentran conservados entre cepas de las diferentes especies. Siendo altamente inmunogénicos, estos epitopes tienen la capacidad de inducir a los linfocitos T cooperadores, que al expresar interferón activarán a los linfocitos B secretores de anticuerpos IgG2 opsonizantes (Brown, W.C. *et al.*, 1998). Estudios de inmunización y desafío fueron realizados con la forma recombinante de RAP-1 de *B. bovis* (Norimine, J. *et al.*, 2003). RAP-1 derivada de la cepa México fue seleccionada por la evidencia que anticuerpos contra RAP-1 bloquean la invasión de esporozitos y merozoitos (Mosqueda, J. *et al.*, 2002a; Yokoyama, N. *et al.*, 2002), la ausencia de inmunodominancia serológica, el fuerte reconocimiento por células T CD4+ de ganado protegido, y la conservación de epitopes entre aislamientos. La proteína fue administrada con IL-12 y adyuvante RIBI hasta que se observó una fuerte proliferación de linfocitos T CD4+ y la observación de secreción de IFN- γ . La vacuna montó una fuerte respuesta mediada por células y de IgG1 e IgG2, pero ninguno de los bovinos fue protegido, desarrollando la enfermedad o parasitemia seguido al desafío con la cepa virulenta T2Bo (Norimine, J. *et al.*, 2003). Además, el alto título de suero inmune obtenido después de la inmunización falló en neutralizar la infectividad *in vitro* de la cepa México de *B. bovis*, en contraste a lo observado con suero bovino inmune anti-MSA-1 (Norimine, J., *et al.*, 2003; Brown *et al.*, datos no publicados). La secuencia de aminoácidos de RAP-1 de las cepas T2Bo

y México es idéntica, descartando la variación antigénica como una posible explicación para la falla de la vacuna.

Dentro de las proteínas del complejo apical, las proteínas del cuerpo esferoidal estarían igualmente involucradas en el proceso de invasión y de la modificación de la membrana del eritrocito infectado. Se han identificado tres proteínas que se localizan en los cuerpos esferoidales: una molécula de 77-80 kDa (Bb-1/Bv80) (Dalrymple, B.P. *et al.*, 1993a); una de 225 kDa (BvVA1) (Dalrymple, B.P. *et al.*, 1993a; Jasmer, D.P. *et al.*, 1991), respectivamente redesignadas como SBP-1 y SBP-2 (Jasmer, D.P. *et al.*, 1991); y una de 135 kDa denominada SBP-3. Las moléculas SBP1 y SBP2 se encuentran asociadas con la fase citoplásmica de la membrana del eritrocito infectado durante o justamente después de la invasión (Jasmer, D.P. *et al.*, 1991; Dowling, S.C. *et al.*, 1996; Hines, S.A. *et al.*, 1995a; Ruef, B.J. *et al.*, 2000). Las proteínas SBP1 y SBP2 son los principales componentes de la fracción DSP (fracción proteica de los antígenos parasitarios solubles) a la cual se le atribuye capacidad inmunoprotectora en los bovinos (Goodger, B.V. *et al.*, 1992). Estas dos moléculas han sido clonadas y expresadas en forma de proteína de fusión. La molécula SBP1 presenta en la región N-terminal epitopes T capaces de inducir una respuesta inmune celular (Brown, W.C. *et al.*, 1993), los cuales muestran polimorfismo entre los distintos aislamientos (Hines, S.A. *et al.*, 1995a).

La capacidad para inducir una respuesta inmune protectora ha sido evaluada en dos antígenos de los denominados excretados/secretados (antígenos parasitarios liberados ya sea naturalmente *in vivo* en el plasma de los animales infectados, o *in vitro* en el sobrenadante de cultivo) de *B. bovis*, el cuarto grupo de los estudiados como posibles candidatos para el desarrollo de vacunas recombinantes. Así, se evaluó la inoculación de los antígenos 12D3 y 11C5 localizados en el extremo apical de los merozoitos y en el citoplasma de eritrocitos infectados, expresados como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* formuladas en adyuvante conteniendo Montanide ISA 50V, Quil A y DEAE dextrano, en grupos de 6 animales susceptibles para *B. bovis*, que fueron luego desafiados con el aislamiento heterólogo australiano W, altamente virulento. Aunque los grupos de bovinos vacunados ya sea con 12D3, 11C5 o una combinación de ambas redujeron la parasitemia aproximadamente 4 veces y algunos animales individuales parecieron controlar la infección del parásito, todos los animales mostraron síntomas de la enfermedad y la mayoría requirió tratamiento. Es importante mencionar que hubo una variación significativa entre los animales dentro de cada grupo. Los resultados confirman el uso potencial de ambos antígenos pero también

demuestran las limitaciones de las formulaciones utilizadas. (Hope, M. *et al.*, 2005, Brown, W.C. *et al.*, 2006b).

A pesar de los grandes avances realizados en la última década, especialmente en lo que respecta a la caracterización inmunobiológica molecular de los antígenos candidatos a vacuna brevemente mencionados, a la fecha no se ha producido en forma comercial ningún biológico contra la babesiosis bovina que posea características adecuadas de eficacia, potencia, seguridad y costo. Permanece el reto de involucrarse más profundamente en el descubrimiento de los antígenos esenciales para el desarrollo de una vacuna ideal. (Figueroa Millán, J.V. y Alvarez Martínez, J.A., 2003).

El desarrollo de vacunas recombinantes para *B. bovis* no ha tenido hasta ahora el resultado esperado. Sin embargo, este tipo de vacunas han sido exitosas en dos hemoparásitos, transmitidos por garrapatas, los piroplásmidos *Theileria parva* y *Babesia divergens*.

En el caso de *Theileria parva* la vacunación del ganado con una forma recombinante del antígeno de la superficie del esporozoito denominad p67, redujo significativamente el desarrollo de la Fiebre de la Costa Este después del desafío natural en Kenya (Musoke, A. *et al.*, 2005).

Por otro lado, la inmunización de gerbils con la forma recombinante de Bd37, una proteína anclada a la membrana por GPI de *B. divergens*, indujo protección contra el desafío con una cepa virulenta del parásito (Hadj-Kaddour, K. *et al.*, 2007).

En conclusión, la babesiosis bovina producida por *B. bovis* continúa siendo una limitante del ganado tanto en Argentina como a nivel mundial. El desarrollo de nuevas vacunas y métodos de diagnóstico mejorados contribuiría a obtener un control minucioso de esta enfermedad. Esta Tesis se enfoca en la familia de antígenos MSA-2, que por sus características particulares, pueden ser útiles para ambos propósitos.

H. Hipótesis

Esta Tesis se basa en las siguientes hipótesis:

(i) los antígenos del grupo Merozoite Surface Antigen-2 (MSA-2) poseen epitopes B lineales, conservados entre aislamientos geográficos;

(ii) es posible predecir estos epítopes B a partir de las secuencias de los correspondientes genes utilizando herramientas bioinformáticas;

(iii) algunos de estos epitopes B serán sensibles a la neutralización;

(iv) dado que estos antígenos son inmunodominantes, algún miembro de esta familia será útil para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico serológico.

O. Objetivos.

O. I. Objetivo general

Esta Tesis está orientada al desarrollo de nuevas herramientas de control para la babesiosis bovina, enfermedad transmitida por garrapatas al ganado, que es fuente de importantes pérdidas económicas en el NOA y el NEA y vastas regiones tropicales y subtropicales del mundo. En particular, esta Tesis se ha centrado en la exploración de las potencialidades de la familia de antígenos superficiales de *Babesia bovis*, MSA-2, para el desarrollo de vacunas a subunidades y métodos de diagnóstico.

O. II. Objetivos específicos:

1. Caracterización del antígeno MSA-2c de una cepa argentina de *Babesia bovis* en cuanto a su expresión en la etapa de merozoito, la exposición de epitopes B en la superficie del parásito y la presencia de epitopes B sensibles a la neutralización.

2. Análisis *in silico* de alelos de *msa-2a1, b y c*, de aislamientos americanos de *B. bovis* para la identificación de posibles epitopes B en regiones conservadas.

3. Caracterización de algunos de los epitopes B predichos en cuanto a su expresión en parásitos de aislamientos de *B. bovis* distantes geográficamente, y su sensibilidad a la neutralización.

4. Utilización de MSA-2c para desarrollar nuevos tests serológicos para la babesiosis bovina: (a) Desarrollo de un ELISA indirecto basado en este antígeno, y comparación con un ELISA indirecto basado en RAP-1, el antígeno de diagnóstico más usado para este parásito, para la detección de anticuerpos específicos en infecciones experimentales y de campo; (b) Desarrollo de un ELISA competitivo basado en MSA-2c y un anticuerpo monoclonal producido contra éste, para el diagnóstico serológico en bovinos y otras especies animales, como el búfalo de agua.

*M. Materiales
y Métodos*

M. Materiales y Métodos

M. 1. Cepas Utilizadas

Las siguientes cepas y aislamientos de *B. bovis* fueron utilizados:

- (i) R1A: cepa vacunal argentina inicialmente aislada de un brote del Noroeste en 1990 y atenuada a través de pasajes en bovinos esplenectomizados (Anziani, O.S. *et al.*, 1993).
- (ii) S2P: aislamiento patógeno derivado de un caso clínico en Salta en el año 1986.
- (iii) M2P: aislamiento patógeno derivado de un caso clínico ocurrido en la localidad de Mercedes, provincia de Corrientes en el año 1985.
- (iv) M3P: aislamiento patógeno aislado de un caso clínico en la localidad de Virasoro, provincia de Corrientes en el año 1998.
- (v) M1A: cepa atenuada después de pasajes en bovinos esplenectomizados que se utiliza para la vacunación en el Noreste de Argentina.
- (vi) RAD: cepa clonada, derivada de un aislamiento denominado Kbb (originalmente aislado en México y donado por Kuttler, K.L. del Hemoparasite Research Unit, WSU, Pullman WA). RAD fue irradiada y clonada biológicamente como describió Rodríguez *et al.* (1983).
- (vii) Pullman: aislamiento patógeno (Nevils, M.A. *et al.*, 2000) que fue obtenida por Ronald Smith de garrapatas infectadas colectadas de un frigorífico en la ciudad de México en 1975.
- (viii) Veracruz: aislamiento patógeno de campo, recolectado del estado de Veracruz, México en 1996. Ha sido mantenido en nitrógeno líquido y pasajes en bovinos en la Unidad de Investigación de Babesiosis del CENID (Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria)-PAVET, INIFAP en Morelos, México.
- (ix) Tabasco: aislamiento patógeno de campo, recolectado del estado de Tabasco, México en 1998. Se mantuvo en nitrógeno líquido y es amplificada en bovinos en la Unidad de Investigación de Babesiosis del CENID-PAVET, INIFAP en Morelos.
- (x) Mo7: cepa clonada biológicamente por dilución límite de la cepa México o Pullman de *B. bovis* y mantenida en estabilatos criopreservados en nitrógeno líquido (Hines, S.A. *et al.*, 1989).
- (xi) T2Bo: aislamiento patógeno proveniente del estado de Texas, Estados Unidos.

R1A, S2P, RAD, Mo7 y T2Bo fueron mantenidas en cultivo *in vitro* (Levy, M.G. and Ristic, M., 1980) en medio M199-eritrocitos bovinos, suplementado con 40% de suero bovino, a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂.

M2P, M3P, M1A, Pullman, Veracruz y Tabasco fueron amplificadas en terneros

esplenectomizados. En todos los casos, el almacenamiento a largo plazo se realizó en nitrógeno líquido, utilizando 10 % (v/v final) de Polyvinyl pyrrolidone (PVP, Sigma) (Standfast, N.F. and Jorgensen, W.K., 1997) como criopreservante.

M. 2. Cultivo de *Babesia bovis*

Con la finalidad de mantener y propagar cepas y producir vacunas, así como obtener merozoitos para diferentes ensayos, se desarrolló el cultivo de merozoitos de *B. bovis* en eritrocitos bovinos. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se siguió el Método Microaerofílico en Fase Estacionaria (MASP) descrito por Levy y Ristic (1980) para la propagación *in vitro* de *B. bovis*. Para comenzar se obtuvieron eritrocitos normales por extracción de sangre de un bovino dador, libre de babesiosis o vacunación, de 12 meses de edad o más, de la vena yugular y se volcó en un kitasato conteniendo esferas de vidrio (10 milímetros (mm) de diámetro) para luego proceder a la defibrinización de la misma por agitación continua y lenta. Una vez obtenida la sangre defibrinada se la centrifugó a 1000 xg durante 15 minutos (min), al cabo de lo cual se separó: (i) el suero (sobrenadante), que se sometió a una nueva centrifugación a 2500 xg luego de lo cual el sobrenadante resultante se alicuotó y almacenó hasta su uso, y (ii) luego de remover la capa correspondiente al “*buffy coat*” (interfase entre los eritrocitos y el suero), se lavó el *pellet* 3 veces centrifugando a 1000 xg cada vez durante 15 min a 10 °C, con solución VYM (para 1 litro de solución: 0,016 g CaCl₂.2H₂O, 0,4 g KCL, 1,45 g KH₂PO₄, 0,77 g Na₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄.7H₂O, 7,077 g NaCL, 20,5 g glucosa, 0,0423 g adenina, 0,0708 g guanosina, pH 7, esterilizado por filtración). El *pellet* resultante fue almacenado a 4 °C hasta su uso, cubierto por un volumen del mismo medio.

El medio de cultivo básico (MB) consistió en: medio M199 (Sigma) adicionado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma), 40 % volumen en volumen (v/v) suero bovino y 20 mM TES (2-[(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic, Sigma). A éste medio, se agregó una suspensión de eritrocitos bovinos, preparados como se describió anteriormente, de manera de tener una concentración final de eritrocitos de 10% (v/v). Este medio fue inoculado con eritrocitos infectados, provistos en primera instancia por el Dr. Ignacio Echaide, EEA-Rafaela, INTA; en una proporción tal que el porcentaje de eritrocitos parasitados (PPE, [Nº de eritrocitos parasitados/total de eritrocitos] x 100) inicial fue entre 1 y 3%. Los cultivos fueron mantenidos en atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, en placas de 12 o 24 pocillos en un volumen

final ajustado al tamaño del pocillo o botella, de manera que la altura de la suspensión fuera de aproximadamente 6 mm. Cada 24 horas (h) se procedió a la renovación del medio básico, lo cual consistió en retirar el 75 % aproximadamente del sobrenadante de cada pocillo, sin tocar los eritrocitos sedimentados en el fondo del mismo, y adicionar igual volumen de MB fresco. Diariamente también se monitoreó el avance del cultivo realizando frotis de los mismos, fijados durante 5 min con Metanol (Merck) y coloreados con Tinción 15 (Bio-Pur) y examinados al microscopio con un objetivo de 1000x. Cuando se alcanzó un PPE de 5 % o más se procedió al subcultivo o reducción de los cultivos de manera de tener un 0,5 % de PPE. Esto último consistió en hacer una dilución 1:2, 1:4 o 1:6 según corresponda con medio completo (Medio básico con 10% de eritrocitos) y luego llevar a volumen, de ser necesario, con MB. La Figura M 1. muestra una foto de un frotis de eritrocitos infectados con la cepa S2P cultivados en nuestro laboratorio.

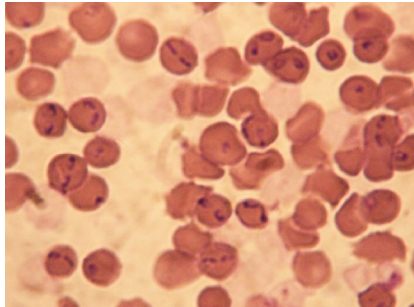


Figura M. 1.: Fotografía de un extendido de eritrocitos parasitados con la cepa S2P de *B. bovis*, mantenida en cultivo. Aumento 1000 x.

M. 3. Extracción de ADN de eritrocitos bovinos infectados con *B. bovis*.

Las suspensiones de eritrocitos parasitados, provenientes de cultivos *in vitro*, o la sangre entera infectada, en el caso de amplificación de parásitos en bovinos esplenectomizados, extraída utilizando 10 UI/ml de heparina como anticoagulante (50-100 ml de volumen en ambos casos), se centrifugaron durante 20 min a 3000 xg a 4 °C, y el *pellet* se resuspendió en *buffer* fosfato salino (PBS) cuidadosamente para evitar la lisis de los eritrocitos y se lavó por centrifugación con el mismo *buffer* 2 o 3 veces. El *pellet* se congeló a -80 °C durante toda la noche (over night, ON) y luego de descongelado se lavó con 30 ml de PBS y se centrifugó a 10000 xg a 4° C durante 20 min para remover la hemoglobina liberada. El *pellet* resultante se resuspendió en 200 µl de PBS. Luego se agregó 1% concentración final de dodecil sulfato de sodio (SDS, Biodynamics) y Proteinasa K (USB Corporation) en una concentración final de 0,1 mg/ml y se incubó a 65 °C por 15 min, y luego a 45 °C durante 16 h. Se agregó 1M NaCl

concentración final (Sigma) y 1 volumen de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Ambion), se agitó vigorosamente y luego se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a 4 °C para separar las fases, quedándose con la fase superior acuosa. Los pasos de agregado de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico, agitación y centrifugación fueron repetidos 2 o 3 veces, hasta obtener la fase acuosa totalmente limpia. A ésta se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto (MERCK) frío, y se dejó a -20 °C durante 1 h para luego centrifugar a 14000 xg durante 60 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* conteniendo el ADN precipitado se lavó con etanol 70%, seguido de centrifugación (14000 xg, 15 min, 4°C). El *pellet* resultante se secó y resuspendió en H₂O ultra PURE (agua destilada, libre de DNAsas y RNAsas, y filtrada a través de membrana con diámetro de poro de 0,1 micrones, Invitrogen) precalentada a 65 °C. El ADN obtenido se incubó con 20µg/ml concentración final de RNase (Amersham) durante 60 min a 45 °C, seguido de incubación con 0,1 mg/ml de Proteinasa K durante 1 h. a 45 °C y reextracción con fenol/cloroformo/isoamílico. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en H₂O ultra PURE, se alicuotó y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Finalmente una alícuota se analizó por electroforesis horizontal en un gel de 0,8% agarosa, como se describe en el punto 5. Asimismo, se midió en espectrofotómetro la absorbancia a 260 y 280 nm (Abs.₂₆₀ y Abs.₂₈₀ respectivamente) de una alícuota diluída 1/100, para evaluar la presencia y pureza del ADN extraído. Siguiendo éste protocolo, se obtuvieron normalmente entre 8 y 20 µg de ADN por cada 100 ml de cultivo *in vitro* con PPE entre 2 y 5%, y entre 5 y 10 µg de ADN por cada 100 ml de sangre infectada. Se consideró aceptable la pureza del ADN cuando la relación Abs.₂₆₀/Abs.₂₈₀ fue mayor que 1,6. A valores menores se procedió a una nueva incubación con proteinasa K y extracción con fenol cloroformo.

M. 4. Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de los genes de la familia MSA-2.

A partir del ADN obtenido de las distintas cepas y aislamientos se amplificaron por PCR los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes de *B. bovis msa-2c*, *msa-2a1*, *msa-2a2* y *msa-2b*, utilizando oligonucleótidos específicos sintetizados por la empresa Fagos (Buenos Aires, Argentina), para su posterior clonado en un vector de secuenciación y un vector de expresión. En la tabla M. 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia	Genes amplificados	Tamaño del producto (pb)
B44TopoForward	5'-ATGATCGGGAAAATCTTC-3'	- <i>msa-2a₁</i>	934
B42/44TopoReverse	5'-AAAATGCAGAGAGAACG-3'	- <i>msa-2a₂</i>	844
		- <i>msa-2b</i>	862
msa-2-Forward	5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATAAC-3'	- <i>msa-2c</i>	796
B42/44TopoReverse	5'-AAAATGCAGAGAGAACG-3'		

Tabla M. 1.: Oligonucleótidos para amplificar los genes de la familia MSA-2. El oligonucleótido antisentido es el mismo para los 4 genes y corresponde a la región de unión al grupo glicosil-fosfatidilinositol. El oligonucleótido sentido para los genes *msa-2a₁*, *a₂* y *b* fue también el mismo, y corresponde a la región del péptido señal.

Todos los oligonucleótidos sentido fueron diseñados de forma de mantener el marco de lectura del gen de interés. Todos los oligonucleótidos antisentido fueron diseñados de forma de eliminar el codón de detención (codón o triplete stop) del gen y mantener el marco de lectura en fusión con los residuos de histidina del vector a utilizar para el clonado en el caso del vector de expresión. Nótese que el oligonucleótido antisentido para los genes *msa-2a₁*, *msa-2a₂*, *msa-2b* y *msa-2c* es el mismo, dado que esta secuencia corresponde en las glicoproteínas de la familia MSA a la región de unión al grupo glicosil-fosfatidilinositol, que constituye su anclaje a la membrana celular. Por otra parte, para los genes *msa-2a₁*, *a₂* y *b* el oligonucleótido sentido fue también el mismo, y corresponde a la región del péptido señal.

Se preparó la mezcla de reacción de PCR para un volumen final de 25 µl conteniendo 1 ng de ADN templado, *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (cada uno), 0,5 µM de oligonucleótidos sentido y antisentido, 0,05U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), y H₂O libre de nucleasas hasta llevar al volumen deseado. Como control negativo de la PCR se usó mezcla de reacción sin ADN templado.

El programa de PCR utilizado se describe en la Tabla M. 2.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Ciclos (n)
Desnaturalización Inicial	4	95	1
Desnaturalización	1	95	30
Hibridización	1	55	
Extensión	2	72	
Extensión final	4	72	1

Tabla M. 2.: Condiciones del ciclado para la amplificación de los genes *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* y *msa-2c* pertenecientes a la familia MSA-2

Todas las amplificaciones fueron confirmadas en una corrida electroforética horizontal en geles de agarosa, como se describe en el punto 5.

M. 5. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN tanto de las cepas utilizadas como de los plásmidos purificados y productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 % y 1,5 % en *buffer* TAE (40 mM Tris, 0,1 % (v/v) Acido Acético, 1 mM EDTA) a 5-10 V/cm². Para poder visualizar las bandas de ADN, se incorporó a los geles bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µg/ml durante su preparación, y se observaron en un transiluminador de luz UV. Las muestras se sembraron con *buffer* de siembra (0,25 % (p/v) de azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) de xylene-cyanol FF, 30 % Glicerol en H₂O). Se utilizaron los marcadores de ADN 1 kb DNA Ladder y 1 kbPlus (Promega), para determinar el tamaño de las bandas.

M. 6. Clonado y secuenciación de los productos de PCR.

M. 6.1. Clonado en vector de secuenciación.

Los productos amplificados se clonaron en el equipo comercial TOPO TA Cloning System (TOPO Cloning, Invitrogen) que utiliza el vector plasmídico pCR[®]2.1-TOPO[®], el

cual permite la inserción directa de los productos de amplificación de PCR, sin necesidad de cortar con enzimas de restricción. Esto se debe a que el plásmido lineal posee en su extremo 3' un nucleótido timidina sin aparear, que permite la unión con la adenosina 3' no apareada del producto de amplificación de la PCR como puede observarse en la Figura M. 2.

Asimismo, éste vector posee genes para resistencia a ampicilina y kanamicina para la rápida selección de las colonias de bacterias que adquirieron el plásmido durante la transformación; un origen de replicación de alto número de copias en bacterias (pUC ori); un origen de replicación del bacteriófago f1 (f1 ori) que hace posible el rescate de simple cadena; el gen reportero lacZ que produce en bacterias colonias de color azul pero si el ADN de la PCR se insertó en la mitad de dicho gen produce colonias de color blanco fácilmente reconocibles; el promotor T7 que permite la transcripción y traducción *in vitro* por el fago T7 y si dicho fago infecta la bacteria producirá proteína a partir de la secuencia de ADN del vector y el inserto y sitios para la enzima de restricción EcoR I flanqueando el sitio de inserción del inserto de PCR para poder remover fácilmente el inserto cuando se requiera.

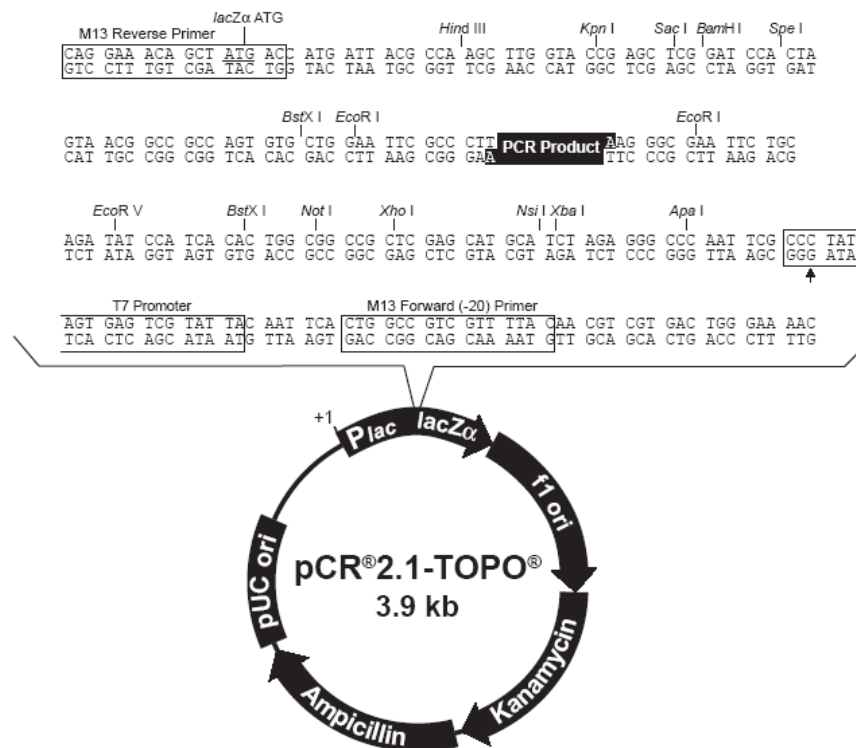


Figura M.2.: Esquema del vector plasmídico pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen)

Para la ligación se incubaron 4 µl de producto de PCR (amplicones), 1 µl de vector pCR® 2.1-TOPO® y 1 µl solución de sales (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂, pH 8,0) por el lapso de

5 min a temperatura ambiente. Dado que el vector posee la enzima topoisomerasa I en sus extremos 3', esto le permite ligar covalentemente el vector al extremo 5' del segmento de ADN, sin necesidad de agregado de una enzima ADN ligasa externa, como se puede observar en la figura M. 3.

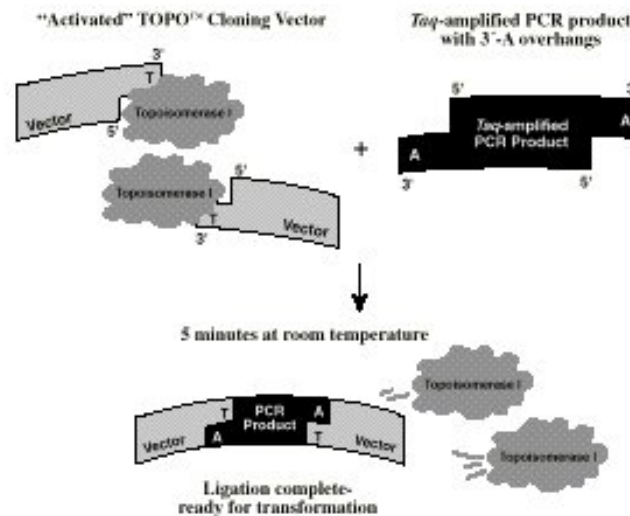


Figura M.3.: Ligación del producto de PCR en el vector pCR® 2.1-TOPO®

Para el procedimiento de transformación se siguió el método de Sambrook, J. *et al* (1989). Se agregaron 5 µl de esta ligación a 50 µl de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (Invitrogen), y se dejó 30 min en hielo. Por medio de un choque (shock) térmico de 30 a 45 segundos (s) en baño a 42 °C se logró la permeabilización de la membrana plasmática y luego se colocó nuevamente en hielo por 5 min más. Se adicionaron 300 µl de medio Luria Bertani (LB) líquido (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl) y se agitó durante 1 h a 37 °C. Luego se sembró en placa de Luria Bertani Ampicilina-agar (LBA-agar) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar y 100 µg/ml de Ampicilina). Por último se dejó ON en estufa a 37 °C y, a la mañana siguiente, se obtuvieron las colonias correspondientes. Se realizó una PCR directa sobre las colonias crecidas (*colony* PCR), para lo cual se tomó una punta de escarbadiante de cada colonia a analizar, se sumergió en mezcla de PCR conteniendo los oligonucleótidos utilizados para la amplificación, y se sometió la mezcla al mismo programa de ciclado descrito en la Tabla M. 2., con el agregado de 6 min a 95 °C en el paso de desnaturalización inicial para lisar las células e inactivar las nucleasas.

Mediante análisis por electroforesis horizontal como se detalló en el punto M. 5., se seleccionaron entre 1 y 4 clones que tuvieran inserto para cada producto de amplificación.

M. 6.1.1. Purificación del ADN plasmídico.

De los clones positivos obtenidos en el punto anterior se realizó la purificación de ADN plasmídico para luego poder someter a secuenciación. Para ello se inocularon tubos conteniendo 1 ml de LBA con una punta de escarbadiante de las colonias positivas (aquellos que dieron amplificación en la PCR para selección) y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación.

Se guardó una alícuota de 400 µl de cultivo crecido a -20°C, agregando 20% (v/v) de glicerol para su crioprotección y por otra parte, se iniciaron nuevos cultivos de 10 ml para la purificación de plásmidos, que crecieron toda la noche en las condiciones descriptas. Se utilizó un *kit* comercial de minipreps Wizard® Plus SV (Promega). El método utilizado consistió básicamente en los siguientes pasos: se centrifugó cada cultivo a 1000 xg por 10 min para obtener un precipitado de bacterias, éste se resuspendió en un buffer de lisis, mezclando por inversión. Se agregó una solución con proteasa alcalina durante 5 min a temperatura ambiente y se detuvo su actividad con una solución neutralizante, mezclando por inversión. Se centrifugó a 10000 xg por 10 min y el sobrenadante se cargó en una columna conteniendo resina de purificación. La columna fue centrifugada dentro de un tubo de 1,5 ml a 10000 xg durante 1 minuto. La columna fue lavada con 2 ml de solución de lavado. Por último se eluyó el plásmido con 100 µl de agua libre de nucleasas y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Se comprobó la eficiencia de la purificación por electroforesis horizontal en gel de 0,8% (p/v) agarosa y se cuantificaron las preparaciones por lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm como se describió en los puntos M. 5. y M. 3. respectivamente.

Los plásmidos (entre 1 y 4 clones por cada producto de amplificación) fueron secuenciados con los oligonucleótidos del vector M13 sentido y antisentido en el Servicio de Secuenciación de ADN de la empresa Macrogen (Seul, Corea del Sur) para su posterior análisis bioinformático.

M. 6.2. Clonado en vector de expresión y transformación de células competentes

Por otra parte los marcos de lectura abiertos correspondientes a *msa-2c* y *msa-2b* amplificados por PCR a partir de ADN de la cepa R1A también se clonaron para la expresión de las proteínas correspondientes, utilizando el *kit* comercial pBAD/TOPO® ThioFusion™ (Invitrogen).

El vector de expresión procariótico pBAD/thioTOPO de 4454 pb permite la inserción directa de los productos de amplificación de PCR, sin necesidad de cortar con enzimas de

restricción, por un sistema idéntico al descrito para el vector pCR2.1-TOPO (punto 6.1). Además, el vector posee unido a los extremos la enzima topoisomerasa I que permite ligar covalentemente el vector al extremo 5' del segmento de ADN de interés del mismo modo que el pCR2.1. TOPO, como se puede ver en la figura M. 4.

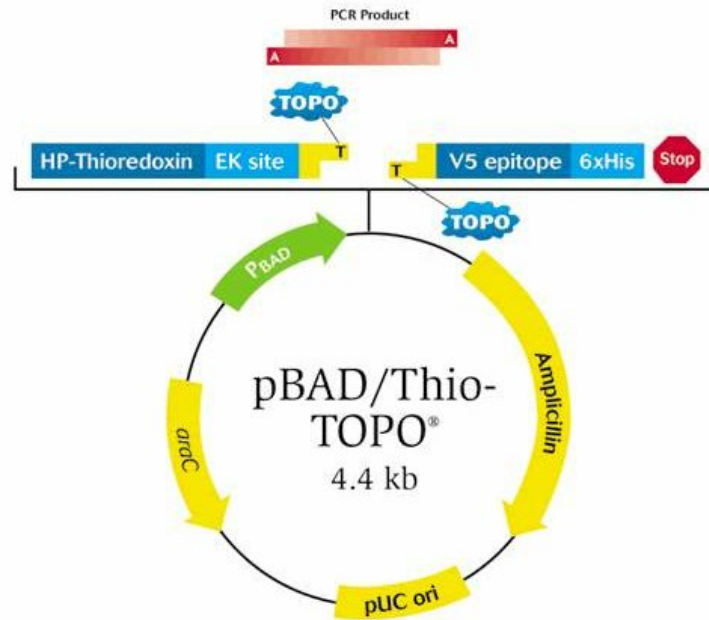


Figura M. 4.: Mapa del vector pBAD/Thio-TOPO (Invitrogen)

Los niveles de expresión de la proteína de interés están regulados por la concentración de L-arabinosa en el medio. En ausencia de arabinosa, el regulador negativo transcripcional AraC (gen presente en el plásmido) forma un bucle (loop) en el ADN que impide la unión de la ADN polimerasa al promotor *araBAD* del vector. En presencia de la misma, la arabinosa se une a AraC liberando el bucle y permitiendo la transcripción.

El producto de expresión del vector pBAD/thioTOPO es la proteína o péptido de interés fusionado a la proteína Tiorredoxina. Esto permite aumentar la eficiencia de transcripción y la solubilidad de la proteína a la que va fusionada, en especial si se trata de una proteína de membrana con regiones hidrofóbicas. A su vez la Tiorredoxina posee dos de sus aminoácidos (aa) cambiados por histidinas, con el fin de formar en la proteína plegada un parche de histidinas. Este parche junto con el agregado de 6 histidinas más en la región C-terminal de la proteína expresada, permite la purificación de ésta por medio de una cromatografía de afinidad por quelantes metálicos, como lo son las resinas de níquel-agarosa.

Los pasos seguidos para la ligación de los fragmentos de ADN en el vector y la transformación de las células fueron los siguientes: se incubó: 4 µl de producto de PCR

(amplicones), 1 µl de vector pBAD/thioTOPO, 1 µl de solución de sales por el lapso de 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 2 µl de esta ligación a 50 µl de células químicamente competentes de la cepa de *E. coli* TOP 10 [F⁻ *mcrA* Δ*mrrhsdRMS-mcrBC*)Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*] (Invitrogen) y se dejó 30 min en hielo. Por medio de un choque (shock) térmico de 30 a 45 s en baño a 42 °C, se logró la permeabilización de la membrana plasmática y luego se colocó en hielo nuevamente durante 5 min. Se adicionaron 250 µl de medio LB y se agitó durante 1 hora a 37 °C. Se sembró en placas de LBA-agar. Por último se dejó ON en estufa a 37 °C.

La selección de clones, la expresión de proteínas recombinantes y su purificación serán descriptas en el M. 9.

M. 6.3. Secuenciación automática de los productos amplificados

La secuenciación (Sanger, F. *et al.*, 1977) automática de los productos de amplificación por PCR clonados tanto en el vector de secuenciación como en el vector de expresión se realizó utilizando el servicio de secuenciación de ADN brindado por la empresa MacroGen (Seul, Corea del Sur) utilizando los instrumentos 6 Applied Biosystems 3730xl y 9 ABI 3700 y los oligonucleotidos M13 sentido y antisentido ubicados en el vector de clonado. Las secuencias fueron recibidas por correo electrónico en formato .ab1 y .phd).

M. 7. Herramientas de bioinformática

El acceso a las secuencias genómicas de las cepas Mo7 de *B. bovis* se realizó utilizando el sitio web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>).

La edición y análisis de las secuencias nucleótidas se realizó con los programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y las herramientas del sitio web del Baylor College of Medicine, USA, de acceso libre a través de internet (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>).

Para la comparación, alineamientos múltiples y búsqueda de zonas conservadas de las secuencias se utilizaron los programas ClustalW2 (Larkin, M.A., 2007) de acceso libre en el sitio del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) y Boxshade 3.21 de acceso libre en Embnet, Swiss Institute of Bioinformatics (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Para la realización de los alineamientos de a pares (pairwise sequence alignments) se utilizó una matriz de identidad BLOSUM 62 con una penalidad para el gap de 10 y una penalidad para la extensión del gap de 0,5, disponible en el sitio <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/alignment.html>.

Para la búsqueda de las secuencias que pudieran resultar probables epítopos B se utilizaron los programas de libre acceso disponibles en sitio de Internet del Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input, basados en el método de Kolaskar and Tongaonkar (1990) y en los métodos de Hidrofilicidad de Parker (Parker, J.M. *et al.*, 1986) y predicción de accesibilidad en la superficie de Emini (Emini, E.A. *et al.*, 1985).

El análisis posterior de los péptidos seleccionados en cuanto a su composición aminoacídica e hidrofobicidad se realizó mediante el programa situado en la página de Internet <http://www.sigma-genosys.com/calc/pepCalc.asp> de libre acceso.

Los sitios de corte para el péptido señal (Bendtsen, J.D. *et al.*, 2004, Nielsen, H. *et al.*, 1997, Nielsen, H and Krogh, A., 1998, Emanuelsson, O. *et al.*, 2007) y el anclaje a GPI (Eisenhaber, B. *et al.*, 2004) fueron predichos utilizando los algoritmos de los sitios de internet <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> y <http://mendel.imp.ac.at/home/Birgit.Eisenhaber>, opción Fungi, respectivamente.

Para la predicción de la estructura secundaria a partir de las secuencias aminoacídicas predichas se utilizó el programa CLC Combined Workbench 3 bajado del sitio de Internet <http://www.clcbio.com>.

M. 8. Síntesis y acoplamiento de los epítopos seleccionados

La síntesis química de los péptidos 1) ELLKLLIEA, perteneciente a la proteína MSA-2c; 2) YYKKHIS, perteneciente a la proteína MSA-2b; 3) KDYKTMVKFCN, perteneciente a la proteína MSA-2a1; y 4) THDALKAVKQLIKT ubicado en la proteína MSA-2c se llevó a cabo en la empresa Genbiotech, Argentina (www.genbiotech.com.ar) y Gen Script Corporation, Piscataway, New Jersey, U.S.A. (www.genscript.com).

Los mismos fueron sintetizados conjugados a la molécula Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH, 450-13000 kDa) para los ensayos de inmunización de ratones. El acople fue realizado en el extremo carboxilo por el método MBS que conjuga a través del grupo “thiol” en las cisteínas, con lo cual una cisteína fue agregada a las secuencias originales a tal fin. También se diseñó el agregado de tres residuos de glicina (G) entre el péptido y la cisteína, que actúa en forma de puente, imposibilitando el impedimento estérico entre la proteína *carrier* y el péptido.

Los extremos amino fueron acetilados (Ace), para colaborar con el correcto plegamiento de los péptidos.

Todos los péptidos fueron sintetizados con un grado de pureza > 75%. Luego de recibidos, se los resuspendió en H₂O Ultra PURE los que resultaron solubles en agua y dimetilsulfoxido (DMSO)/ H₂O (1:7, v/v) los insolubles, de manera de obtener una solución de almacenamiento de 10 mg/ml, se los alicuotó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

En la Tabla M. 3. se resumen los péptidos sintetizados y sus características. En azul se marcó la secuencia aminoacídica de interés, en rojo los aa que debieron ser agregados debido a la metodología utilizada.

Péptido	Composición aminoacídica orientación 5' - 3'	Proteína a la que pertenece	Aminoá- cidos Totales	Peso Molecular aproximado (daltons)	Solubilidad	
					libre	Acopla- do
Péptido 1	(Ace) ELLKLLIEAGGGC (OH)	MSA-2c	13	1357.6	DMSO/ H ₂ O	H ₂ O
Peptido2	(Ace) YYKKHISGGGC (OH)	MSA-2b	11	1254.4	H ₂ O	H ₂ O
Péptido 3	(Ace) KDYKTMVKFCNGGGC (OH)	MSA-2a1	15	1691.7	DMSO/ H ₂ O	DMSO/ H ₂ O
Péptido 4	(Ace) THDALKAVKQLIKTGG GC (OH)	MSA-2c	18	1880.0	DMSO/ H ₂ O	DMSO/ H ₂ O

Tabla M. 3.: Péptidos sintéticos. Cuatro péptido fueron seleccionados y sintetizados acoplados al carrier KLH (secuencia remarcada en azul), con el agregado de tres glicinas (G) y una cisteína (C) (marcadas en rojo) en el extremo carboxilo terminal para facilitar el acoplamiento. En el extremo amino terminal se agregó un grupo acetilo (Ace).

M. 9. Expresión y purificación de MSAs

M. 9.1. Selección de clones positivos para expresión de proteínas recombinantes.

Para seleccionar los clones conteniendo la secuencia de los genes de interés en la dirección correcta (con su extremo 5' ubicado hacia el promotor *araBAD*), se efectuó una reacción de "colony-PCR" como se describió en la sección M. 4., utilizando como oligonucleótido sentido, una región de la Tiorredoxina (5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3')

y el oligonucleótido antisentido correspondiente al extremo carboxilo terminal de *msa-2c* y *msa-2b* (B42/44TopoReverse, Tabla M. 1.).

Nuevamente, todos los productos de amplificación fueron confirmados sembrando 5 μ l en un gel de agarosa al 0,8 % en buffer TAE y teñidos con bromuro de etidio como se explicó en el punto M. 5. Como control negativo de la PCR se usó mezcla de reacción sin picar bacterias del cultivo. Dado que el clonado en una u otra dirección se produce al azar, se obtuvieron aproximadamente 50% de clones positivos.

M. 9.2. Inducción de la expresión en los clones seleccionados

Para analizar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes en cada uno de los clones, se inocularon tubos conteniendo 1 ml de LBA con una punta de escarbadietes de las colonias positivas (aquellos que dieron amplificación en la *colony* PCR del punto anterior) y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente, 100 μ l de estos cultivos se utilizaron para comenzar cultivos frescos en 2 ml de LBA, los cuales fueron incubados por aproximadamente 2 h a 37 °C con agitación; tiempo en el que el cultivo alcanza una absorbancia a 600 nm de 0,4 a 0,6. Luego se sometió 1 ml del cultivo a inducción con 0,2 % (0,2 g/100 ml, conc. final) de arabinosa, mientras que el mililitro restante se utilizó como control negativo, sin agregado del inductor. Los cultivos con y sin arabinosa fueron incubados a 37 °C por 3 h con agitación.

Al cabo de las 3 h de incubación, los cultivos de bacterias fueron centrifugados (1000 xg, 15 min, a temperatura ambiente), y los precipitados fueron disueltos en *buffer* de muestra (250 mM Tris-HCl pH 6,8/ 10% (p/v) SDS/ 0,5 % (p/v) azul de bromofenol/ 50% (v/v) glicerol/ 0,4% (v/v) β -mercaptoetanol). Las muestras fueron hervidas por 5 min, y sonicadas en hielo, con un sonicador de punta de titanio (Branson Ultrasonic Corporation, modelo Sonifier 250) con dos intervalos de 15 s en potencia 5; luego de lo cual fueron centrifugadas (10000 xg., 4 °C, 5 min). Los sobrenadantes fueron sembrados en minigeles de 10% de poliacrilamida y las proteínas fueron separadas por electroforesis vertical en presencia de SDS. Se corrió en los mismos geles un marcador de peso molecular. Esta técnica se desarrolla con más detalle en el punto 9.5. Al cabo de la corrida, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie (0,25% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma)/ 45% (v/v) metanol/ 10% (v/v) ácido acético glacial) y desteñidos con solución decolorante (40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial, 50% (v/v) agua bidestilada). Luego se secaron sobre papel *Whatman* a 80 °C por 2 h utilizando un secador de geles (BIO-RAD).

La comparación del patrón de proteínas presentes en los extractos de los cultivos con y sin inducción permitió establecer aquellos clones con mayores niveles de inducción de las proteínas de interés.

Las proteínas recombinantes obtenidas, que contienen Tiorredoxina (13 kDa) en el extremo N-terminal y un grupo de 6 histinas (3 kDa) en el extremo C-terminal tienen aumentado su peso molecular en 16 kDa. De manera que los pesos moleculares esperados para estas proteínas fueron los que se establecen en la Tabla M. 4.

Gen	Peso estimado* de la proteína	Peso estimado* con la fusión a tiorredoxina e histidinas
MSA-2b	31,61 kDa	47,61 kDa
MSA-2c	29,19 kDa	45,19 kDa

Tabla M. 4.: Peso molecular de las proteínas recombinantes obtenidas

*peso estimado: es el número de aa por el valor promedio de peso molecular para cada uno, que es de 110 dalton.

M. 9.3. Purificación de plásmidos

Una vez identificados los clones positivos para la expresión de las proteínas de interés, se llevó a cabo una amplificación y purificación de plásmidos para su posterior secuenciación y comprobación que las secuencias clonadas correspondían a los genes de interés. El procedimiento utilizado fue como se describió en el punto M. 6.1.1.

Los plásmidos fueron cuantificados y secuenciados como se describió anteriormente (puntos M.6.2 y M. 6.3.). Se comprobó, además de su secuencia, que el clonado estuviera en marco con el promotor y que la secuencia contuviera en su extremo 3' los codones correspondientes al parche de histidina.

M. 9.4. Purificación de proteínas recombinantes

Una vez comprobada la identidad de los clones recombinantes obtenidos y demostrada su eficiencia de expresión, se efectuaron cultivos de mayor volumen para proceder a la purificación de las proteínas de interés. El protocolo de purificación utilizado se describe a continuación: se crecieron 100 µl de células transformadas con el plásmido recombinante en 2 ml de LBA durante toda la noche. Este cultivo fue utilizado para inocular 100 ml de LBA en

un erlenmeyer de 500 ml, agitando a 37 °C durante 2 a 3 h. Se midió periódicamente en un espectrofotómetro la A_{600} hasta llegar a un valor de 0,4-0,6. Se separó una alícuota de 1 ml, que se dejó creciendo como control negativo de inducción, y al resto de cultivo se agregó el inductor arabinosa, en concentración final de 0,2 %. Luego de 3 h en agitación a 37 °C se separó 1 ml de cultivo para analizar por electroforesis junto con el control negativo de inducción. Ambas muestras fueron centrifugadas a 10000 xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de buffer de muestra. El resto del cultivo se centrifugó a 1000 xg durante 15 min. El precipitado fue resuspendido en 5 ml de *buffer* de lisis nativo ProBond™ (PNLB, formulado de la siguiente forma: 50 mM de K_2HPO_4 , 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glicerol, 0,5% (v/v) tritón X-100, 10 mM imidazol; pH 7,8). Se adicionó 1 mM PMSF y 1 mg/ml de lisozima. Se sonicó en hielo por dos períodos de 30 s en potencia 5, al cabo de los cuales se centrifugó a 10000 xg durante 20 min.

El sobrenadante se virtió en una columna de afinidad previamente equilibrada con PNLB, se mezcló la resina con la muestra y se incubó por 1 hora a 4° C con agitación. Al cabo de este período se recogió el percolado (wash-out), y se lavó la columna con 5 ml de PNLB. Se prepararon distintas concentraciones de imidazol (50, 200, y 800 mM) en volúmenes de 3 ml en el mismo *buffer*. Se extrajeron alícuotas del percolado y cada uno de los eluatos y se analizaron, junto con los controles positivos y negativo de inducción, por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) en geles de 10% de poliacrilamida (técnica desarrollada en el punto 10.5 de esta sección), seguido de tinción con Azul de Coomassie.

Se comprobó por medio de un Western blot (técnica explicada en el punto 11 de esta sección) que las proteínas purificadas reaccionaron con sueros de bovinos experimentalmente infectados con la cepa vacunal de *B. bovis* R1A, cedidos por el Dr. Ignacio Echaide (INTA-Rafaela). Como control negativo se utilizaron sueros de animales no infectados.

La cuantificación se realizó por SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie corriendo cantidades conocidas y comparando el tamaño de banda obtenida con el de diluciones seriadas al medio (0,125 mg/ml a 1 mg/ml) de un estándar proteico de albúmina bovina (BSA). Los valores aproximados obtenidos fueron de aproximadamente 1 mg total por 100 ml de cultivo de *E.coli* para MSA-2b y 2 mg para MSA-2c.

M. 9.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la separación de proteínas

Se utilizó el método descrito por Laemmli (1970). Brevemente, fueron empleados salvo indicación, geles al 10 %. Para su armado se utilizó el equipo de minigeles Miniprotein II y III de Bio-Rad. En primer lugar se montaron los vidrios bien lavados y secos según las indicaciones del fabricante. Luego se preparó el gel separador: para un volumen de 10 ml se utilizaron 4 ml de H₂O destilada, 3,3 ml de solución 30 % acrilamida:bisacrilamida (acrilamida 29 % y N,N'-metil bisacrilamida 1 %), 2,5 ml de *buffer* Tris 1,5 M pH 8,8, 0,1 ml de SDS 10%, 0,1 ml de Persulfato de Amonio (APS) y 4 μ l de TEMED (N, N,N'N'-tetrametiletilendiamina, Bio-Rad). Para 1 ml del gel concentrador se mezclaron 0,68 ml de H₂O destilada, 0,15 ml de solución 30% acrilamida-bisacrilamida, 0,13 ml de *buffer* Tris 1M pH 6,8, 0,01 ml de APS 10% y 10 μ l de TEMED. Luego de la polimerización, los geles montados fueron sumergidos en una cuba de electroforesis con *buffer* de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 250 mM, SDS 0,1%). Se sembraron las muestras resuspendidas en *buffer* de siembra 5X (50 % (v/v) glicerol, 0,4 % (v/v) β Mercaptoetanol, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,5% (p/v) Azul de Bromofenol, 10 % (p/v) SDS), sonicadas y hervidas durante 5 min, así como un marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) y luego se realizó la electroforesis con una fuente de poder a voltaje constante (100 V) por un tiempo aproximado de 1,5 h.

M. 10. Sueros de diferentes orígenes utilizados.

M. 10.1. Sueros murinos

Para los ensayos de obtención de antisueros contra **(i)** proteínas recombinantes de la familia MSA-2, **(ii)** merozoitos y **(iii)** péptidos, así como para la obtención del panel de monoclonales contra MSA2c se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c, SPF (Specific Pathogen-Free) de 2 meses de edad, salvo para el caso de obtención de líquido ascítico, para lo que se utilizaron ratones adultos de aproximadamente seis meses. Los mismos fueron obtenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

M. 10.1.1. Antiseros contra proteínas recombinantes y contra merozoitos de *B. bovis*:

Para la obtención de los antiseros contra formas recombinantes de MSA-2c y MSA-2b, como así también contra suspensión de mzo de *B. bovis*, se realizó la inoculación de 3 ratones machos con 25 µg de dichas proteínas formuladas en PBS/Adyuvante Incompleto de Freund (1:1), en forma intraperitoneal seguido de dos revacunaciones subcutáneas a los 14 y 28 días luego de la primo inmunización. La sangre fue recolectada por punción de la vena caudal de los ratones los días 0 y 42. El suero fue utilizado en estudios de inmunofluorescencia, neutralización y ELISA. En el caso de las preparaciones de merozoitos, estos correspondieron a la cepa R1A cultivados *in vitro*, y fueron purificados parcialmente por centrifugación diferencial. Para ello, se expuso el cultivo a 4 °C por 2 h, para evitar la reincorporación de merozoitos a los eritrocitos y de esa manera concentrarlos en el medio extracelular. La suspensión fue luego centrifugada a 300 xg por 10 min, a 4 °C, se separó el sobrenadante conteniendo los merozoitos del *pellet* que contiene los eritrocitos, y los mzo fueron precipitados por centrifugación a 3000 xg, 20 min, 4 °C. Se resuspendieron en PBS, se midió la concentración de proteína y se inocularon 25 µg de proteína por ratón formuladas en adyuvante completo de Freund (1:1) en forma intraperitoneal para la primera inmunización y adyuvante Incompleto de Freund por vía subcutánea para las dos posteriores.

M. 10.1.2. Sueros anti-péptido

Los antiseros murinos contra los distintos péptidos seleccionados se obtuvieron por inoculación de 10 ratones por grupo de péptidos y 5 ratones para el grupo control inmunizado solamente con PBS formulado con adyuvante. Los péptidos utilizados para estas inmunizaciones estaban acoplados a KLH, como se describe en el punto M. 8. Para las inmunizaciones primarias, los antígenos se formularon en Adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) y para las tres siguientes, en adyuvante Incompleto de Freund (IFA, Sigma). Los días, cantidades y vías se detallan en la Tabla 5. Los antígenos fueron formulados como una emulsión agua en aceite de igual volumen de péptido en solución acuosa y adyuvante oleoso, utilizando llaves de dos vías para llevarlas a cabo. El sangrado de los ratones para la obtención de sueros se realizó por punción de la vena caudal recolectándose la sangre en un tubo de centrifuga. Al separarse el suero del coágulo, el primero fue recolectado y almacenado a -20 °C hasta su uso.

Procedimiento	Tiempo Relativo a la inoculación	Descripción
Recolección de suero control e inmunización primaria	Día 0	Sangrado preimmune (100-250 µl suero). Inmunización primaria con, 100 µg Péptido en CFA, Intraperitoneal.
1 ^{ra} Revacunación	Día 14	Revacunación 50 µg en IFA, Subcutáneo.
2 ^{da} Revacunación	Día 35	Revacunación 50 µg en IFA, Subcutáneo
Sangrado testeo	Día 49	Sangrado (100-250 µl de suero)
3 ^{ra} Revacunación	Día 56	Revacunación 50 µg en IFA, Subcutáneo
Sangrado testeo y ELISA	Día 70	Sangrado (0,5 ml de suero/animal).

Tabla M. 5.: Inmunización de ratones con los diferentes péptidos seleccionados

M. 10.2. Sueros bovinos

M. 10.2.1. Sueros de campo

Los sueros de bovinos de campo utilizados fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Ignacio Echaide de la Estación Experimental de INTA en Rafaela, y pertenecieron a un muestreo total de 139 animales realizado en el Noroeste argentino (NOA) que es una zona endémica para garrapata y para *B. bovis*, de los cuales 94 muestras eran provenientes de la provincia de Salta y 45 de la provincia de Santiago del Estero. Por otra parte se utilizaron 85 muestras provenientes de un establecimiento de la zona sur de la provincia de Buenos Aires, libre de garrapatas, como controles negativos.

M. 10.2.2. Sueros provenientes de infecciones experimentales con *B. bovis*

Las muestras correspondientes a infecciones experimentales fueron provistas por el Dr. Ignacio Echaide, INTA-Rafaela. Cuatro bovinos serológicamente negativos para *B. bovis* fueron inoculados por vía subcutánea con una dosis única de parásitos R1A o S2P, de acuerdo a la Tabla M. 7. El inóculo consistió en parásitos provenientes de cultivos *in vitro* vehiculizados en PBS.

Animal	Cepa	Dosis (n° de parásitos)
3181	R1A	10 ⁷
S/C	R1A	10 ⁷
3083	S2P	10 ⁵
3142	S2P	10 ⁷

Tabla M. 7.: Dosis y cepas utilizadas en la inoculación experimental de bovinos serológicamente negativos con merozoitos de *Babesia bovis*

Se obtuvieron muestras de sangre a los días 0, 10, 15, 21, 28, 35, 42, 52, 59 y 66 post-infección, sin anticoagulante. Las mismas fueron incubadas durante 2 h a 37 °C para la formación del coágulo, luego de lo cual fueron centrifugados (1000 xg 15 min) y los sueros fueron separados y guardados a -20 °C hasta su uso.

M. 10.2.3. Sueros de bovinos inmunizados con antígenos recombinantes de *B. bovis*.

Los antisueros contra proteínas recombinantes procedieron de dos ensayos diferentes:

(i) **Inoculación con la proteína recombinante purificada MSA-2c:** para evaluar la presencia de epitopes B expuestos en la superficie celular y conservados entre dos aislamientos de *B. bovis* argentinos y su capacidad neutralizante, se utilizaron los sueros provenientes de un ensayo de inoculación experimental, en el que cinco bovinos de entre 8 y 12 meses de edad de la raza Holstein serológicamente negativos para *B. bovis* fueron inoculados con 30 µg de la forma recombinante de MSA-2c, purificada como se describió en el punto M. 9., formulada como una emulsión agua en aceite de iguales volúmenes de MSA-2c en PBS/ 1% Tween-20 concentración final y adyuvante oleoso mineral INTA formulado con 13% Arlacel C, 85% Markol 52 y 2% Tween-80, los días 0, 14 y 180. El suero se obtuvo de la sangre colectada de la vena yugular en los días 0, 14, 28, 77, 125, 195 y 420.

(ii) Inoculación experimental con mezcla de proteínas recombinantes purificadas: para poner a punto dos tests de ELISA indirectos basados en formas recombinantes de los antígenos MSA-2c y RAP-1 (punto R. IV.2.1 a R. IV.2.3), se utilizaron como sueros positivos conocidos, los sueros de un ensayo de vacunación experimental y desafío llevado a cabo en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis. Este ensayo estuvo compuesto por tres grupos de 10 bovinos serológicamente negativos para *B. bovis* que fueron tratados de la siguiente manera: a) inoculados con 10^7 parásitos de la cepa atenuada R1A de *B. bovis*; b) inoculados con un cóctel de 30 μg de cada una de las proteínas recombinantes purificadas MSA-2c, MSA-2b, Rap-1 (ésta última gentilmente cedida por la Dra. Marisa Farber del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar) formuladas 1:1 en adyuvante saponina activa (Quest, International, Holanda) y seguido de un *booster* de igual composición al día 43; c) sin vacunación. Todos los grupos fueron desafiados con 30×10^6 eritrocitos parasitados con la cepa R1A de *B. bovis* por vía subcutánea en el día 72 de la experiencia. Se tomaron muestras de suero por punción de la vena yugular al día 108 de la experiencia, que es el día 36 posterior al desafío. De esta manera se obtuvo un panel de 30 sueros positivos conocidos, dado que todos los bovinos recibieron una (grupos b y c) o dos (grupo a) inoculaciones con parásitos vivos de *B. bovis*.

M. 10.3. Sueros bubalinos

Se recolectaron muestras de sueros bubalinos que se utilizaron para la detección de anticuerpos contra MSA-2c de *B. bovis*, a través de un ELISA competitivo. La procedencia de las mismas fue la siguiente: 36 muestras correspondientes a animales de un establecimiento ubicado en la localidad de Lavalle, Provincia de Corrientes, 24 muestras procedentes de un establecimiento ubicado en Ituzaingó, Provincia de Corrientes, ambas zonas endémicas para *B. bovis*, 43 muestras de dos establecimientos ubicados en la localidad de Mercedes, Corrientes, siendo ésta última zona de erradicación para la enfermedad. Además se obtuvieron 31 muestras pertenecientes a búfalos establecidos en la Provincia de Buenos Aires, zona libre para la enfermedad.

M. 11. Detección inmunológica de proteínas: *Western Blot*

M. 11.1. Estudio de la reactividad de sueros murinos hacia la proteína MSA-2c

Con la finalidad de comprobar el reconocimiento de la proteína MSA-2c en un extracto crudo de merozitos de la cepa R1A de *B. bovis* por un suero de un ratón inmunizado con la forma recombinante de la misma, se realizó la técnica de SDS-PAGE-inmunoblot. Una vez

realizada la corrida electroforética de las proteínas como se describió en el punto 5.5 se desmontó el sistema de geles y las proteínas separadas en el minigel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.2 μm , WHATMAN® Schleicher & Schuell PROTRAN®) en un equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell.de BIO-RAD, durante 60 min a 20 voltios constantes utilizando *buffer* de transferencia (0,39 M glicina, 48 mM Tris base, 0,5 % p/v SDS, 20 % v/v metanol). La membrana fue luego incubada con suero murino anti-MSA-2c o suero normal de ratón, diluídos 1/50 en 5% leche descremada/PBST (PBS1X/0.1% Tween-20), durante una hora a 37 °C con agitación, seguido de tres lavados de 10 min cada uno con PBST, a 37 °C con agitación. Luego, la membrana fue incubada con el segundo anticuerpo anti-IgG murina, conjugado alternativamente de acuerdo al sistema de revelado utilizado a la enzima fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) o a la enzima peroxidasa (Acuate Chem.& Scient. Corporation), en las mismas condiciones del primer anticuerpo. Luego de otros 3 lavados como se describió anteriormente se procedió a revelar con el sistema colorimétrico NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma)-BCIP (5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato, Sigma) consistente en 33 mg/mL de NBT y 16,5 mg/mL de BCIP en *buffer* para fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) o bien 0,5 mg/ml de 4 Cl-naftol (Sigma) en 42 mM Tris-HCl, 0,1% H_2O_2 , pH 7,5, respectivamente. Se observó la aparición de bandas de color azul o marrón, respectivamente, y se calculó su peso molecular aproximado por comparación con un estandar proteico coloreado PageRuler™ Prestained Protein Ladder, incluido en una calle de cada gel a analizar.

M. 11.2. Estudio de la reactividad de sueros bovinos hacia la proteína MSA-2c

Con la finalidad de estudiar la reactividad de sueros bovinos de campo o de infecciones experimentales con *B. bovis* contra la forma recombinante de la proteína MSA-2c, se realizó el ensayo de SDS-PAGE seguido de inmunoblot. Para ello se procedió al armado de los geles y separación electroforética, como se describió en el punto 5, de una forma purificada de MSA-2c, así como preparaciones purificadas de RAP-1 y MSP-5 (cedida gentilmente por la Dra. Marisa Farber, IB, CICVyA, INTA), obtenidas en el mismo sistema y purificadas de igual manera (5 μg de cada una). RAP-1 se utilizó como control positivo, dado que es una proteína conservada e inmunodominante de *B. bovis*, mientras que MSP-5, de *Anaplasma marginale*, se utilizó como control negativo. Los sueros bovinos fueron diluidos 1:50 en PBST-5% leche y, como segundo anticuerpo, se utilizó antisuero de cabra anti-IgG bovina conjugado a la enzima fosfatasa alcalina o peroxidasa, como se explicó en el punto anterior,

de acuerdo al sistema utilizado para el revelado.

M. 12. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT)

M. 12.1. Fija

Esta técnica se utilizó para evaluar la reactividad de sueros murinos contra los antígenos de *B. bovis*. Las cepas de parásitos utilizadas en los frotis fueron la vacunal argentina R1A (para los experimentos llevados a cabo en el CICVyA, INTA-Castelar y EEA-INTA Rafaela) y las cepas mexicanas RAD, Veracruz y Chetumal (para los experimentos llevados a cabo en el Cenid-Pavet, INIFAP en Morelos, México). Para la preparación de los frotis, una suspensión de eritrocitos infectados con aproximadamente un 5 % de parasitemia, obtenidos ya sea de cultivos *in vitro* o de animales infectados, fue lavada 3 veces con PBS, y finalmente el paquete de eritrocitos fue resuspendido con un volumen igual de 1% BSA en PBS. Alícuotas de 7 µl fueron extendidas sobre portaobjetos comunes, limpiados previamente con acetona, los cuales se secaron exhaustivamente (en este punto se pueden congelar a -70 °C para su uso posterior). Alternativamente se utilizaron también portaobjetos del *kit* MicroProbe System (Fisher Scientific), que están cargados en su superficie, por lo cual se reducen significativamente las reacciones inespecíficas del fondo. Luego se fijaron con acetona y se marcaron con círculos o recuadros con tinta indeleble. Seguidamente se añadieron los distintos sueros problema de ratón diluidos 1:25 en PBS-1% BSA y se incubaron los frotis en cámara húmeda a 37 °C durante 45 min. Luego, se lavaron en caja de Coplin, con agitación, 2 veces de 10 min con PBS y una vez de 5 min con dH₂O, se secaron a temperatura ambiente durante unos min y se agregó el conjugado anti-IgG de ratón unido a fluoresceína (Sigma, Alexa Fluor 488 y Jackson Immuno Research) en la dilución de uso en PBS, y se incubó durante 45 min en cámara húmeda a 37 °C. Los frotis se lavaron y secaron en las mismas condiciones que antes y se procedió al montado del cubreobjetos con glicerol/PBS, pH 9,0 (1:2, v/v). Finalmente, se realizó la observación en microscopio de fluorescencia con los aumentos 500x y 1000x. Como controles, se utilizaron los anticuerpos monoclonales BAB75A4 (anti RAP-1), 152 kDa y Tryp-1 (reactivo contra una glicoproteína variable de la superficie de *Trypanosoma brucei*) y suero policlonal murino anti MSA-2c.

M. 12.2. Viva

El ensayo de inmunofluorescencia viva se llevó a cabo como se describió previamente (McElwain, T.F. *et al.*, 1987). La misma consistió en concentrar con gradiente de Percoll (Rodríguez, S.D. *et al.*, 1986) merozoitos purificados de las cepas R1A y S2P de *B. bovis* luego de lo cual fueron suspendidos en una solución de PBS conteniendo 0,5% (p/v) de BSA. Seguidamente los parásitos fueron peleteados por centrifugación a 2500 xg durante 6 min y resuspendidos en tubos conteniendo 100 µl de: a) suero bovino anti-rMSA-2c (caravana 885); b) suero normal bovino (control negativo); c) suero de un bovino inoculado con la cepa R1A de *B. bovis* (control positivo) y d) PBS/BSA para chequear la viabilidad utilizando 6-fluorescein diacetate (FDA, Sigma). Los tubos fueron incubados en hielo durante 30 min lavados 3 veces con PBS/BSA por centrifugación como en el paso anterior. Los anticuerpos que se unieron a los merozoitos fueron detectados incubando con el anticuerpo hecho en conejo anti-IgG bovina conjugada a isothiocyanato (Sigma) durante 30 min en hielo. Después de 3 lavados los merozoitos fueron resuspendidos en PBS y la presencia o no de inmunofluorescencia fue observada utilizando un microscopio de fluorescencia con aumento 1000x.

M. 13. Experimentos de seroneutralización.

Estos experimentos se llevaron a cabo para observar si los sueros anti-MSA-2c, anti-MSA-2b, anti mz y anti-péptidos neutralizaban la invasión de eritrocitos por merozoitos de *B. bovis*.

Para ello, en primer lugar se procedió a la preparación de los merozoitos libres, para lo cual se inició una expansión a partir de un cultivo *in vitro* de *B. bovis* para lograr un PPE \geq a 50 %, la cual se completó entre aproximadamente 5-7 días. Las botellas se colocaron aproximadamente 4 h a temperatura ambiente para lograr la salida de los merozoitos de los eritrocitos y esto se fue monitoreando con extendidos teñidos con Giemsa y observados al microscopio. Se colectó el contenido de las botellas de cultivo de la expansión en tubos de 50 ml estériles y se centrifugó a 1200 xg durante 10 min, a 5 °C, para sedimentar los eritrocitos. Las suspensiones sobrenadantes, conteniendo los merozoitos, se centrifugaron a 3000 xg durante 25 min a 5 °C. Los sedimentos se suspendieron en 1-2 ml de medio Base. Las suspensiones resultantes se depositaron en columnas de 10 ml de Percoll 50 % y se centrifugó a 26000 xg durante 30 min a 5 °C. Se separó la banda blanca grumosa del tercio inferior de la columna de Percoll, que contiene los mz y se lavó con solución VYM fría para eliminar el

Percoll. Luego se procedió al conteo de los mz en una cámara de Neubauer de acuerdo a la técnica clásica realizando una dilución previa 1/100 en medio básico, contándose sólo las células con movimiento. A continuación se suspendió la cantidad necesaria de mz para obtener 5×10^5 células por pocillo en 25 μ l de MB y se distribuyó esta suspensión en microplaca de 96 pocillos. Luego se agregaron 90 μ l de MB, conteniendo los sueros murinos (anti-péptidos, anti-MSA2c o MSA-2b recombinantes, suero anti mz y anti PBS-Ady) y bovinos (suero anti-MSA-2c recombinante y suero preinmune) a testear de acuerdo al caso en dilución 1/5, previamente deplementados por incubación en baño de 56 °C durante 30 min y filtrados con filtros de diámetro de poro de 0,22 micrones. Los experimentos se realizaron en paralelo por triplicado. Como control de invasión, se incubaron eritrocitos bovinos con mz sin agregado de suero alguno de ratón. Se incubaron las mezclas durante 30 min a 8 °C y luego se completó el volumen de cada pocillo para lograr una columna líquida con una altura de 5 mm (175 μ l por pocillo), con medio completo (conteniendo una concentración final de 5% de eritrocitos). Las placas se incubaron en atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C, durante 48 h para el caso de los sueros bovinos anti-rMSA2c y 96 h. para el caso de los sueros murinos anti-péptidos, con cambio de medio (130-35 μ l) cada 24 h. Al cabo de dicho tiempo se obtuvo el PPE (porcentaje de eritrocitos parasitados) de todos los pocillos a través de la observación microscópica de 2500 eritrocitos en extendidos coloreados con Giemsa. Todo el procedimiento se llevó a cabo en esterilidad.

M. 14. Evaluación de respuesta inmune celular

M. 14.1. Ensayo de linfoproliferación

Para realizar este ensayo se siguió el protocolo levemente modificado previamente descrito por Zamorano, P. *et al.* (1994). Para la obtención de los linfocitos murinos se procedió en primer lugar a sacrificar los ratones por sangrado “a blanco” por punción de la vena del seno retro orbital. Luego se los sumergió en un baño de etanol 70% durante 5 min. Se fijó el ratón sobre una plancha de corcho en posición decúbito lateral izquierdo. Se escindió la piel y luego el peritoneo, creando campos de operación amplios. Antes de escindir el peritoneo se hizo un barrido mecánico con alcohol para eliminar los pelos. Se utilizó material quirúrgico nuevo para cada plano. Se extrajo el bazo y se depositó en una placa de Petri de 5 cm de diámetro conteniendo 3 ml de medio RPMI-1640 (Sigma)-5% suero fetal bovino (Bioser), se quitó toda la grasa y se procedió al maceramiento entre dos portas esmerilados. Luego se colocó en tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1200 xg a 10 °C

(centrífuga Sorvall RTG000B), se descartó el sobrenadante y se lavó la suspensión celular 2 veces con 5 ml cada vez del mismo medio. Luego se resuspendieron las células en 1 ml de medio RPMI 1640 completo (RPMI-1640 (Sigma), 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Bioser), 2 mM Glutamina, 1mM Piruvato, 10 μ M aa no esenciales, 10 mM Hepes, 50 μ M β -Mercaptoetanol), y se procedió al recuento celular con Azul Tripán para comprobar también su viabilidad. Se realizaron las diluciones correspondientes de manera de obtener 250.000 células en 100 μ l, en cada pocillo de una placa de 96, y fueron estimuladas con los siguientes antígenos: medio de cultivo solo, 2 μ g del mitógeno concanavalina A, suspensión de merozoitos obtenidos por centrifugaciones consecutivas de eritrocitos infectados (4 μ g /pocillo). Las placas conteniendo los linfocitos se incubaron por 4 días a 37 °C y 5 % de CO₂. Veinte h antes de la cosecha de las células, se agregó 1 μ Ci [³H] timidina por pocillo. La captación de timidina obtenida en cada pocillo se midió como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo (LKB, Wallac, 1219 Rackbeta), y se calculó el Índice de Estimulación (I.E.), el cual se expresó como I.E.= cpm promedio con antígeno/ cpm promedio con medio (control negativo) para los distintos grupos. Se consideraron como muestras positivas aquellas que poseían un I.E. \geq 2,5.

M. 15. Anticuerpos Monoclonales

El protocolo utilizado para la producción de los mismos se basó en la técnica desarrollada en por Jerne, Köhler y Milstein, que les valió el Premio Nobel de Medicina en 1984. Brevemente, se inocularon ratones Balb/C machos (no expresan el Ag H-Y) de 2 meses de edad con 50 μ g por inóculo de proteína recombinante MSA-2c en un volumen de aprox. 0,2 ml, emulsionado en una mezcla 1:1 con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización, en forma subcutánea en varios puntos; y en una mezcla 1:1 en adyuvante incompleto de Freund para las inoculaciones siguientes al día 14 y 28 post primo inmunización. Al día 35 se realizó una sangría exploratoria de la vena caudal del animal. Se separó el suero, que fue titulado por ELISA indirecto utilizando MSA-2c recombinante como antígeno. Sólo se utilizaron para la fusión ratones cuyos sueros presentaron títulos a punto final superiores a 10⁴.

Una vez alcanzado dicho título se procedió a sacrificar los animales y extraer el bazo, para que sus células fueran fusionadas con las de mieloma (se utilizó la línea de plasmacitoma de ratón P3-X63/Ag8.653) deficiente en la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) implicada en la síntesis de purinas utilizando como fuente precursora a

la hipoxantina. La ausencia de la enzima no perjudica el crecimiento de estas células de mieloma ya que en ausencia de la enzima utilizan un camino metabólico alternativo para sintetizar purinas. Sin embargo, la presencia de aminopterina en el medio HAT anula la posibilidad de sobrevivir y hay una total dependencia del compuesto (HGPRT). A partir de este punto el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a técnicas convencionales, por el Dr. Osvaldo Zabal perteneciente al sector de Cultivos de Tejidos, Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar.

Una vez obtenidos los hibridomas crecidos en medio HAT (con hipoxantina, aminopterina y timidina) donde las células mielómicas son eliminadas y tan sólo las células producto de la fusión entre un linfocito y una célula de mieloma son capaces de crecer, se procedió al testeo de los sobrenadantes de los mismos a través de la técnica de ELISA utilizando MSA-2c como antígeno y la proteína no relacionada MSP-5 de *Anaplasma marginale* expresada en el mismo sistema que MSA-2c (cedida por la Dra. Marisa Farber, Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar).

De esta manera los clones cuyos anticuerpos reconocían a ambas proteínas eran eliminados, ya que se entendía que lo que se estaba detectando eran anticuerpos anti-tiorredoxina. Se obtuvieron varios clones positivos, que reconocían a MSA-2c recombinante, una vez comprobados los pocillos positivos se procedió al congelado de los mismos y también al clonado por dilución límite de manera de obtener una célula por pocillo. Se volvió a chequear el sobrenadante de dicha selección para comprobar que la célula de hibridoma seguía siendo reactiva. Luego se procedió a la expansión de dicha colonia y segundo clonado como el anterior. Se seleccionaron dos colonias positivas del segundo clonado por híbrido, se expandió hasta placas de 12 pocillos y se congelaron 5 viales de cada una. Se probó por ELISA cual de estos monoclonales inhibía más efectivamente el pegado de anticuerpos de bovinos positivos para *B. bovis* a MSA-2c recombinante y de ésta manera se seleccionó el anticuerpo monoclonal H9P2C2. En la etapa final, se procedió a la inducción del tumor ascítico en el ratón. Para ello se eligieron ratones machos adultos de la cepa Balb/c a los que se les inocularon 0,5 ml de Adyuvante incompleto de Freund intraperitonealmente. Veinticuatro h después se inocularon 1,5 millones de células de hibridoma crecidas en microplacas de 12 o 24 pocillos, vehiculizadas en PBS en forma intraperitoneal.

A partir de 10-15 días comenzó a desarrollarse la ascitis. El líquido ascítico se extrajo por punción de la cavidad abdominal con una aguja gruesa para evitar que se obstruyera. Por último, los anticuerpos monoclonales fueron purificados a partir del líquido ascítico con el *kit* comercial Affi-Gel® Protein A MAPS® II Kit (Bio-Rad), luego de lo cual fueron

aliquotados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

M. 16. Técnica de ELISA

M. 16.1. ELISA Indirecto contra Merozoitos

i) Sueros de bovinos

Este ensayo fue puesto a punto previamente por la Dra. Susana Torioni de Echaide de la EEA- Rafaela. La producción de antígeno que se realizó por sonicado de los merozoitos obtenidos por centrifugación diferencial de eritrocitos infectados al 30-50%, fue diluida en *buffer* carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃) y sembrada en placas de 96 pocillos Nunc-PoliSorp (Thermo Fisher Scientific) en un volumen de 100 µl por pocillo. Se incubaron durante la noche (16-18 h.) a temperatura ambiente (entre 25-28 °C) (sensibilización) y al día siguiente se descartó el antígeno y se bloqueó con el *buffer* carbonato/bicarbonato + 4% p/v de leche descremada durante 30 min en reposo. La placa fue lavada 3 veces con *buffer* fosfato salino (PBS) conteniendo 0,05% (v/v) Tween-20 (Promega) (PBS-T). Una vez finalizado el bloqueo se colocaron los sueros bovinos diluidos 1/80 en PBS-T-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Sigma)/EGTA (ácido etilenglicoltetraacético, Sigma) (0,02 M EDTA, 0,015 M EGTA, pH 6,3). Las placas se incubaron por 30 min a 37 °C con agitación y luego de 4 lavados como los descriptos anteriormente se agregó el anticuerpo monoclonal Mab M 23 anti bovino conjugado con la enzima peroxidasa (Anti-IgG1 bovino producido en el Animal Diseases Research Institute (ADRI, Canadá) diluido en PBS-T, en la dilución de uso estipulada previamente. Luego de una incubación de 30 min a 25-28 °C en agitación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se agregó la solución de revelado compuesta por 1mM de 2-2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico (ABTS, Sigma) y 0,015 % (conc. final) de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en *buffer* 0,05 M citrato de sodio/ácido cítrico, pH 4,5 (0,026 M Na₃C₆H₅O₇/ 0,024 M H₃C₆H₅O₇). El volumen final por pocillo para todos los pasos fue de 100 µl. Las absorbancias fueron medidas en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (Abs._{405nm}). La reacción se dejó progresar hasta que el valor de Abs._{405nm} del suero control positivo alcanzara valores entre 0,8 y 1,2 (entre 10 y 20 min). Los resultados se expresaron en porcentaje de positividad (%P) considerándose el control positivo fuerte el 100% de positividad (correspondiente al suero de un animal hiperinmune), el cual se toma como referencia para obtener el %P de los restantes sueros. El punto de corte se fijó en 30% (Echaide, I. *et al.*, 2004).

ii) Sueros de ratón

Se utilizó el ELISA anteriormente descrito, levemente modificado en cuanto a (i) la dilución de suero a testear, que se colocó en 1/50 y (ii) el conjugado anti-especie; para evaluar la presencia de anticuerpos que reaccionen con antígenos de mz en el suero de ratones inmunizados con los péptidos seleccionados. Los resultados se expresaron en %P considerándose el control positivo fuerte el 100% de positividad (correspondiente al suero de un animal hiperinmune inmunizado con extracto de merozoito como se desarrollo en el punto M. 10.1.1., el cual se toma como referencia para obtener el %P de los restantes sueros. El punto de corte se determinó en base al promedio de los sueros negativos (sueros preinmunes) más tres desvíos estándares (D.E.), que resultó en 60%.

M. 16.2. ELISA Indirecto contra MSA-2c y RAP-1.

Con el propósito de desarrollar una técnica diagnóstica utilizando proteínas recombinantes como antígeno, se diseñaron dos ELISAs indirectos basados en el reconocimiento por anticuerpos presentes en el suero de animales infectados con *B. bovis* de los antígenos inmunodominantes y conservados MSA-2c y RAP-1. Para ello, se utilizó una forma recombinante de RAP-1 (cedido gentilmente por la Dra. Marisa Farber) y de MSA-2c producida en cultivos de *E. coli* como se describe en el punto M. 6.2 y purificada como se describe en M. 9.

Para poner a punto estos ELISAs se estudiaron las siguientes variables: (i) tipo de bloqueante: 3 % Leche, 1 % Gelatina, 1 % Ova, 5 % Suero normal equino (Sne); (ii) preadsorción de los sueros: 0, 0,5; 1; 5; 10; 20 % de extracto bacteriano (iii) dilución del antígeno: diluciones seriadas al medio desde 1/100 a 1/3200 para MSA-2c y 1/200 a 1/6400 para RAP-1. Estas condiciones se describirán más extensamente en el punto R. IV.2.

En primer lugar se desarrolló un ELISA básico a partir del cual se fueron testeando las distintas variables. Este ELISA básico consistió en las siguientes condiciones: sensibilización, bloqueo, incubación del 1º anticuerpo, incubación del anticuerpo conjugado, revelado y lectura de la placa. Se hicieron distintas diluciones de suero y antígeno y se buscó la combinación óptima que diera la máxima relación de absorbancia entre el suero positivo y el negativo. Utilizando esta combinación óptima, se testearon las demás variables (ver sección R. IV.2.1 a R. IV.2.3.). Las condiciones finales elegidas fueron las siguientes:

Se pegaron a la placa de fondo plano Immulon 2HB (Dynatech Laboratories) las proteínas recombinantes purificadas MSA-2c o RAP-1 en la concentración de uso previamente titulada (8,5 ng/pocillo para MSA-2c y 8 ng/pocillo para RAP-1) en el *buffer* de pegada carbonato/bicarbonato en un volumen final de 50 µl por pocillo y se incubó toda la noche a 4 °C; luego se descartó el antígeno y se lavó 3 veces con PBS- 0,1 % Tween 20, se procedió después al paso de bloqueo incubando con 200 µl de PBS 0,1 % Tween 1% OVA durante una hora a 37 °C en un agitador orbital. Posteriormente se lavó 3 veces como en el paso anterior y se incubó con los sueros problema y control negativo y positivo en una dilución 1/100 (para evaluar las muestras de campo) o bien en diluciones seriadas al medio (para el caso de las muestras provenientes de infecciones experimentales) en *buffer* de bloqueo, durante 1 hora a 37 °C con agitación. Después de éste paso se procedió a lavar nuevamente 3 veces y se agregó el segundo anticuerpo anti especie conjugado a la enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano, HRP, horse radish peroxidase, Santa Cruz Biotechnology Inc) y se incubó nuevamente como en el paso anterior. Luego de esta incubación se lavó 5 veces con PBS 0,1% Tween 20 y se agregó la solución de revelado compuesta por 62,5 µl de H₂O₂ 3 % / 5 mg de orto-fenildiamina (OPD, Sigma) diluida en *buffer* citrato fosfato pH 5 (ácido cítrico 0,035 M, Na₂HPO₄ 0,067 M). Luego de 10 min, la reacción fue frenada por el agregado de H₂SO₄ 2,5 M y la absorbancia se midió a 490 nm (Abs._{490nm}). Los puntos de corte para evaluar las muestras de campo se determinaron en base a sueros positivos y negativos de procedencia conocida utilizando curvas ROC. Para la evaluación de los sueros provenientes de infecciones experimentales se calcularon los títulos como el logaritmo decimal de la inversa de la máxima dilución de suero para la cual la absorbancia duplicaba el valor obtenido al tiempo cero.

M. 16.2.1. PreadSORCIÓN de los sueros bovinos

Con el propósito de disminuir el pegado inespecífico de anticuerpos anti *E. coli* que pueden estar presentes en el suero bovino en el test de ELISA indirecto, se incubaron las muestras con la dilución óptima (establecida en el punto R. IV.2.2) de un extracto bacteriano obtenido como en el punto M. 6.2 y M. 9.4 que fue sólo transformado con el plásmido de expresión sin inserto. La incubación se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C con agitación, luego de lo cual se centrifugaron durante 15 min a 3000 xg y se utilizó el sobrenadante para incubar sobre las placas de ELISA sensibilizadas.

M. 16.3. Ensayo de ELISA para la determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal

El isotipo de inmunoglobulina del anticuerpo monoclonal H9P2C2 fue determinado por el siguiente ELISA indirecto: se pegó la proteína recombinante purificada MSA2c (8 µg por pocillo), en *buffer* de pegada carbonato/bicarbonato en placa Immulon 2HB (Dynatech) durante 16 h a 8 °C, luego se lavó 3 veces con PBS-T y se procedió a bloquear con 200 µl PBS-T 1% Gelatina (Sigma) durante 60 min a 37 °C para luego incubar con 50 µl de líquido ascítico conteniendo el mencionado monoclonal, en una dilución única durante 60 min a 37 °C con agitación. Seguidamente se lavó como en el paso anterior y se incubó con 50 µl de los siguientes anticuerpos hechos en cabra y conjugados a biotina (Caltag): anti inmunoglobulina G1, M, G2a, G2b y G3 de ratón, en una dilución de 1/2000 de acuerdo a los resultados de una titulación previa, en *buffer* de bloqueo durante 45 min a 37 °C. Luego de éste paso se lavó nuevamente 3 veces y se incubó con 50 µl de la dilución adecuada (1/2000) del conjugado “streptavidin-alkaline phosphatase” (KPL, Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.). Luego de 3 lavados se procedió al revelado por agregado de *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP, Sigma) leyéndose progresivamente a los 5, 10 y 15 min la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, eligiéndose el tiempo que dió mejores diferencias de color entre pocillos. Como controles positivos para los anti-isotipos se utilizaron como antígenos formas recombinantes de *Brucella abortus* bp26 y Bovine Herpes Virus-1 gD y sueros policlonales contra estos. El criterio de elección de isotipo fue de acuerdo a la presencia o ausencia de lectura a los distintos tiempos para cada uno de los isotipos.

M. 16.4 ELISA competitivo

Con el fin de desarrollar una técnica para evaluar la presencia de anticuerpos en sueros de diferentes especies y dada la posibilidad de contar con un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante MSA-2c, se desarrolló el siguiente ELISA competitivo.

Para poner a punto este ELISA se estudiaron las siguientes variables: (i) tipo de bloqueante: 1 % BSA y 1 % Gelatina; (ii) dilución del antígeno: 1/600, 1/1000, 1/1500 y 1/1800; (iii) dilución de Mab: 1/1000, 1/5000, 1/7500 y 1/10000; iv) dilución de suero bubalino: 1/20, 1/50, 1X. Estas condiciones se describirán más extensamente en los puntos R. IV. 4.3, R. IV. 4.5.1 y R. IV.4.5.2.

Brevemente, el mismo consistió en pegar a una placa de fondo plano Immulon 2HB (Dynatech Laboratories) una preparación purificada de MSA-2c (punto M. 9.) en la dilución

de uso correspondiente (8,5 ng por pocillo) en *buffer* de pegado carbonato/bicarbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,6) en un volumen final de 50 µl por pocillo. Luego de incubación toda la noche a 8 °C, se descartó el antígeno y se lavó 3 veces con PBS- 0,1 % Tween 20 (PBST). Seguidamente, se procedió a incubar los sueros en una dilución 1/20 en el mismo *buffer* de bloqueo PBST 1% gelatina durante una hora a 37 °C con agitación. A continuación se lavó nuevamente 3 veces como en el paso anterior y se incubó con el anticuerpo monoclonal hecho en ratón H9P2C2 diluido en *buffer* de bloqueo en la dilución de trabajo determinada y se incubó como el paso anterior. Se volvió a lavar y se incubó con el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a la enzima Peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc) diluido en *buffer* de bloqueo en la dilución adecuada y se incubó por una hora más a 37 °C con agitación. Al término de este paso se procedió a lavar 5 veces y revelar agregando solución de revelado compuesta por 62,5 µl de H₂O₂ 3 % / 5 mg de OPD diluida en *buffer* citrato fosfato, pH 5 (ácido cítrico 0,035 M, Na₂HPO₄ 0,067 M). La reacción se frenó por el agregado de H₂SO₄ 2,5 M y se midió la Abs._{490nm} en un lector de ELISA (Multiskan EX, Termo Labsystems). El volumen final por pocillo para toda la reacción fue de 50 µl. A la absorbancia del suero control positivo correspondiente a un animal hiperinmune se le asignó el valor de 100 % y los valores de los sueros incógnita se expresaron como porcentaje de inhibición (% I), el cual se calculó como $100 - [(Abs_{490nm} \text{ Suero a testear} \times 100) / \text{Promedio } Abs_{490nm} \text{ Sueros Negativos}]$. Como punto de corte para el caso de la evaluación de los sueros bubalinos se tomó el promedio de varios sueros negativos de procedencia conocida más tres desvíos estándares.

M. 17. Análisis estadísticos

Para evaluar el significado estadístico de las diferencias de los valores de parasitemias obtenidas en experimentos de neutralización, se utilizó el test “t” de Student. (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>).

La determinación del valor de corte del ELISA, la sensibilidad y especificidad diagnóstica fue realizada mediante el análisis estadístico de ROC (Receiver Operating Characteristic Computer Analysis Program) MedCalc 9.62 software.

Para el cálculo de la medida de concordancia entre los ELISAs indirectos contra MSA-2c y RAP-1 respecto del de merozoitos se utilizó el índice de concordancia kappa, cuyo cálculo puede hacerse desde el sitio <http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>.

R. Resultados

R. I. Resultados Capítulo I: MSA-2c de *B. bovis* es un candidato vacunal.

Al secuenciarse el locus completo de *msa-2* de la cepa mexicana Mo7 de *B. bovis* (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002), se encontró una secuencia en tandem de cuatro genes relacionados (ver punto I. 4.): *msa-2c*, *msa-2a₁*, *msa-2a₂* y *msa-2b*. *Msa-2c* resultó ser el gen más divergente de esta familia y también el más conservado, al comparar las secuencias encontradas en Mo7 con las de la cepa vacunal argentina R1A (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002). Debido a éste alto grado de conservación, decidimos averiguar si MSA-2c podía representar un candidato vacunal. Con éste objetivo, se analizó si MSA-2c presenta epitopes B conservados entre aislamientos y si algunos de esos epitopes son sensibles a la neutralización. Para ello, se produjo una forma recombinante de MSA-2c, se obtuvieron sueros murinos contra ella y se probó si estos sueros reconocen extractos proteicos y membranas superficiales de merozoitos de distintas cepas de *B. bovis*. Estos pasos serán descritos a continuación.

R. I.1. Producción de la forma recombinante de MSA-2c de la cepa R1A de *B. bovis*.**R. I.1.1. Amplificación del gen de interés por PCR.**

A partir de ADN de la cepa vacunal argentina R1A de *B. bovis*, se amplificó por PCR el marco abierto de lectura (ORF) del gen *msa-2c* utilizando los oligonucleótidos específicos, para su posterior clonado en un vector de expresión, como se menciona en las secciones M. 4 y M. 6.2. respectivamente de Materiales y Métodos.

La amplificación fue confirmada en una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa, como puede verse en la Figura R. 1.

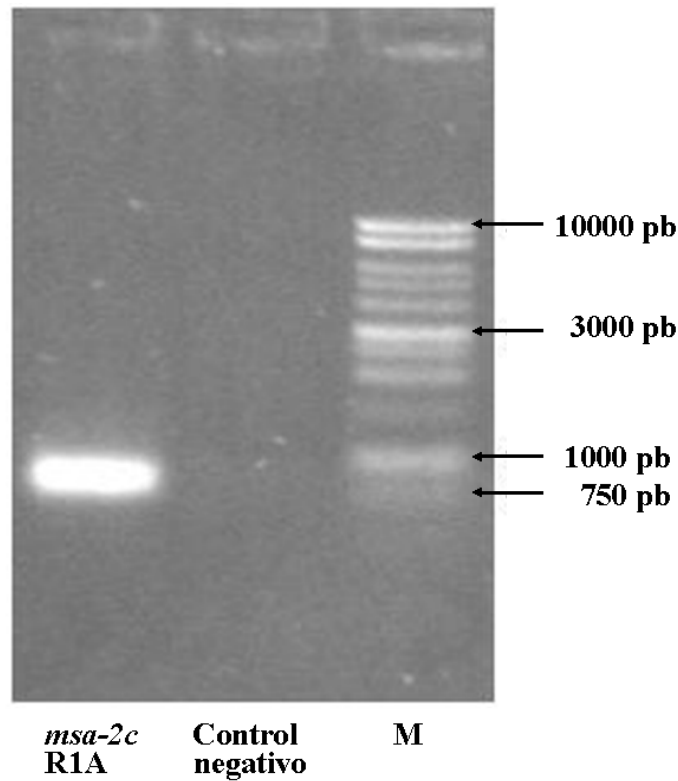


Figura R. 1.: Gel de agarosa que muestra el fraccionamiento electroforético del producto de amplificación del gen *msa-2c* (862 pb), con su respectivo control negativo sin ADN y el marcador molecular de tamaño de ADN (M).

El producto de amplificación se clonó para su expresión en un sistema procariota, utilizando el vector comercial pBAD/TOPO[®] ThioFusion[™], con el cual se obtiene la proteína o péptido de interés fusionado a la proteína Tiorredoxina.

Los pasos seguidos para la ligación de los fragmentos de ADN en el vector y la transformación de las células fueron los descritos en el punto M. 6.2.

R. I.1.2. Selección de clones positivos

Para seleccionar los clones que contienen la secuencia de los genes de interés en la dirección correcta se procedió a efectuar una reacción de *colony*-PCR, como se desarrolló en el punto M. 6.1.

La Figura R. 2. muestra el paneo de colonias transformadas con el gen *msa-2c*, donde se observa una amplificación positiva para 5 clones de un total de 11 (clones 2, 4, 5, 8 y 9).

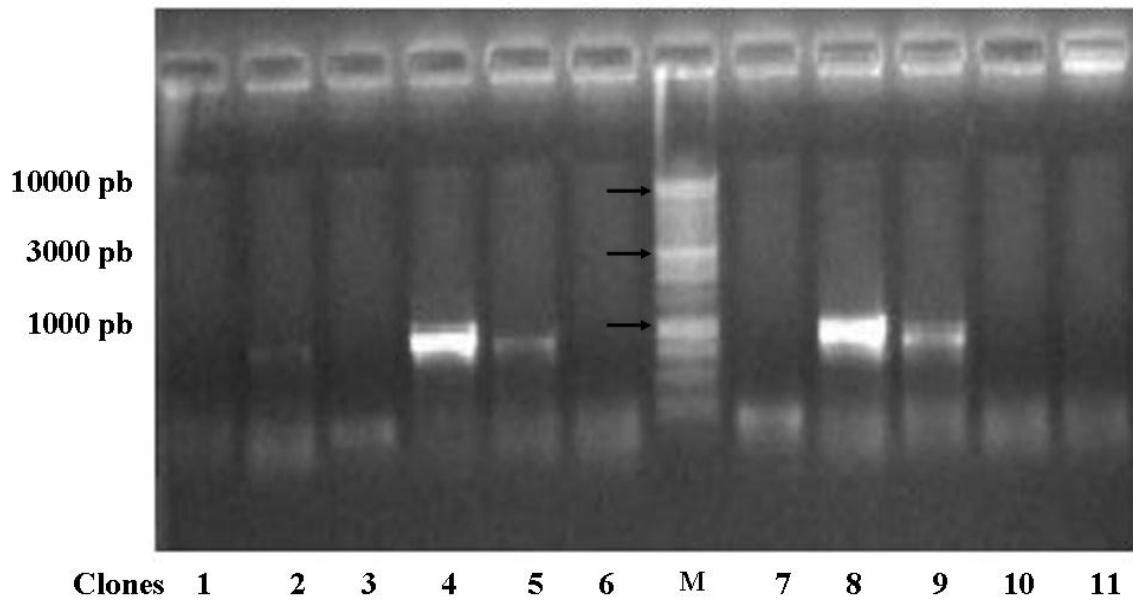


Figura R. 2.: *Colony* PCR: gel de agarosa con el fraccionamiento electroforético del producto de amplificación de 11 de los clones crecidos a partir de la transformación con el gen *msa-2c*. M: marcador de tamaño molecular de ADN (1Kb).

R. I.1.3. Inducción de la expresión en los clones seleccionados

Para analizar el nivel de expresión de la proteína recombinante en cada uno de los clones se procedió a la inducción con arabinosa de las mismas como se desarrolló en el punto M. 9.2.

La comparación del patrón electroforético de proteínas presentes en los extractos de los cultivos con y sin inducción permitió establecer aquellos clones con mayores niveles de inducción de las proteínas de interés. La figura R. 3. muestra la inducción positiva de una de las colonias transformadas con *msa-2c*.

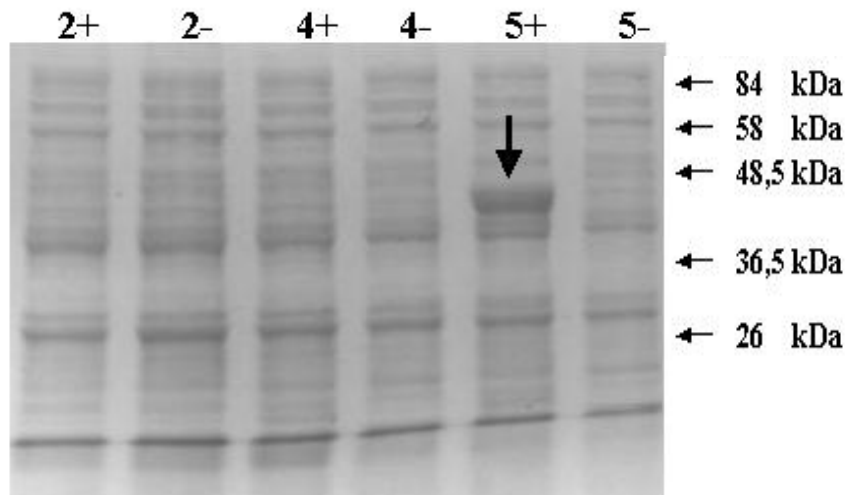


Figura R. 3.: Gel de poliacrilamida con los extractos celulares de las colonias transformadas 2, 4 y 5 con (+) y sin (-) inducción con arabinosa. La flecha muestra una banda que concuerda con el peso molecular predicho para la proteína MSA-2c.

El peso molecular esperado de MSA-2c de R1A es de 29,19 kDa. A esto debe sumársele el peso adicional aportado por la tiorredoxina del extremo amino-terminal (13 kDa) y por las 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal (3 kDa), obteniéndose un peso molecular esperado para la proteína recombinante de 45,19 kDa.

R. I.1.4. Purificación de proteínas recombinantes

Una vez identificados los clones positivos para la expresión de la proteína de interés, se llevó a cabo una amplificación y purificación de plásmidos para su posterior secuenciación.

Comprobada la identidad de los clones recombinantes obtenidos y demostrada su eficiencia de expresión, se efectuaron cultivos de mayor volumen para proceder a la purificación de las proteínas de interés. El protocolo de purificación utilizado se describió en el punto M. 9.4. Se obtuvieron alícuotas del percolado y cada uno de los eluatos y se analizó, junto con los controles positivos y negativo de inducción, por SDS-PAGE en gels de 10% de acrilamida, seguido de tinción con Coomassie blue.

La Figura R. 4. muestra la purificación en columna de afinidad.

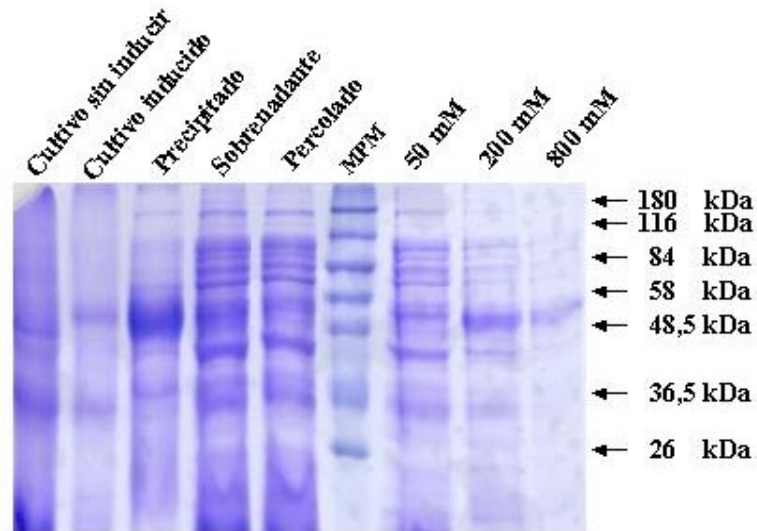


Figura R. 4.: Gel de poliacrilamida mostrando el producto de cada uno de los pasos de la purificación de la proteína MSA-2c. Se observa en este caso una mejor elución con una concentración de 200mM de imidazol.

R. I.2. Anticuerpos murinos contra MSA-2c derivada de R1A reconocen proteínas del merozoito de las cepas R1A y la australiana "S" de *B. bovis*.

Para determinar, en primer lugar si la forma nativa de la proteína MSA-2c es reconocida por sueros inmunes contra la forma recombinante de dicha proteína, se testeó en el ensayo de Western blot la reactividad de los anticuerpos presentes en sueros murinos inmunizados con la forma recombinante de MSA-2c (rMSA-2c) de la cepa R1A de *B. bovis*, con lisados de merozoitos de la misma cepa, como podemos observar en la línea 2 de la figura R. 5. El suero anti-rMSA-2c reaccionó específicamente con una única banda de aproximadamente 30 kDa en el lisado de merozoitos mientras que ninguna banda se observó con el suero control (datos no mostrados). A modo de control se corrió un lisado de eritrocitos bovinos normales contra el que no se observó reacción con el suero inmune murino (Figura R. 5., línea 1) ni con el suero control (no mostrado). La medida de la banda de 30 kDa es consistente con el peso molecular esperado para la forma nativa de la proteína MSA-2c putativa, la cual es la más pequeña de los miembros de la familia MSA-2 identificado en las cepas argentina R1A y mexicana Mo7. (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002).

Estos resultados indican que la proteína MSA-2c se expresa en los merozoitos de la cepa argentina R1A. Por otra parte, los anticuerpos presentes en el suero murino anti-rMSA-

2c de la cepa R1A reconocen una proteína de 30 kDa en el lisado de merozoitos de la cepa australiana “S”, lo cual puede observarse en la línea 3 de la figura R. 5.

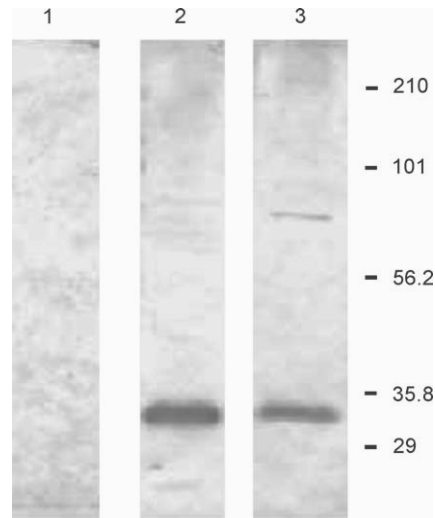


Figura R. 5.: Anticuerpos murinos anti rMSA-2c reconocen una única proteína en merozoitos de *B. bovis* de la cepa argentina R1A y australiana “S”. Las membranas de eritrocitos no infectados (línea 1) y extracto de membranas de merozoitos (3 μ g de proteína) de la cepa R1A (línea 2) y “S” (línea 3) de *B. bovis* fueron separadas por SDS-PAGE y testeados en Western Blot contra suero murino anti rMSA-2c, utilizándose conjugado anti-IgG–HRP para la detección. El suero anti-rMSA-2c reacciona específicamente con una banda única de aproximadamente 30 kDa en ambas preparaciones de merozoitos. A la derecha se muestra las medidas del marcador de peso molecular en kDa.

Por otra parte, el suero murino enfrentado contra la porción carboxilo Terminal de la proteína RAP-1 reaccionó con una banda correspondiente a una proteína de 60 kDa tanto en la cepa R1A como en la cepa “S” (no mostrado), lo cual es consistente con la conservación de los epitopes B de RAP-1 entre las cepas estudiadas (Suárez, C.E. *et al.*, 1994; Palmer, G.H. *et al.*, 1991; Suárez, C.E. *et al.*, 1991), mientras que el suero normal de ratón y el suero contra la proteína rMSP-5 de *A. marginale*, que fueron utilizados como controles negativos, no reaccionaron con estas preparaciones (datos no mostrados).

Por lo tanto, estos resultados son los primeros en demostrar que una proteína similar a MSA-2c se expresa en la cepa australiana “S” y que esta proteína comparte epitopes B con MSA-2c de la cepa R1A.

El análisis de la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína MSA-2c perteneciente a la cepa argentina R1A es la de una proteína anclada a membrana (Florín-Christensen, M *et al.*, 2002), al igual que se describió previamente para otros miembros de la familia VMSA (Hines, S.A. *et al.*, 1992; Jasmer, D.P. *et al.*, 1992).

Las regiones correspondientes a los extremos N y C terminales (correspondientes a los residuos 1–21 y 245–265 respectivamente) se predicen como altamente hidrofóbicos, mientras que el área comprendida entre los aa 22 y 245 es mayormente hidrofílica (ver capítulo R. II.2.1). Las regiones hidrofóbicas en los extremos amino y carboxilo Terminal corresponden al péptido señal y a la señal de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI), respectivamente. Se ha predicho que estas secuencias no se encuentran en la proteína madura, como se discutirá más adelante (capítulo R. II.2.1.).

La localización de MSA-2c en la superficie de la membrana fue confirmada por inmunofluorescencia utilizando suero murino anti-MSA-2c de la cepa R1A sobre merozoitos de la misma cepa fijados en los portaobjetos, como puede observarse en la figura R. 6.

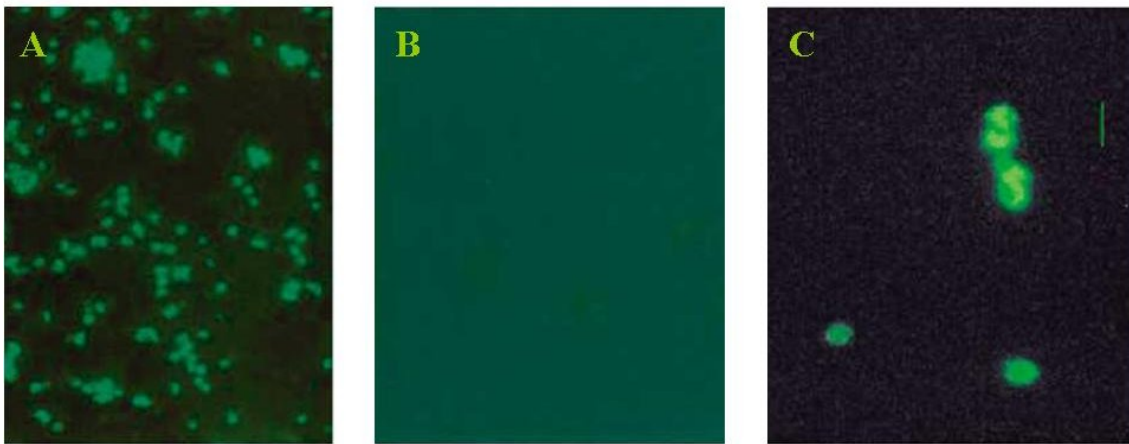


Figura R. 6.: MSA-2c se localiza en la superficie del merozoito y contiene epitopes B conservados expuestos en la superficie. El test de inmunofluorescencia muestra la reactividad de los anticuerpos anti-rMSA-2c hacia la superficie de merozoitos purificados (A), y la ausencia de reactividad del suero normal de ratón utilizado como control (B) (aumento 1000X). Los epitopes B expuestos en la superficie de MSA-2c son compartidos entre dos cepas diferentes de *B. bovis* ya que en el ensayo de inmunofluorescencia viva realizado sobre una suspensión de merozoitos de S2P hay reacción positiva utilizando suero bovino anti-rMSA-2c (caravana 885) (C) (Aumento 1000X).

Como muestra la figura R. 6. la fluorescencia se distribuyó uniformemente sobre la superficie de los merozoitos de la cepa argentina R1A, indicando la presencia de epitopes B expuestos en la superficie de MSA-2c. Como la cepa R1A no es una cepa clonada sino un aislamiento de campo atenuado y mantenido en cultivo, éste resultado sugiere que la expresión de epitopes B de MSA-2c en la superficie de la membrana del merozoito se produce en todos los individuos de las poblaciones de *B. bovis* presentes en R1A. Como control positivo de la reacción se enfrentaron los portaobjetos con el anticuerpo monoclonal MAAb

BABB75A4 que reacciona con los epitopes B de RAP-1 (Suárez, C.E. *et al*, 1994; Goff, W.L., *et al*, 1988) observándose el típico punteado correspondiente al complejo apical de los merozoitos, mientras que la incubación con suero de ratón normal (Figura R. 6. B) o con monoclonal no relacionado Mab Tryp-1 no mostró reacción. (datos no mostrados).

Asimismo, se observó que el suero contra rMSA-2c de R1A reaccionó por inmunofluorescencia con merozoitos de la cepa mexicana RAD (ver Figura R. 20 C)

Con el objeto de determinar la presencia de epitopes B expuestos en la superficie celular y conservados entre dos aislamientos de *B. bovis* argentinos, se realizó un experimento de inmunofluorescencia viva utilizando suero bovino anti-rMSA2c de la cepa R1A sobre una suspensión de merozoitos de la misma cepa (no mostrado) y una suspensión de merozoitos de la cepa heteróloga S2P de *B. bovis*, como se observa en la figura R. 6. C. Como se muestra claramente en esta figura, la inmunofluorescencia está homogéneamente distribuida en toda la superficie del merozoito. El mismo resultado se obtuvo con las suspensiones de la cepa R1A, mientras que no se observó reacción cuando se utilizó suero normal de bovino (no mostrado).

Además de confirmar sin ambigüedades la localización en la superficie y distribución de MSA-2c, estos resultados indican la conservación de los epitopes B expuestos en MSA-2c entre estas dos cepas diferentes.

R. I.3. La proteína MSA-2c posee epitopes B sensibles a la neutralización.

La localización celular y el alto grado de conservación entre cepas sugiere que MSA-2c puede jugar importantes roles funcionales en la interacción entre los merozoitos de *B. bovis* y los eritrocitos bovinos.

Para comenzar a investigar el rol de la proteína MSA-2c, se testeó si la inmunización con la forma recombinante de la misma podía inducir la generación de anticuerpos que bloquearan la invasión *in vitro* de los eritrocitos por los merozoitos de la cepa R1A. Como se muestra en la Figura R. 7. los merozoitos que fueron incubados durante 30 minutos con un pool de sueros bovinos anti-rMSA-2c fueron significativamente ($P < 0,001$) incapaces de invadir o reproducirse en los eritrocitos, comparados con los parásitos incubados en idénticas condiciones con suero control preinmune.

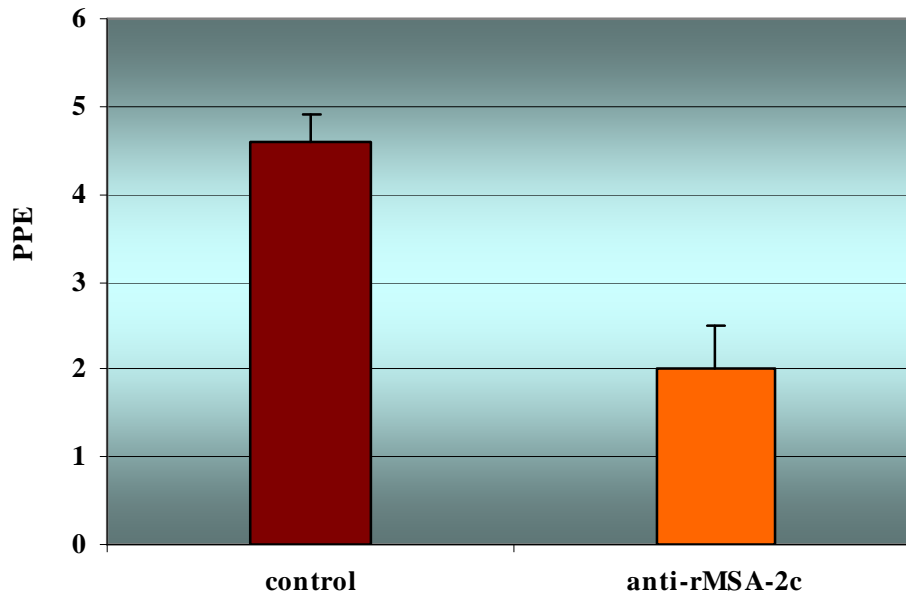


Figura R. 7.: MSA-2c contiene epitopes B sensibles a la neutralización. Ensayo de neutralización *in vitro* de la invasión de merozoitos de la cepa R1A de *B. bovis*. La barras indican el PPE medido a las 48 h luego de tratar los merozoitos con pools de suero bovino preinmune (control) o suero anti-rMSA-2c correspondiente a 28 días post inoculación. Los resultados representan las medias más el desvío estándar (S.D.) de 3 experimentos paralelos.

Estos resultados muestran que MSA-2c contiene epitopes B sensibles a la neutralización, y de esta forma sugiere que este antígeno estaría jugando un rol relevante para el parásito en cuanto a la invasión de los eritrocitos.

R. II. Resultados capítulo II: Estudio del polimorfismo de genes de la familia VMSA en distintas cepas de *B. bovis*.

En el capítulo anterior, se mostró que uno de los miembros del grupo MSA-2, el antígeno MSA-2c, contiene epitopes B conservados entre aislamientos geográficos y asimismo, epitopes B sensibles a la neutralización. Por otra parte, como se mencionó anteriormente (sección I. 4.), el nivel de conservación encontrado en las secuencias predichas de MSA-2a y b de las cepas mexicana y argentina Mo7 y R1A fue de moderado a alto. Por este motivo, se decidió buscar epitopes B conservados en los distintos antígenos MSA-2. Para ello, se realizó un análisis *in silico* de los productos de los alelos de *msa-2a*, *msa-2b* y *msa-2c* de una serie de aislamientos y cepas de *B. bovis* de Estados Unidos, México y Argentina, para buscar en primer lugar regiones conservadas entre todas las secuencias y en segundo lugar, epitopes B predichos en esas zonas conservadas. En este capítulo, se describirán los pasos seguidos.

R. II.1. Comparación de secuencias de MSA-2 de distintos aislamientos y cepas de *B. bovis*.

R. II.1.1. Obtención de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de 4 muestras de cultivos *in vitro* de *B. bovis* (S2P, R1A, RAD, T2Bo) y 6 muestras de sangre de bovinos infectados con este parásito de distintas regiones geográficas (M3P, M1A, M2P, Pullman, Veracruz, Tabasco), como se describe en la sección M. 3.

Se sembraron alícuotas de los ADN extraídos en un gel de agarosa al 0,8 % para comprobar que la extracción había sido satisfactoria. La Figura R. 8. muestra un ejemplo de este tipo de geles.

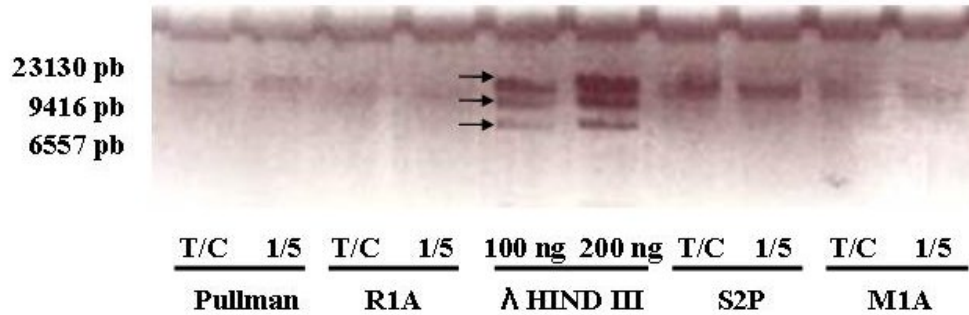


Figura R. 8: Electroforesis horizontal de muestras de ADN de *B. bovis*. Se corrieron electroforéticamente 2 μ l de ADN de los siguientes aislamientos de *B. bovis*: Pullman, R1A, S2P y M1A en dos concentraciones diferentes: 1x (T/C) y diluida 1/5 en un gel de 0,8% agarosa teñido con bromuro de etidio. Como marcador de tamaño, y referente de masa se sembraron 100 y 200 ng de ADN del fago Lambda digerido enzimáticamente con la enzima Hind III. La primera banda de este marcador corresponde a 23120 pares de bases (pb) y al 48% del ADN total, la segunda banda corresponde a 9416 pb y 19% del ADN total y la tercera corresponde a 6557 pb, siendo el 14 % del ADN total sembrado.

Asimismo, se analizó la calidad del ADN por comparación de las mediciones espectrofotométricas de las Abs_{260} y Abs_{280} . Se obtuvo ADN de calidad aceptable con un índice mayor a 1,7 de las 5 cepas Argentinas R1A, M2P, M3P, M1A y S2P y las 4 cepas Mexicanas disponibles Veracruz, Tabasco, RAD y Pullman.

R. II.1.2. Amplificación de los genes de la familia MSA-2

A partir de estas muestras de ADN, se realizó la amplificación de los genes de la familia MSA-2 por la técnica de PCR según el protocolo descrito (punto M. 4.), utilizándose un par de oligonucleótidos para *msa-2c* y otro para amplificar juntos los genes *msa-2a1*, *a2* y *b*. Se logró obtener la amplificación del gen *msa-2c* para las cepas argentinas R1A, M2P, M3P, M1A, S2P y las cepas mexicanas RAD, Pullman, Tabasco, Veracruz y americana T2Bo y los genes *msa-2a1* y *b* de las cepas R1A, M2P, M3P, M1A, S2P, Tabasco, RAD y Veracruz. La figura R. 9. muestra a modo de ejemplo estas amplificaciones en las cepas argentinas M1A y S2P.

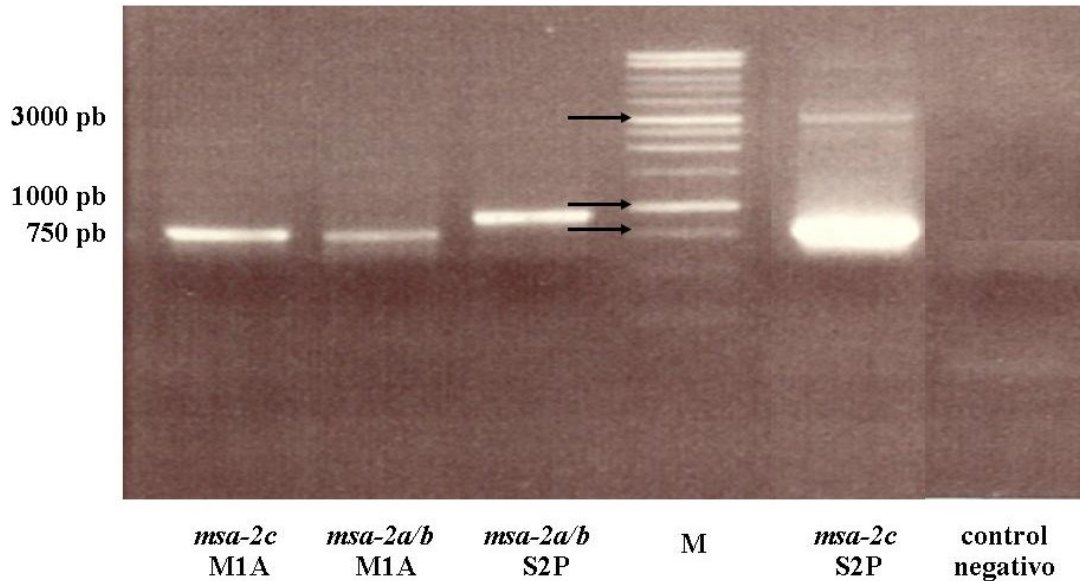


Figura R. 9.: Observación de los productos de amplificación de la familia MSA-2. Se separaron por electroforesis horizontal en un gel de 1,5% agarosa teñido con bromuro de etidio 5 μ l del producto de amplificación de los genes *msa-2c* y *msa-2a/b* de las cepas M1A y S2P como así también un control negativo sin ADN templado. M: marcador molecular de tamaño de ADN (1Kb).

Una vez obtenidos los productos amplificados y habiéndose procedido a la ligación en el vector de secuenciación pCR[®]2.1-TOPO[®] y transformación de la células competentes como se desarrolló en el punto M. 6.1., se procedió a la obtención del ADN plasmídico, y una vez chequeada la presencia del inserto por *colony* PCR con los mismos oligonucleótidos específicos utilizados inicialmente, se procedió a la secuenciación de entre 1 y 4 clones para cada ligación seleccionados al azar. Luego se predijeron las secuencias de aa y las secuencias obtenidas para cada proteína (MSA-2a₁, MSA-2b y MSA-2c) fueron alineadas para estudiar el grado de polimorfismo entre diversos aislamientos.

En el caso de las secuencias predichas de MSA-2 a y b, dado que los genes correspondientes amplifican juntos con el mismo par de oligonucleótidos, cada secuencia fue alineada con las secuencias de MSA-2a₁, y b de la cepa Mo7, depositadas en el GenBank, y se calcularon los porcentajes de identidad para su clasificación. Todas aquellas que presentaron un porcentaje de identidad mayor al 74% ya sea con MSA-2a₁ o con MSA-2b de Mo7, se clasificaron como tales. En un clon del aislamiento M3P, los porcentajes de identidad tanto con respecto a MSA-2a₁ como a MSA-2b fueron de 60,9 y 57,2 %, por lo cual fue clasificado como MSA-2a/b.

En el caso de secuencias que no habían sido descriptas previamente, fueron depositadas en el GenBank. La Tabla R. 1. muestra los porcentajes de identidad obtenidos con respecto a MSA-2 a₁ y MSA-2b de la cepa biológicamente clonada Mo7 para cada una de las secuencias utilizadas en este trabajo.

Cepa o aislamiento	Clon	Número de acceso	% Identidad respecto de Mo7		Longitud (aa)	Identificación
			MSA-2a1	MSA-2b		
Mo7	-	AY052538(a)	100	-	316	MSA-2a1
	-		-	100	287	MSA-2b
T2Bo	-	DQ173959(a)	99,7	-	316	MSA-2a1
	-	DQ173961(a)	-	94,1	287	MSA-2b
R1A	1	AAL15425(b)	82	59,2	311	MSA-2a1
	2	AAL15427(b)	62,1	78,9	287	MSA-2b
M3P	1	FJ480189(c)	60,9	57,2	280	MSA-2a/b
	2	FJ422808(c)	79,5	57,8	311	MSA-2a1
M2P	1	FJ422806(c)	78,9	59,2	311	MSA-2a1
	2	FJ422805(c)	58,5	75,4	262	MSA-2b
S2P	-	FJ422807(c)	81,1	59,1	311	MSA-2a1
M1A	-	FJ422804(c)	57,7	74	265	MSA-2b
RAD	1	FJ422801(c)	69,7	85,7	287	MSA-2b1
	2	FJ422802(c)	56,8	100	287	MSA-2b2
Tabasco	-	FJ422803(c)	58,5	75,4	262	MSA-2b
Veracruz	-	FJ422809(c)	78,2	61,7	298	MSA-2a1

Tabla R. 1.: Clasificación de variantes de MSA-2a y b de distintos aislamientos geográficos. Se muestran los porcentajes de identidad (% I) en los alelos de las msa-2 comparados con los genes *msa-2a1* y *b* de la cepa clonada Mo7, calculados utilizando la matriz BLOSUM 62 con una penalidad para el gap de 10 y una penalidad para la extensión de gap de 0,5.

- (a) Las secuencias de Mo7 y T2Bo fueron obtenidas del GenBank.
- (b) Genes que fueron secuenciados y cuya secuencia coincidió con otra depositada en el GenBank
- (c) Secuencias obtenidas en el presente trabajo de tesis y depositadas en el GenBank.

Por otra parte, en el caso del gen *msa-2c* y la secuencia predicha de aa, se secuenció un solo clon correspondiente a cada aislamiento y los números de acceso depositados en el GenBank se describen en la Tabla R. 2.

Cepa o Aislamiento	Número de acceso
R1A	AAL15428(b)
Mo7	AY052538(a)
T2Bo	DQ173974(b)
S2P	FJ422796(c)
M2P	FJ411372(c)
M3P	FJ422794(c)
M1A	FJ422795(c)
RAD	FJ422799(c)
Pullman	FJ422797(c)
Tabasco	FJ422798(c)
Veracruz	FJ422800(c)

Tabla R. 2.: Número de acceso de las secuencias depositadas en el GenBank correspondientes a las distintas cepas o aislamientos del gen *msa-2c* de *B. bovis*.

- (a) La secuencia de Mo7 fue obtenida del GenBank.
- (b) Genes que fueron secuenciados y cuya secuencia coincidió con otra depositada en el GenBank.
- (c) Secuencias obtenidas en el presente trabajo de tesis y depositadas en el GenBank.

R. II.2. Análisis bioinformático de las secuencias**R. II.2.1. Análisis de las secuencias de MSA-2c de distintos aislamientos:**

Se realizó el alineamiento global de todas las secuencias de aa predichas, obtenidas para MSA-2c, tomadas de a pares, utilizando una matriz BLOSUM 64 (Blocks Substitution Matrix) obteniéndose los porcentajes de identidad que se vuelcan en la tabla R. 3.

% Identidad	Long (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1- Mo7	265	100										
2- R1A	265	92,5	100									
3- S2P	265	93,6	90,2	100								
4- M2P	265	94	90,6	98,5	100							
5- M3P	265	93,6	90,2	99,2	98,5	100						
6- M1A	265	94	90,6	98,5	100	98,5	100					
7- RAD	265	97,7	94	91,3	91,7	91,3	91,7	100				
8- Pullman	265	99,2	91,7	92,8	93,2	92,8	93,2	97	100			
9- Tabasco	265	87,9	86	85,7	86,4	85,7	86,4	87,9	87,2	100		
10- Veracruz	265	96,6	93,6	90,2	90,6	90,2	90,6	98,9	95,8	87,9	100	
11- T2Bo	265	98,9	91,7	92,8	93,2	92,8	93,2	96,6	98,1	87,2	95,5	100

Tabla R. 3: Matriz de similitud de secuencias de aa predichas de MSA-2c. Los porcentajes de identidad entre las distintas cepas de la secuencia completa fue calculada utilizando la matriz BLOSUM 62 con una penalidad para el gap de 10 y una penalidad para la extensión del gap de 0,5.

Los porcentajes de identidad entre variantes de MSA-2c de distintos aislamientos geográficos oscilaron entre 85,7 y 99,2 %, mostrando un alto grado de conservación. Todas las secuencias obtenidas por secuenciación o depositadas con anterioridad en el GenBank presentaron el mismo número de aa, siendo éste de 265.

El alineamiento de las secuencias predichas de aa de MSA-2c, utilizando el programa CLUSTALW2 para el alineamiento múltiple de secuencias, que se encuentra disponible en el sitio del European Bioinformatics Institute, seguido de la visualización de aa conservados, polimórficos y sustituciones conservadas, utilizando Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) se observa en la figura R. 10. Asimismo, se determinó la estructura secundaria de cada secuencia predicha de aa por el programa CLC Combined Workbench 3 (Figura R. 11.) y se analizó si las sustituciones encontradas modificaban esta estructura. Se observó que la estructura secundaria esta formada principalmente por una sucesión de 7 α hélices, como se verá en detalle más adelante.

Pullman	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
Mo7	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
T2Bo	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
RAD	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
Veracruz	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
M2P	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
M1A	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
M3P	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
S2P	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
R1A	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS
Tabasco	1	MVSFNIITVAFCSILFNYAVASPOEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKS

Pullman	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
Mo7	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
T2Bo	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
RAD	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
Veracruz	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
M2P	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
M1A	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
M3P	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
S2P	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
R1A	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL
Tabasco	61	ILEKNFEAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKL

Pullman	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
Mo7	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
T2Bo	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
RAD	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
Veracruz	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
M2P	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
M1A	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
M3P	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
S2P	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
R1A	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF
Tabasco	121	LIEAIYGMELIEKTNFSFVGSAKHSKLDLTDLRQYYWDNIYDDQSEYNKDKLSNLYKAF

Pullman	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
Mo7	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
T2Bo	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
RAD	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
Veracruz	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
M2P	181	ITNSAALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
M1A	181	ITNSAALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
M3P	181	ITNSAALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
S2P	181	ITNSAALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
R1A	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP
Tabasco	181	ITDSGALRIASEELIKFETRKAQKDDYRFINPSSTSEAETPSPSSGENTAAQPPKPAETP

Pullman	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
Mo7	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
T2Bo	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
RAD	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
Veracruz	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
M2P	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
M1A	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
M3P	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
S2P	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
R1A	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF
Tabasco	241	KPTGSSFTYGGLTVATLCYFVLSAF

Figura R. 10.: Alineamiento múltiple de secuencias de MSA-2c. La figura muestra el alineamiento global utilizando ClustalW2 de secuencias de la proteína codificada por el gen *msa-2c* en las cepas argentinas R1A, S2P, M1A, M3P, M2P y las cepas mexicanas RAD, Veracruz, Pullman, Tabasco, T2Bo y Mo7. Se resaltaron las zonas conservadas utilizando Boxshade. El fondo negro indica que el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; el fondo gris indica una sustitución conservada, y el blanco, una sustitución no conservada en esa posición en todas las secuencias.

La región N-terminal (aa 1 al 21) de éstas secuencias corresponde a la secuencia predicha para el péptido señal según el programa SignalP del CBS (Center for Biological Sequence Analysis) de acceso libre en línea, estando el sitio más probable de corte entre el aa 21 y 22 (residuos TLA-SP para las cepas R1A, RAD y Veracruz y AVA-SP para el resto de las cepas y aislamientos). Dicho péptido señal sirve para dirigir la proteína hacia la membrana plasmática durante su procesamiento en el retículo endoplasmático (R.E.), y es clivado por una proteasa específica localizada en el lumen del mismo. Asimismo, la región carboxilo terminal corresponde a una señal de unión al grupo GPI, que es un glicolípido que sirve de anclaje para algunas proteínas superficiales en una diversidad de organismos eucariotas, pero que es particularmente abundante en protozoos parásitos (McConville, M.J. and Ferguson, M.A.J., 1993). En el caso de *B. bovis* se demostró este tipo de anclaje para el antígeno de 42 kDa (MSA-1), que comparte con las MSA-2 la misma señal de unión a GPI, en su extremo carboxilo terminal (Hines, S.A. *et al.*, 1992). La señal de anclaje a GPI es normalmente una secuencia hidrofóbica de 17 a 30 aa en el extremo C-terminal, y que se desprende en el momento de la adición (Caras, I.W. and Weddell, G.N., 1989). En el caso de las MSA-2c de *B. bovis*, la señal de unión a GPI tiene un largo predicho de 21 aa, estando el sitio más probable para el clivaje en el aa G en la posición 244 y que se encuentra totalmente conservado entre todas las secuencias analizadas. Las anclas de GPI descritas para otros organismos están normalmente compuestas de un fosfatidilinositol, en el cual el inositol está unido a un *linker* compuesto de glucosamina, tres manosas y fosfoetanolamina. Esta última molécula está unida al aa carboxilo terminal de la proteína madura. Los dos ácidos grasos del fosfatidilinositol anclan la proteína a la membrana celular (McConville, M.J. and Ferguson, M.A.J., 1993; Stevens, V. L., 1995).

Tanto el extremo amino como el carboxilo terminal de las secuencias de MSA-2 están compuestos por aa hidrofóbicos, que permiten que la proteína tenga esas regiones inmersas en la membrana del R.E. En el caso de una glicoproteína superficie de *Trypanosoma brucei*, se ha descrito que una vez que el polipéptido recién sintetizado atraviesa la membrana del R.E. la adición al GPI ocurre en forma rápida y eficiente (Bangs, J.D. *et al.*, 1985; Ferguson,

M.A.J. *et al.*, 1986). El proceso involucra la eliminación de la secuencia N-terminal y el reemplazo de la secuencia hidrofóbica C-terminal por el GPI mediante una simple reacción de transamidación en la cual el grupo amino libre de la etanolamina del GPI ataca nucleofílicamente a la unión peptídica desplazando al péptido C-terminal sin requerimiento de ATP u otro nucleótido trifosfato (Mayor, S. *et al.*, 1991). La rapidez del proceso sugiere la presencia de un precursor de GPI preformado, cuya existencia fue informada por primera vez para tripanosomátidos (Krakow, J.L. *et al.*, 1986).

Podemos observar que las secuencias amino y carboxilo terminal están altamente conservadas entre los distintos aislamientos y cepas, siendo Tabasco la que presenta más sustituciones en el extremo amino terminal con 5 sustituciones y aunque los cambios están producidos en la zona predicha para sitio de corte del péptido señal, las mismas no afectaron dicho sitio, siendo el mismo para este aislamiento el dado por la secuencia TSA-SP.

Por otra parte las sustituciones puntuales producidas en las posiciones 17, 19, 20, 26 y 27 son compartidas por dos cepas mexicanas y la cepa vacunal argentina R1A. Con respecto a las sustituciones no conservadas en la posición 26 y 27 de E por K y A por T en las cepas RAD y Veracruz, producen la pérdida de un epítipo B predicho en la zona adyacente a esta región, así como la posible desaparición de una α hélice entre el amino ácido 24 y el 26, como se verá en la sección R. III. 1. y en la Figura R. 11. respectivamente.

La región comprendida entre los aa 48 y 131 está altamente conservada, ubicándose justamente en esa zona 3 posibles epítipos B predichos según se verá en la sección R. III. 1.

Por otra parte, la zona comprendida entre los aa 132 y 225 es más variable con sustituciones puntuales conservadas en las posiciones 148, 149, 183, 185 y no conservadas en las posiciones 144, 195, 216, 218, 221 y 225 en las 5 secuencias argentinas M1A, S2P, M2P, M3P y M1A. En esta zona también es el aislamiento mexicano Tabasco el que presenta más variaciones.

Finalmente en la región carboxilo terminal son las cepas y aislamientos argentinos los que presentan una variación, compartidos por todas en la posición 249 con una sustitución conservada y una sustitución puntual no conservada en la cepa vacunal argentina en la posición 246, produciendo esta última con el aa aromático F (Fenilalanina) un cambio en la estructura secundaria predicha como puede observarse en la Figura R. 11, con la aparición de una lámina β en las posiciones 246 a 248 que no está presente en las otras secuencias.

En la misma figura podemos observar que la sustitución no conservada en la posición 106 del aa no polar L por el polar S en los aislamientos argentinos M2P y M1A produjo cambios a nivel de la estructura secundaria con la aparición de una α hélice de 101 a 103, y

los mismos se ven reflejados en la ausencia en dicha zona de un probable epítopo B que esta predicho para el resto de las cepas y aislamientos en la posición 102 a 110.

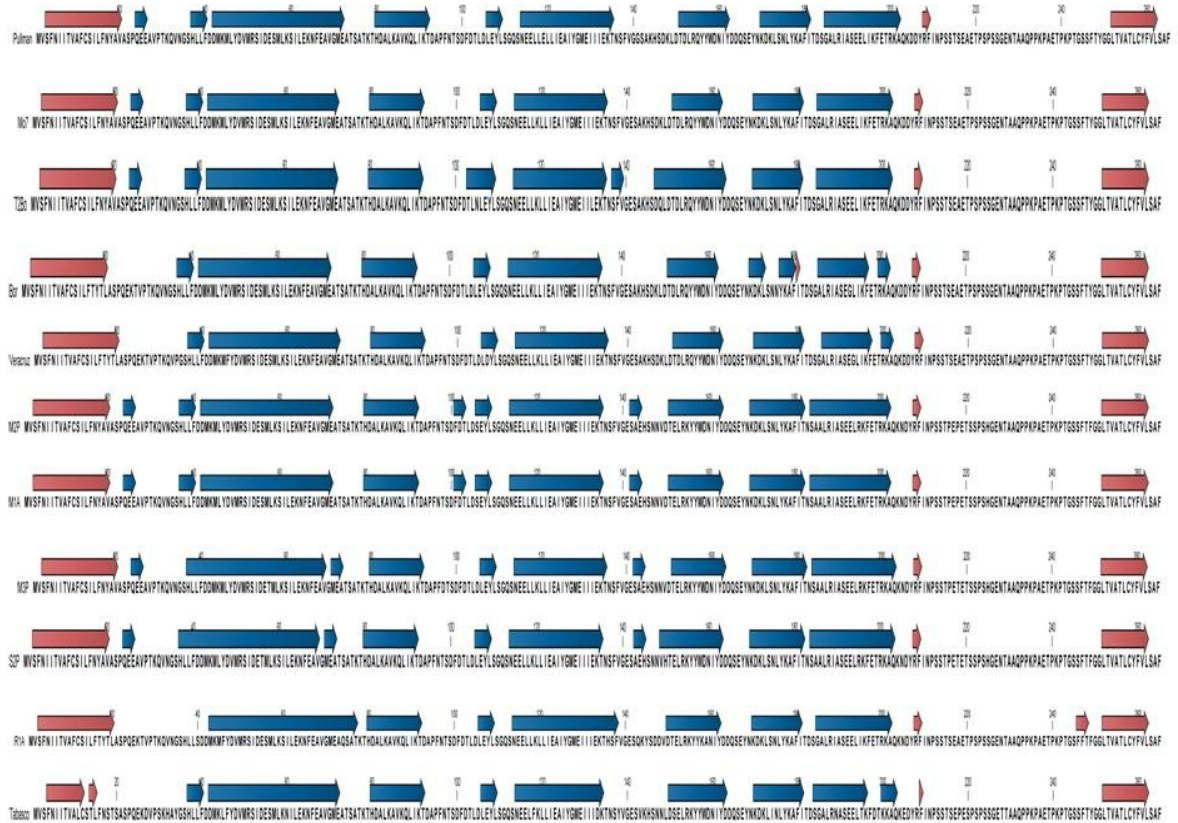


Figura R. 11.: Estructura secundaria predicha para las secuencias de aa de la proteína MSA-2c, calculadas con el programa CLC Combined Workbench 3 bajado del sitio www.clcbio.com. Las flechas rojas corresponden a láminas β y las flechas azules a α hélice. Las secuencias están ordenadas en el mismo orden que aparece en el alineamiento de las mismas. Es importante destacar que no deben tenerse en cuenta las láminas β inicial y final porque corresponden al péptido señal y a la señal de anclaje al GPI que no están presentes en la proteína madura.

R. III.2.2. Análisis de las secuencias de MSA-2a y b

En el caso de los genes msa-2 a y b, que como se vió en el capítulo M. 4., pueden amplificarse por PCR utilizando los oligonucleótidos comunes B44 Topo Forward y B42/44 Topo Reverse, las secuencias obtenidas fueron clasificadas como msa-2a1, msa-2b o msa-2a/b, de acuerdo a los porcentajes de identidad con respecto a las secuencias de la cepa clonada de referencia Mo7 depositadas en el GenBank (Tabla R.1). Estos porcentajes fueron obtenidos luego del alineamiento de cada secuencia incógnita primero con las secuencia de MSA-2a1 de Mo7 y luego con la de MSA-2b de la misma cepa, utilizando la matriz BLOSUM 62, que es ideal cuando se trata de identificar secuencias desconocidas.

Luego se realizaron alineamientos conjuntos de las secuencias predichas de aa de todos los alelos identificados de msa-2a1, msa-2b y msa-2a/b, utilizando el programa ClustalW2, software disponible en el sitio web del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>), para luego detectar regiones conservadas y polimórficas, utilizando el programa Boxshade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

El alineamiento obtenido para MSA-2b de los aislamientos R1A, M2P, M1A, Tabasco, T2Bo, Mo7 y 2 clones diferentes de RAD se observa en la figura R. 12.

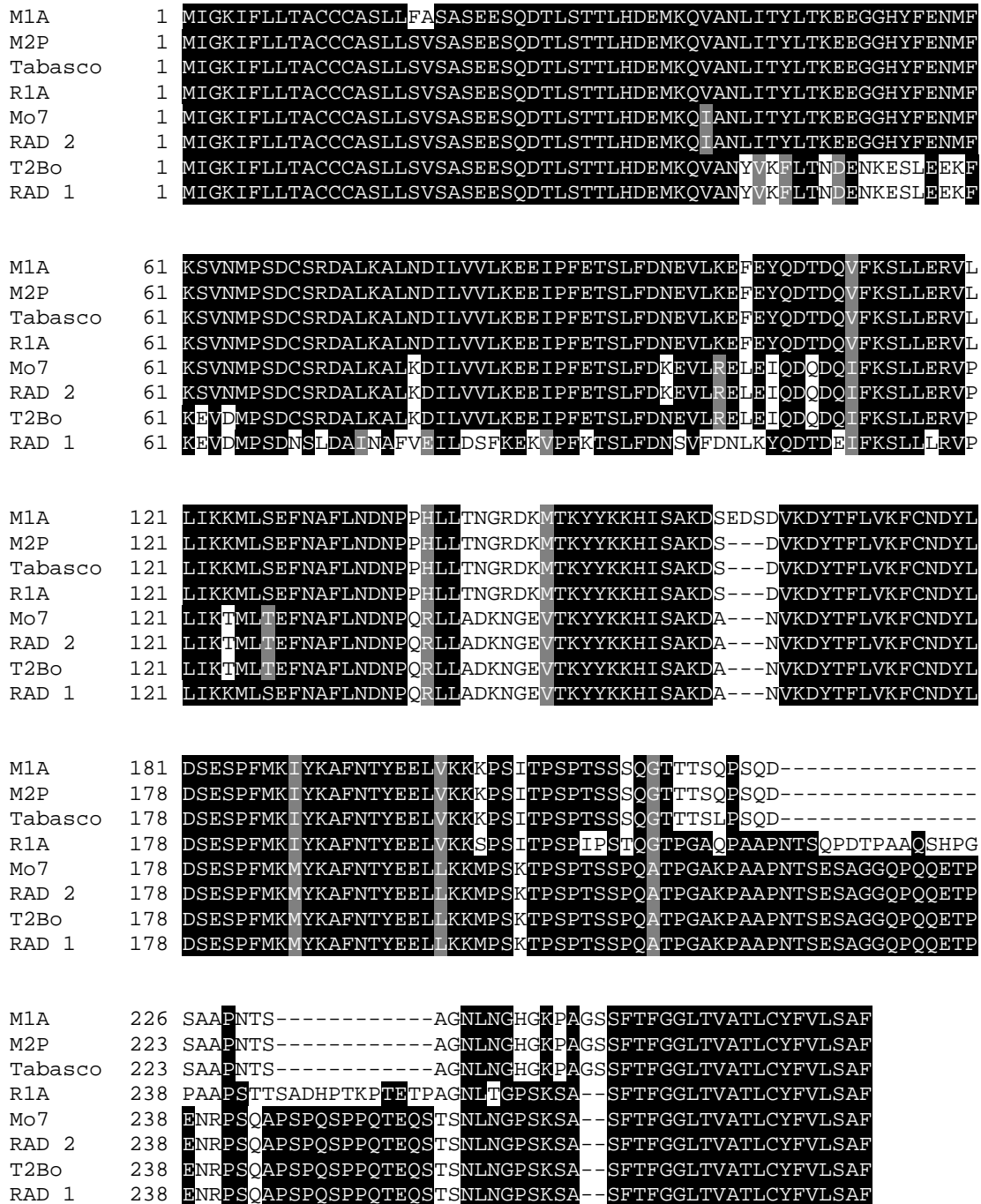


Figura R. 12.: Alineamiento múltiple de secuencias de MSA-2b. La figura muestra el alineamiento global de secuencias de aa predichas del gen *msa-2b* en las cepas argentinas R1A, M1A, M2P, M3P, las cepas Tabasco y dos clones diferentes de la cepa RAD, el aislamiento americano T2Bo y la cepa biológicamente clonada Mo7. Se alinearon las secuencias obtenidas con el programa ClustalW2. Los residuos marcados en negro indican que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los residuos marcados en gris indican una sustitución conservada, y los marcados en blanco indican una sustitución no conservada en esa posición.

Podemos observar que el largo de las secuencias tanto las obtenidas por secuenciación como las depositadas con anterioridad en el GenBank difirió en la cantidad de aa, siendo de 262 para los aislamientos Tabasco y M2P, 265 para el aislamiento M1A y de 287 para los dos clones de RAD, R1A, T2Bo y Mo7. Como en el caso de las variantes de MSA-2c, se predijo la estructura secundaria para las variantes de MSA-2b, las cuales se grafican en la Figura R. 13. y se observó si las sustituciones encontradas modificaban tal estructura. La estructura secundaria predicha para R1A consistió también en este caso en una serie de 10 α hélices de entre 10 y 25 aa, ubicadas en tandem, seguidas de una secuencia de 42 aa desprovista de estructura secundaria. Es importante mencionar que las láminas β inicial y final no deben ser tenidas en cuenta porque corresponden al péptido señal y a la señal de anclaje al GPI que no están presentes en la proteína madura.

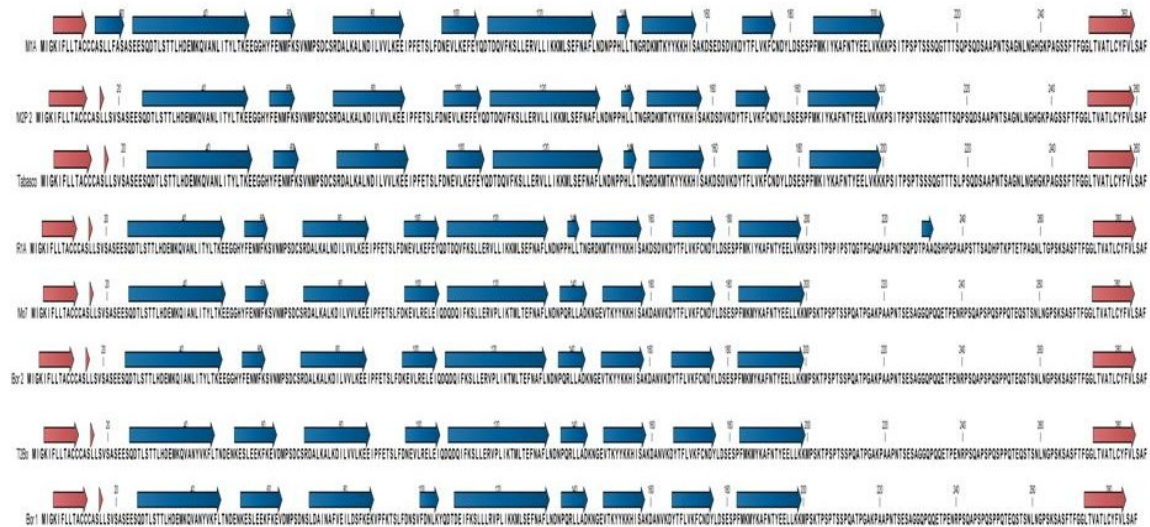


Figura R. 13.: Estructura secundaria predicha para las secuencias de aa de la proteína MSA-2b, calculadas con el programa CLC Combined Workbench 3 bajado del sitio www.clcbio.com. Las flechas rojas corresponden a láminas β y las flechas azules a α hélice, Las secuencias están ordenadas en el mismo orden que aparece en el alineamiento de las mismas. Es importante destacar que no deben tenerse en cuenta las láminas β inicial y final porque corresponden al péptido señal y a la señal de anclaje al GPI que no están presentes en la proteína madura.

En la Figura R. 12. podemos observar que en todas las secuencias se mantiene conservado el sitio propuesto para clivaje del péptido señal en el extremo amino terminal entre las posiciones 22–23 dada por la secuencia SAS-EE.

En la zona comprendida entre los aa 43 y 64 observamos varias sustituciones puntuales tanto conservadas como no conservadas sólo en los aislamientos T2Bo y uno de los clones de

la cepa RAD, y compartidas por ambas secuencias pero que no influyen a nivel de la estructura secundaria predicha, compuesta por dos α hélices.

En la zona comprendida por los aa 138 y 148 existe una serie de sustituciones tanto conservadas como no conservadas compartidas por un lado por M1A, M2P, Tabasco y R1A, y por otro lado por T2Bo, Mo7 y ambos clones de RAD, siendo la secuencia para las 4 primeras cepas PHLLTNGRDKM y QRLADKNGEV para las 4 restantes y que no afectan sin embargo la estructura secundaria predicha para todas las secuencias. Por otro lado, es interesante destacar que los aa LL se mantuvieron conservados en todas las secuencias.

Este mismo tipo de sustituciones, en que dichas 4 cepas poseen un determinado aa y las 4 restantes otro, se observó a lo largo del alineamiento en las posiciones 186, 197, 200, 203, 213, 239-240, 243, 257-258, siempre estas posiciones respecto de Mo7.

En todas las secuencias analizadas salvo el aislamiento argentino M1A existe un gap de 3 aa entre las posiciones 162-163, o sea que en dicho aislamiento hay en dicha posición una inserción de 3 aa pero el mismo no produjo cambios a nivel de la estructura secundaria, habiendo un puente en esa zona

En las secuencias de los aislamientos argentinos y mexicano M1A, M2P y Tabasco respectivamente, podemos observar que al realizar el alineamiento global con el resto de las secuencias, estas 3 presentan 2 gaps de 15 y 12 aa respectivamente en las posiciones 223 a 237 y 245 a 256 respecto de Mo7. De todas formas esto no se ve afectado en la estructura secundaria predicha para estas secuencias.

Estas 3 secuencias también comparten entre si en las zonas adyacentes a dichos gaps sustituciones no conservadas y una inserción de 2 aa 22 posiciones antes del final, correspondiente a las posiciones 267-268 respecto de Mo7, aunque no se ve afectada la estructura secundaria predicha.

Con respecto a la zona carboxilo-terminal, se predijo el sitio más probable de corte y anclaje a GPI, según el sitio http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html, y el mismo arrojó como tal el aa Serina (S) en la posición 266 (respecto de R1A, Mo7, RAD y T2Bo; y el aa Alanina (A) en la posición 240 respecto de M2P y Tabasco y 243 respecto de M1A, o sea para todas este sitio de clivaje corresponde a 21 aa contando desde el final del extremo carboxilo terminal.

Con el mismo criterio que en el caso anterior se procedió a realizar el alineamiento de las distintas secuencias de aa predichas para el gen *msa-2a1*, como puede observarse en la figura R. 14. Asimismo, se predijo la estructura secundaria de dichas secuencias (Figura. R.

15) y se observó si las sustituciones encontradas en el alineamiento tuvieron influencia o no en la estructura secundaria predicha.

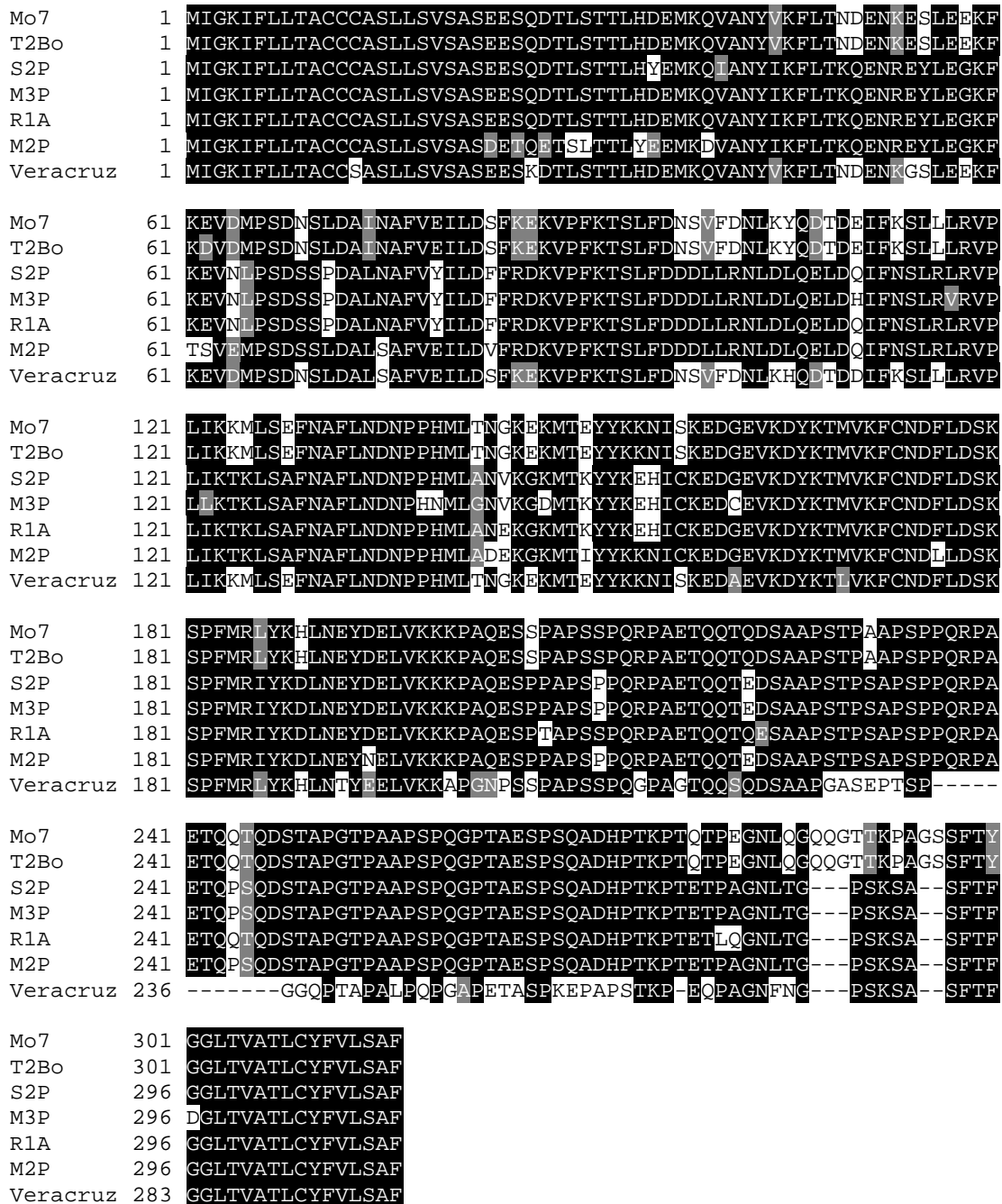


Figura R. 14.: Alineamiento múltiple de secuencias de MSA-2a1. La figura muestra el alineamiento global de secuencias de la proteína codificada por el gen *msa-2a1* en las cepas y aislamientos argentinos R1A, S2P, M2P y M3P, el aislamiento mexicano Veracruz y la cepa de referencia biológicamente clonada Mo7. Se alinearon las secuencias obtenidas con el programa ClustalW2. Los residuos marcados en negro indica que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los residuos marcados en gris indican una sustitución conservada, y los marcados en blanco indica una sustitución no conservada en esa posición.

También podemos observar que el largo de las secuencias fue variable, siendo de 311 aa para los aislamientos argentinos R1A, M2P, S2P y M3P, de 316 aa para el aislamiento T2Bo y la cepa Mo7 y de 298 aa para el aislamiento mexicano Veracruz.

Para todas las secuencias se predice el sitio de corte del péptido señal entre los aa 22 y 23 dado por la secuencia SAS-EE, salvo para el aislamiento M2P que al poseer una sustitución conservada en la posición 23, el corte esta dado por la secuencia SAS-DE, según lo predecido por el servidor SignalP del Center for Biological Sequences Análisis (CBS, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

En el alineamiento anterior se puede observar una moderada variabilidad a lo largo de toda la secuencia con sustituciones tanto conservadas como no conservadas y presencia de gaps en todas las secuencias argentinas y la mexicana Veracruz, aunque la mayoría no influyeron en la estructura secundaria predicha para las mismas. Las que sí produjeron cambios en la proteína madura fueron las sustituciones no conservadas en la posición 150, siendo el aa Ac. Glutámico (E) para Mo7, T2Bo y Veracruz, el aa Lisina (K) para S2P, M3P y R1A y encontramos el aa Isoleucina (I) para el aislamiento M2P lo que provocó la aparición de una lámina β para esta última cuando las otras secuencias presentan una α hélice como podemos observar en la figura R. 15.; por otra parte la sustitución no conservada del aa Ac. Glutámico (E) por Glutamina (Q) en la posición 222 en los aislamientos S2P, M3P y M2P que produjo la ausencia de una α hélice en la posición 217-219 que sí está presente en la estructura predicha para las otras secuencias como se observa en la misma figura. En el aislamiento Veracruz aunque no presenta dicha sustitución en esa posición también se vio modificada la estructura secundaria con la ausencia de la α hélice, probablemente debido a la sustitución conservada adyacente de Serina (S) por Treonina (T) como se observa en la figura R. 15. Finalmente, la sustitución no conservada producida en la secuencia de la cepa R1A en la posición 280-281 provocó la aparición de una α hélice en la posición 278-280, que está ausente en las otras secuencias de esta proteína predicha como puede observarse la figura R. 15.

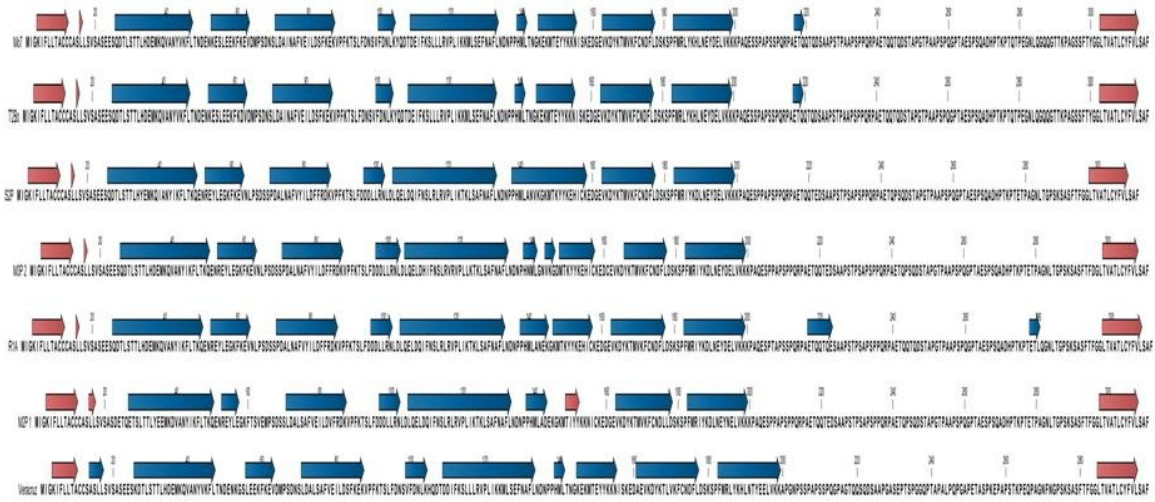


Figura R. 15.: Estructura secundaria predicha para las secuencias de aa de MSA-2a1, calculadas con el programa CLC Protein Workbench bajado del sitio www.clcbio.com. Las flechas rojas corresponden a láminas β y las flechas azules a α hélices. Las secuencias están ordenadas en el mismo orden que aparece en el alineamiento de las mismas.

En líneas generales, podemos mencionar que a pesar de que algunas sustituciones en las secuencias produjeron probablemente cambios a nivel de la estructura secundaria predicha, como ser la división de una α hélice grande en dos pequeñas o viceversa, la estructura básica de una serie de α hélices en tandem separadas por secuencias sin estructura secundaria no se vio alterada en los diferentes aislamientos y cepas analizadas.

Por otra parte podemos mencionar que la secuencia del aislamiento Veracruz es el que presenta mayor número de variaciones a lo largo de toda la secuencia, con la presencia de un gap entre las posiciones 236 a 247 (respecto de Mo7).

En la región carboxilo terminal, también podemos observar la presencia de dos gaps de 3 y 2 aa respectivamente en las posiciones 287-289 y 295-296 en todas las secuencias de aislamientos argentinos y el mexicano Veracruz.

Para analizar dentro de esta región el sitio más probable de corte y unión al grupo GPI se utilizó el programa disponible en el sitio <http://mendel.imp.ac.at/home/Birgit.Eisenhaber>, el cual predijo el aa S ubicado en la posición 290 respecto de R1A, S2P, M2P, M3P y en la posición 277 respecto de Veracruz, y el aa Glicina (G) en la posición 295 respecto de Mo7 y T2Bo, al igual que para el caso de MSA-2c y 2b, este sitio está ubicado a 21 aa del extremo carboxilo terminal.

R. III.2.3. Análisis de una forma intermedia entre MSA-2a y 2-b

En el caso del aislamiento argentino M3P, se secuenciaron dos clones derivados del producto de amplificación de *msa-2a* y *b*. Las secuencias dieron identidad diferente, clasificándose el clon 2 por su porcentaje de identidad con el de la cepa clonada Mo7 como MSA-2a1 y al clon 1 se lo consideró una forma intermedia MSA-2a/b, dado que los porcentajes de identidad con respecto a MSA-2a1 fue de 60,9% y con respecto a MSA-2b fue de 57,2%. (Tabla R. 1.)

El resultado obtenido de alinear esta secuencia con las secuencias predichas de aa de MSA-2a1, MSA-2a2 y MSA-2b de Mo7 se muestra en la figura R.16.

```

Mo7a1 1  MIGKIFLLTACCCASLLSVSASEESQDTLSTTLHDEMKVANYVKFLTNDENKESLLEEKF
Mo7a2 1  MIGKIFLLTACCCASLLSVSASEESQDTLSTTLHDEMKVANYVKFLTNDENKESLLEEKF
M3Pa/b 1  MIGKIFLLTACCCASLLSVSASEESQDSSSTTLHYEMKVANYIKFLTNDNRYNLEEKF
Mo7b 1  MIGKIFLLTACCCASLLSVSASEESQDTLSTTLHDEMKVIANLITYLTKBEFGHYFENMF

Mo7a1 61  KEVDMPSDNLDAINAFVEILD SFKEKVPFKTSLFDNSVFDNLKYQDTDEIFKSLLLRVP
Mo7a2 61  KEVDMPSDNLDAINAFVEILD SFKEKVPFKTSLFDNSVFDNLKYQDTDEIFKSLLLRVP
M3Pa/b 61  RNASMPGDGSLKALSAFVENLDVLRREVPFENS LFDETLIKDLEIQDPPDVFKSLLERVP
Mo7b 61  KSVNMPSDCSRDAIKALKDILVVLKEETPFETS LFDKEVLRLEIQDQDQIFKSLLERVP

Mo7a1 121  LIKKMLSEFN AFLNDNPPHMLTNGKEKMTEY YKKNI SKEDGEVKDYKTMVKFCNDFLDSK
Mo7a2 121  LIKKMLSEFN AFLNDNPPRLADKNGEVTKY YKKHISAKDANVKDYTF LVKFCNDFLDSK
M3Pa/b 121  LIKAKLSAFNAYLNDNPPRMLGSGKEKMNE YKKHICKEDVKEKDYESLVKFCSDFLDGE
Mo7b 121  LIKTMLTEFN AFLNDNPPRLADKNGEVTKY YKKHISAKDANVKDYTF LVKFCNDYLDSE

Mo7a1 181  SPFMRLYKHLNEYDELVKKKPAQESSPAPSSPQ RPAETQQTQDSAAPSTPAAPSPPQRPA
Mo7a2 181  SPFMRLYKHLNEYDELVKKKPAQESSPAPSSPQ -----RPA
M3Pa/b 181  SPFMNMYKALNEYDELVKGKPAKPSPTNSSSQ -----
Mo7b 181  SPFMKMYKAFNTYEELKMKMP SKTPSPT-SSPQ -----ATP

Mo7a1 241  ETQQTQDSTAPGTPAAPSPOGPTAESPSQADHPTKP-TQTPEGNLQGOQGTTKPAGSSFT
Mo7a2 217  ETQQTQDSTAPGTPAAPSPOGPTAESPSQADHPTKP-TQTPEGNLQGOQGTTKPAGSSFT
M3P 214  GTTSTEQSRDPAVPGKQEVASATEPAQESAA N-----TSAGNLNGKQ-----AGSSFT
Mo7b 216  GAKPAAPNTSESAGCQEQQETPENRPSQAPSPQSPQTEQSTSNLNGPS-----KSASFT

Mo7a1 300  YGGLTVATLCYFVLSAF
Mo7a2 276  YGGLTVATLCYFVLSAF
M3Pa/b 264  YGGLTVATLCYFVLSAF
Mo7b 271  YGGLTVATLCYFVLSAF

```

Figura R. 16.: Alineamiento múltiple de la secuencia de aa predicha de la forma intermedia de la cepa M3P con las de *msa-2a1*, *a2* y *b* de la clonada biológicamente Mo7. Se alinearon las secuencias obtenidas con el programa ClustalW2 y luego se resaltaron con el programa Boxshade. Las regiones marcadas en negro indican que el residuo en esa posición es idéntico en

todas las secuencias del alineamiento; los residuos marcados en gris indican una sustitución conservada, y los marcados en blanco indican una sustitución no conservada en esa posición.

Si se compara la secuencia de *msa-2a1* con la del clon 1 de M3P, puede observarse una alta similitud hasta el aa 213 de la primera. Sin embargo, estas dos secuencias se vuelven significativamente diferentes a partir del residuo 214, dado que el clon 1 no presenta la región: RPAETQQTQDSAAPSTPAAPSPPQ, característica de las secuencias a1, y se vuelve por tanto más similar a la secuencia de MSA-2b y de MSA-2a2 de Mo7. Esta última se considera como un producto de recombinación entre a1 y b (Florín-Christensen, M. *et al.*, 2002). A partir de esta región, la secuencia presenta múltiples sustituciones y recién en los últimos 30 aa vuelve a adquirir similitud con alguna de las secuencias de Mo7. Este tipo de formas intermedias entre MSA-2 a y b fueron las encontradas en aislamientos australianos por Berens, S.J. *et al.* (2005) y será analizado con más detalle en la de Discusión.

Por otra parte se predijo también la estructura secundaria para esta forma intermedia de M3P y se la graficó en la Figura R. 17., junto con la de MSA-2a2 de Mo7 (las correspondientes a las proteínas MSA-2a1 y MSA-2b de Mo7 utilizadas en el alineamiento anterior pueden observarse en las figuras R. 13 y R. 15).



Figura R. 17.: Estructura secundaria predicha para la secuencia de aa intermedia MSA-2a/b de la cepa M3P(secuencia inferior) y MSA-2a2 de Mo7 (secuencia superior), calculadas con el programa CLC Combined Workbench 3 bajado del sitio www.clcbio.com. Las flechas rojas corresponden a laminas β y las flechas azules a α hélice. Es importante destacar que no deben tenerse en cuenta las láminas β inicial y final porque corresponden al péptido señal y a la señal de anclaje al GPI que no están presentes en la proteína madura

Como podemos observar, la misma conserva la estructura de una serie de α hélices ubicadas en tandem separadas por secuencias sin estructura, al igual que el resto de las MSAs analizadas.

R. III. Resultados capítulo III: Búsqueda de epitopes B en los miembros de la familia MSA-2 y análisis de los mismos.

R. III.1 Análisis de las proteínas MSA-2c, MSA-2b y MSA-2a1.

En base a las secuencias predichas de aminoácidos obtenidas para las proteínas de la familia MSA-2 de las cepas y aislamientos disponibles, se procedió al análisis bioinformático de las mismas para la búsqueda de péptidos que pudieran ser probables determinantes antigénicos capaces de despertar una respuesta inmune de tipo humoral.

Dado que la estructura tridimensional de las proteínas de la familia MSA-2 del parásito *B. bovis* no ha sido determinada experimentalmente, ni existe similitud significativa a nivel de secuencia con ninguna proteína de estructura tridimensional conocida, los métodos usados para la predicción de antigenicidad se basaron únicamente en la secuencia aminoacídica y se trata de péptidos lineales, tomándose para éste trabajo la correspondiente a la cepa vacunal argentina R1A.

Para las proteínas MSA-2a1, MSA-2b y MSA-2c se sabe que las zona altamente conservadas del péptido señal ubicada en el extremo amino terminal y la secuencia común compartida por las 3 proteínas de 22 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que sirve como una secuencia señal para la adición de la molécula GPI, se clivan durante el procesamiento de la proteína en el retículo endoplásmico y no se encuentran en las formas maduras. Por lo tanto, las mismas fueron descartadas para el análisis que se llevara a cabo a continuación que se hizo para la selección de epitopes según varias de sus características, para su síntesis y estudios posteriores, aunque si se dejaron para el alineamiento global, ya que ayudan al mismo.

Las regiones potencialmente antigénicas fueron seleccionadas de acuerdo al método desarrollado por Kolaskar y Tongaonkar (1990) disponible entre las herramientas del sitio de Internet del Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). Este método semi empírico combina propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos junto con sus frecuencias de aparición en segmentos peptídicos para los que se conoce experimentalmente la presencia de epitopes B. La aplicación de este método a un gran número de proteínas mostró que pueden predecirse determinantes antigénicos con un 75 % de exactitud, porcentaje significativamente mayor que los de la mayoría de los métodos conocidos.

La secuencia predicha de la proteína MSA-2c arrojó 7 secuencias de posibles determinantes antigénicos, como puede observarse en la tabla R. 4.

N	Posición inicial	Posición final	Secuencia	Largo del péptido (en aminoácidos)
C 1	34	40	NGSHLLS	7
C 2	79	92	THDALKAVKQLIKT	14
C 3	103	111	TLDLEYLSG	9
C 4	116	124	ELLKLLIEA	9
C 5	133	142	EKTHSFVGES	10
C 6	173	181	LSNLYKAFI	9
C 7	186	194	ALRIASEEL	9

Tabla R. 4.: Secuencias de probables determinantes antigénicos predichas por el método semi empírico de Kolaskar y Tongaonkar para la secuencia aminoacídica de la proteína MSA-2c de la cepa vacunal argentina R1A.

Asimismo, este método de predicción nos arroja la curva de antigenicidad que se observa en la figura R. 12. en la que se representa la propensión antigénica promedio o antigenicidad a lo largo de la secuencia aminoacídica. Esta curva tiene un punto de corte en 1. Las regiones con valores superiores a 1 se consideran como propensas a ser antigénicas.

Las 7 secuencias mencionadas en la Tabla R. 4. se han marcado en la parte superior del gráfico, en segmentos en color negro. El valor medio de antigenicidad de esta secuencia fue de 1,004, alcanzando el pico máximo de 1,133 en los aminoácidos Lisina (K) y Leucina (L) ubicados en la posición 119 y 120 respectivamente, ambos en el péptido predicho denominado C 4 en la Tabla R. 4., un mínimo de 0,913 en la posición 113 en el aminoácido hidrofílico Serina (S). Los péptidos predichos como probables determinantes antigénicos se encuentran ubicados preferentemente en la zona inicial y media de la proteína.

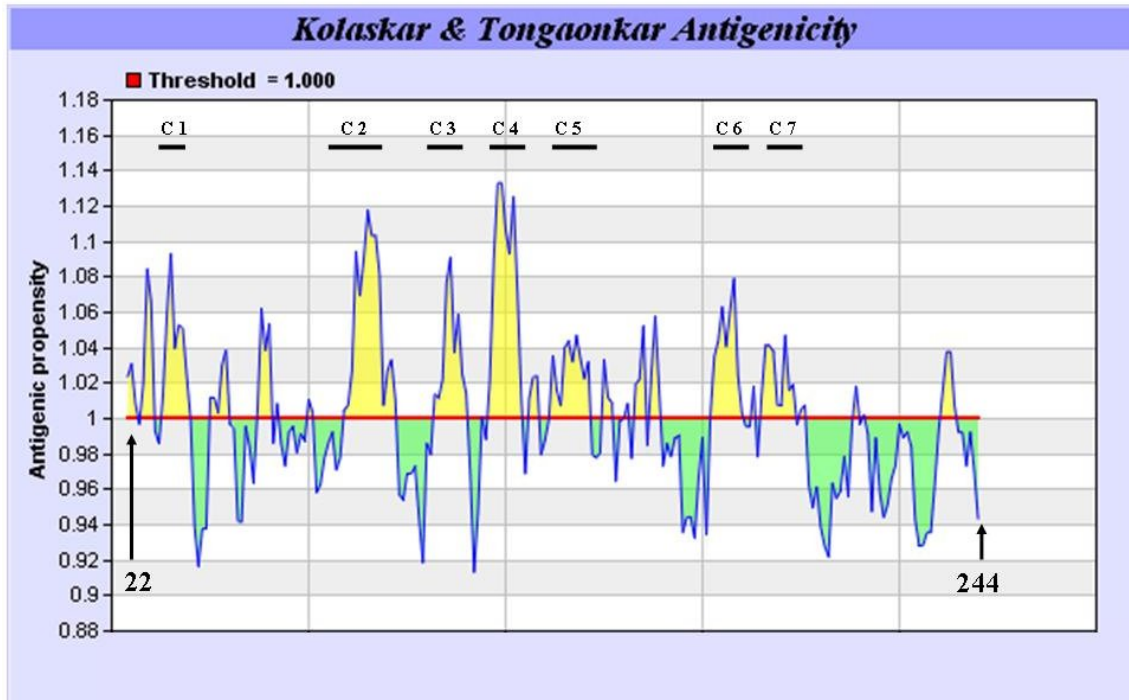


Figura R. 12.: Curva de propensión antigénica promedio para la secuencia de la proteína MSA-2c de la cepa vacunal argentina R1A determinada por el método de Kolaskar y Tongaonkar. En el eje vertical se observa la propensión antigénica. En la parte superior del gráfico se muestran siete líneas negras que corresponden a los 7 determinantes antigénicos predichos. La línea roja horizontal indica el umbral o punto de corte, fijado en 1. Las flechas indican las posiciones inicial y final en la secuencia.

El mismo método se aplicó a las secuencias de MSA-2b y MSA-2a1, obteniéndose 8 y 9 probables epitopes respectivamente como puede apreciarse en las tablas R. 5. para MSA-2b y R. 6. para MSA-2a1.

N	Posición inicial	Posición final	Secuencia	Largo del péptido (en aminoácidos)
B 1	40	47	VANLITYL	8
B 2	68	87	DCSRDALKALNDILVVLKEE	20
B 3	108	124	TDQVFKSLLERVLLIKK	17
B 4	151	157	YYKKHIS	7
B 5	163	176	VKDYTFLVKFCNDY	14
B 6	184	190	MKIYKAF	7
B 7	194	210	EELVKKSPSITPSPIPS	17
B 8	232	243	AQSHPGPAAPST	12

Tabla R. 5.: Secuencias de aminoácidos de probables epitopes B predichos por el método de Kolaskar y Tongaonkar, en la proteína predicha MSA-2b de la cepa vacunal argentina R1A.

N	Posición inicial	Posición Final	Secuencia	Largo del péptido (en aminoácidos)
A 1	40	47	VANYIKFL	8
A 2	71	83	PDALNAFVYILDF	13
A 3	85	93	RDKVPFKTS	9
A 4	105	131	LQELDQIFNSLRRLRVPLIKTKLSAFNA	27
A 5	152	158	YKEHICK	7
A 6	164	175	KDYKTMVKFCND	11
A 7	193	200	YDELVKKK	8
A 8	227	237	PSTPSAPSPPO	11
A 9	253	261	TPAAPSPQG	9

Tabla R. 6.: Secuencia de probables determinantes antigénicos predichas por el método semi empírico de Kolaskar y Tongaonkar para la secuencia aminoacídica de la proteína MSA-2a1 de la cepa vacunal argentina R1A.

Una vez obtenidos por el método semi empírico de Kolaskar y Tongaonkar los posibles péptidos antigénicos en las proteínas MSA-2c, MSA-2b y MSA-2a1 de la cepa vacunal R1A, se procedió a ubicarlos en los alineamientos de las mismas, para estudiar su grado de conservación entre los distintos aislamientos y cepas.

La ubicación de los 7 determinantes antigénicos predichos en la proteína MSA-2c pueden observarse en la figura R. 13., resaltados en gris sobre la secuencia de la cepa R1A. Asimismo, en la parte superior de las secuencias se muestra la estructura secundaria predicha para esta proteína.

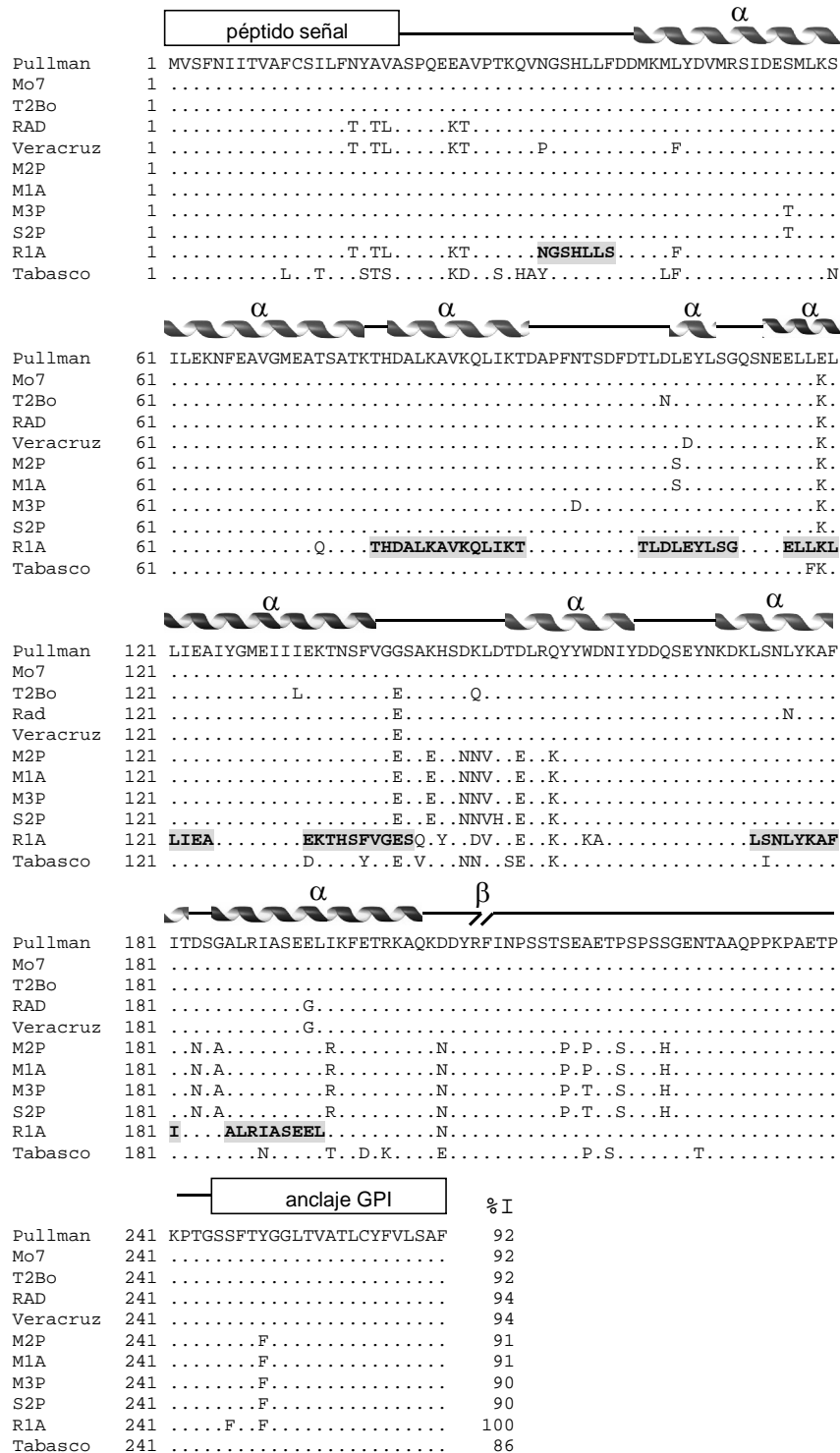


Figura R. 13.: Ubicación de los determinantes antigénicos en el alineamiento de las secuencias de MSA-2c de los distintos aislamientos y cepas de *B. bovis*. Los puntos corresponden a aa conservados y las líneas (-) a gaps. Los péptidos predichos para la secuencia obtenida para R1A se muestran resaltados en gris con los correspondientes aminoácidos. En las zonas amino y carboxilo terminal se destacan el péptido señal y

anclaje a GPI respectivamente. La estructura secundaria predicha de la proteína R1A madura se grafica en la parte superior de las secuencias. α : α hélice; β : lámina β . Las líneas corresponden a secuencias de aa sin estructura secundaria predicha. Los porcentajes de identidad (%I) con respecto a la secuencia aminoacídica de R1A se muestran al final de cada secuencia

En la figura podemos observar que los determinantes antigénicos predichos se encuentran en zonas altamente conservadas, más específicamente podemos señalar que el péptido C 2 que se encuentra en una zona totalmente conservada entre las 11 secuencias analizadas, mientras que en los otros 7 se observan algunas sustituciones.

De la misma manera, se procedió a ubicar los 8 determinantes antigénicos predichos por el método semi empírico de Kolaskar y Tongaonkar sobre las secuencias alineadas de las 8 cepas y aislamientos clasificados como pertenecientes a la proteína MSA-2b, como puede observarse en la figura R. 14.

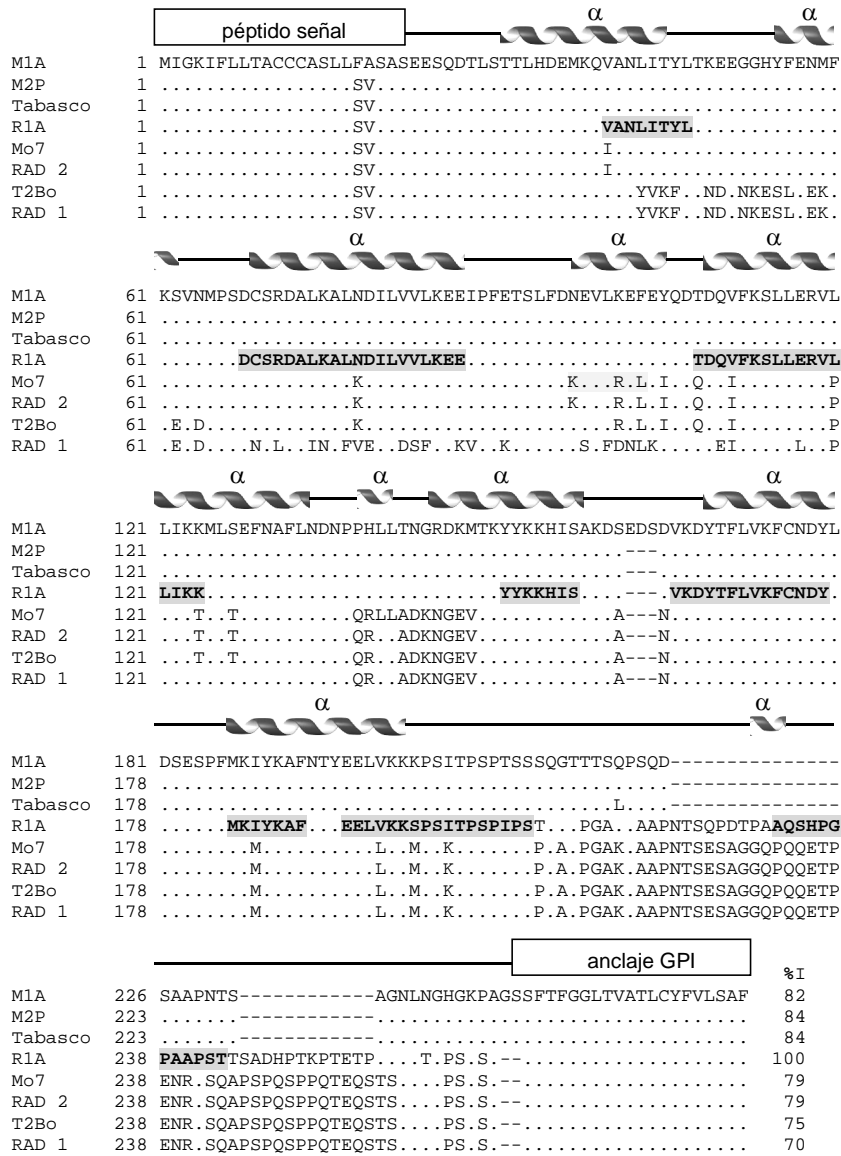


Figura R. 14.: Ubicación de los determinantes antigénicos en el alineamiento de las secuencias de MSA-2b de los distintos aislamientos y cepas de *B. bovis*. Los puntos corresponden a aa conservados y las líneas (-) a gaps. Los péptidos predichos para la secuencia obtenida para R1A se muestran resaltados en gris con los correspondientes aminoácidos. En las zonas amino y carboxilo terminal se destacan el péptido señal y anclaje a GPI respectivamente. La estructura secundaria predicha de la proteína R1A madura se grafica en la parte superior de las secuencias. α : α hélice; β : lámina β . Las líneas corresponden a segmentos de aa sin estructura secundaria predicha. Los porcentajes de identidad (%I) con respecto a la secuencia aminoacídica de R1A se muestran al final de cada secuencia.

En esta figura podemos observar que de los 8 péptidos predichos por el método elegido, sólo 2 se encuentran en zonas de conservación total entre las distintas secuencias, siendo estos los denominados B 4 y B 5 en la tabla R. 5.

El resto de los epitopes, en su mayoría, se encuentran en zonas altamente conservadas pero con algunas sustituciones tanto del tipo conservadas como no conservadas.

Para el caso del péptido denominado B 8 (aas 232 a 243 de la secuencia de R1A), si bien este epitope fue predicho para la secuencia de R1A, esta cepa es la única que contiene esa región entre las cepas analizadas, ya que la región que lo contiene está ausente en los aislamientos M1A y M2P, Tabasco. Por otra parte, las secuencias de Mo7, T2Bo y ambos alelos de RAD, tienen esa región sustituida por otra, la cual esta conservada entre estos aislamientos y cepas pero difiere de la de R1A. Asimismo, en éstas, se predice un epitope B entre los aa 243 y 250 (de la secuencia de Mo7, T2Bo y RAD) que no lo es para la cepa argentina vacunal R1A, ni para las secuencias de M1A, M2P y Tabasco, debido a las sustituciones y gaps que se observan en esa región.

Finalmente se alinearon las 7 secuencias de aminoácidos predichas correspondientes a aislamientos y cepas obtenidos a partir de la amplificación del gen *msa-2a1* y en dicho alineamiento global sobre la secuencia de la cepa R1A se resaltaron las secuencias correspondientes a los 9 determinantes antigénicos predichos por el método de Kolaskar y Tongaonkar, como puede observarse en la figura R. 15.

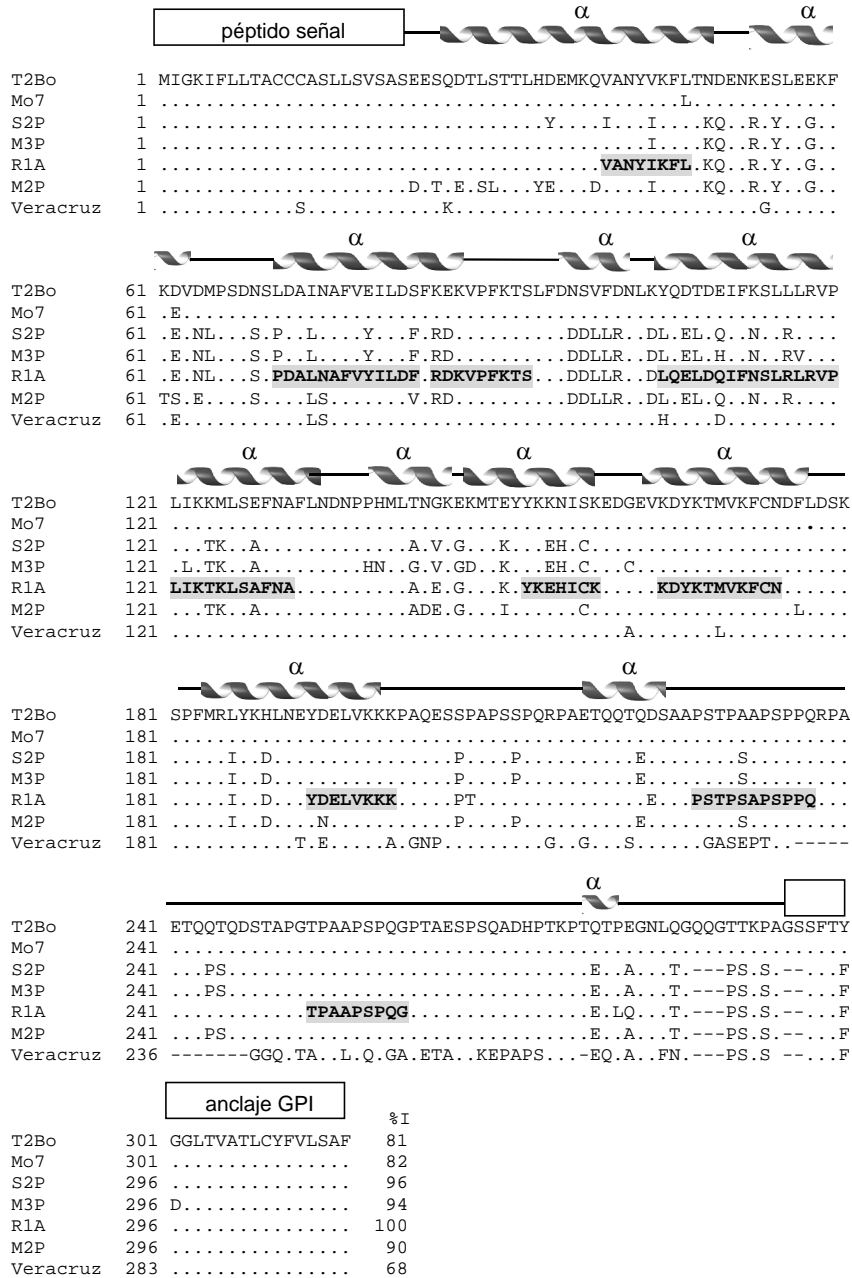


Figura R. 15.: Ubicación de los determinantes antigénicos en el alineamiento de las secuencias de MSA-2a1 de los distintos aislamientos y cepas de *B. bovis*. Los puntos corresponden a aa conservados y las líneas (-) a gaps. Los péptidos predichos para la secuencia obtenida para R1A se muestran resaltados en gris con los correspondientes aminoácidos. En las zonas amino y carboxilo terminal se destacan el péptido señal y anclaje a GPI respectivamente. La estructura secundaria predicha de la proteína R1A madura se grafica en la parte superior de las secuencias. α : α hélice; β : lámina β . Las líneas corresponden a segmentos de aa sin estructura secundaria predicha. Los porcentajes de identidad (%I) con respecto a la secuencia aminoacidica de R1A se muestran al final de cada secuencia.

En esta figura podemos destacar que el péptido denominado A 6 en la Tabla R. 6. es el que se encuentra más conservado de todos, con una sola sustitución conservada del aminoácido hidrofóbico metionina (M) por el también hidrofóbico Leucina (L) en el aislamiento mexicano Veracruz. Los péptidos A 7 y A 9 presentan la misma característica, en cuanto a que están situados en una zona altamente conservada para todas las secuencias analizadas salvo el aislamiento Veracruz, el cual presenta algunas sustituciones conservadas y no conservadas.

El péptido A 4 es el más extenso, con una longitud de 27 aa y también el que presenta más variabilidad a nivel de las secuencias alineadas.

Finalmente, podemos observar que el péptido A 8 se encuentra en una zona donde la secuencia de Veracruz presenta muchas sustituciones y un gap o deleción de los 2 últimos aminoácidos, con lo cual para dicho aislamiento este no es un determinante antigénico probable predicho.

Con respecto a la sustitución conservada producida en la posición 186 del aminoácido Leucina (L) por Isoleucina (I) en Mo7, T2Bo y Veracruz hace que para estos se prediga allí un posible epitope B (dato no mostrado) que para el resto de los aislamientos y cepas no lo es.

Finalmente la sustitución no conservada en la posición 154-155 de los aa Lisina (K)-Asparagina (N) por Ac. Glutámico (E)- Histidina (H) compartido por la cepa y aislamientos argentinos R1A, M3P y M2P colabora a que en esa zona se haya predicho un epitope en la región 153-158 para dichas secuencias y para el resto no.

Otras herramientas que se utilizaron presentes en el mismo sitio del IDBE fueron las de Hidrofilicidad de Parker (1992) y Accesibilidad de Emini (1985).

Las regiones que interactúan con los anticuerpos poseen varias características en común. Ellas son áreas físicamente accesibles de la molécula que están accesibles en la superficie. Como estas regiones están en contacto con en medio acuoso, éstas son típicamente hidrofílicas.

La utilización de los gráficos de hidrofílicidad es una vía común para predecir aquellas regiones superficiales de una proteína que van a poder interactuar con anticuerpos. El programa de computación asigna un “índice hidrofílico” a cada aminoácido, luego se utiliza una ventana de 7 aminoácidos para analizar la región y el valor correspondiente a cada uno de los 7 aminoácidos es introducido y la media aritmética se le asigna al cuarto (i+3) residuo en el segmento. Esto es volcado en un perfil suavizado donde pueden ser vistas las regiones hidrofílicas.

A modo de ejemplo se ilustran los diferentes gráficos obtenidos para la secuencia de la proteína MSA-2c, y los datos que proporciona cada método como los que se desprenden del análisis de dichos gráficos para esta proteína y para MSA-2b y MSA-2a1 se vuelcan en la tabla R. 7.

La figura R. 16. nos muestra el perfil típico de una curva de hidrofiliidad, con la posición aminoacídica en el eje horizontal y la medida o *score* alcanzado en el eje vertical, el umbral esta graficado con una línea horizontal y se corresponde con la media de hidrofiliidad alcanzada que fue de 2,315. Los valores por encima de dicho umbral corresponden a picos de zonas hidrofílicas y los valores graficados por debajo del mismo corresponden a zonas hidrofóbicas.

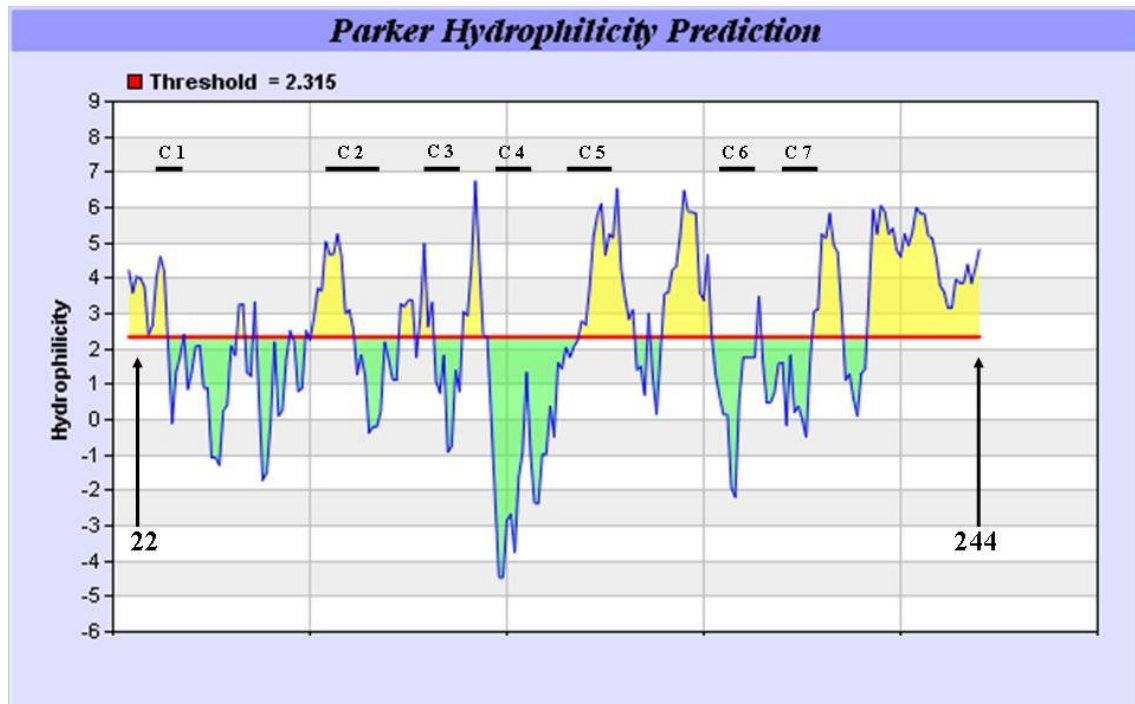


Figura R. 16.: Perfil de Hidrofiliidad de Parker para la secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2c de la cepa vacunal Argentina R1A. En el vertical se grafica el *score* o medida alcanzada. La línea roja horizontal que corresponde a la media de hidrofiliidad se sitúa como umbral con un valor de 2,315. En la parte superior se dibujan en líneas negras la ubicación aproximada de los 7 péptidos predichos por el método de Kolaskar. La flechas indican las posiciones en la secuencia.

En la figura R. 16. podemos observar que el mínimo valor alcanzado para esta proteína fue de - 4,471 alcanzado por los aminoácidos Lisina (K) y Leucina (L) ubicados en las posiciones 119 y 120 respectivamente que están involucrados en uno de los péptidos propuestos (el número C4) por el método semi-empírico seleccionado y el máximo fue de

6,757 en el aminoácido hidrofílico Serina (S) en la posición 113, aunque no coincide con alguno de los péptidos propuestos empíricamente.

Podemos resaltar el hecho de que el valor máximo para la curva de antigenicidad de Kolaskar coincide con la posición destacada como mínimo para este índice de hidrofiliidad, al igual que el mínimo alcanzado en la posición 113 según el método de Kolaskar coincide con la posición para el máximo según el índice de hidrofiliidad.

También podemos mencionar que los péptidos C 4 y C 6 mencionados en la tabla R. 4. son los que poseen más aa en la zona por debajo del umbral de la media y el resto de los péptidos poseen aproximadamente la mitad por encima y la mitad por debajo de dicho umbral.

Por otra parte, se analizaron las características de estos 7 péptidos en un gráfico que muestra el perfil de accesibilidad de la proteína predicha según el método de Emini y puede observarse en la figura R. 17.

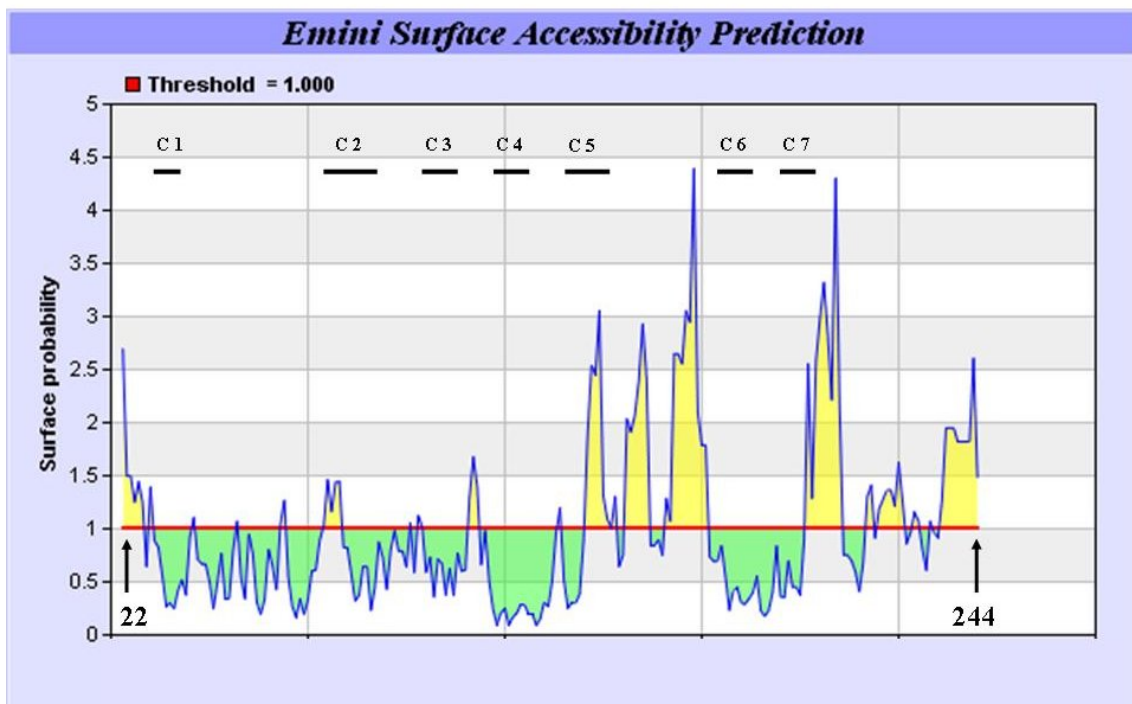


Figura R. 17.: Curva de accesibilidad en la superficie para la secuencia de la proteína MSA-2c de la cepa vacunal argentina R1A determinada por el método de Emini. En el eje de las “abscisas” se observa la probabilidad en la superficie. En la parte superior del gráfico se muestra siete líneas negras que corresponden a los 7 determinantes antigénicos predichos según el método de Kolaskar. La línea roja horizontal indica el umbral y promedio alcanzado, fijado en 1. Las flechas indican la posición en la secuencia.

El promedio de accesibilidad en la superficie alcanzada por toda la secuencia predicha para esta proteína MSA-2c fue de 1, con un valor máximo de 4,393 en la posición 169 ocupada por el aminoácido hidrofílico Asparagina (N) y un mínimo de 0,088 en el aminoácido Ac. Glutámico (E) que ocupa la posición 129.

En la figura también podemos observar que los péptidos predichos registrados como C 4 y C 6 en a tabla R. 4. se encuentran por debajo del umbral de probabilidad de encontrarse en la superficie, y el resto de los péptidos contienen sus aa tanto en zonas accesibles como no accesibles en la superficie siendo el péptido C 5 el que contiene sus aminoácidos más accesibles.

Proteína	Secuencia péptidos	Antigenicidad media	Conservación entre aislamientos (%)	Hidrofilicidad media	Accesibilidad media
MSA-2c	NGSHLLS	1,048	96.1	1,784	0,386
	THDALKAVKQLIKT	1,053	100	1,582	0,654
	TLDLEYLSG	1,039	95,85	1,133	0,569
	ELLKLLIEA	1,085	97,97	-2,186	0,306
	EKTHSFVGES	1,031	96,36	1,993	0,719
	LSNLYKAFI	1,039	97,97	0,308	0,548
	ALRIASEEL	1,026	97,97	0,938	0,416
MSA-2b	VANLITYL	1,067	84,37	-0,675	0,520
	DCSRDALKALNDILVVLKEE	1,071	92,97	0,737	0,494
	TDQVFKSLLERVLLIKK	1,082	47,22	-0,661	0,530
	YYKKHIS	1,027	100	2,176	2,143
	VKDYTFLVKFCNDY	1,077	100	0,650	0,661
	MKIYKAF	1,020	85,71	-0,594	0,756
	EELVKKSPSITPSPIPS	1,041	82,81	2,213	0,893
	AQSHPGPAAPST	1,026	47,75	3,608	0,829
MSA-2a1	VANYIKFL	1,055	93,75	-0,393	0,517
	PDALNAFVYILDF	1,078	87,5	-1,077	0,279
	RDKVPFKTS	1,039	91,66	0,629	0,690
	LQELDQIFNSLRLRVPLIKTKLSAFNA	1,052	85,18	-0,318	0,442
	YKEHICK	1,046	83,92	2,535	0,919
	KDYKTMVKFCND	1,032	98,96	1,375	0,735
	YDELVKKK	1,039	96,87	2,305	1,315
	PSTPSAPSPQ	1,028	88,63	3,769	1,254
	TPAAPSPQG	1,018	93,05	3,594	0,787

Tabla R. 7.: Parámetros estudiados en los distintos epitopes B predichos para las proteínas MSA-2c, MSA-2b y MSA-2a1 de *B. bovis*. La antigenicidad, hidrofiliidad y accesibilidad media de cada péptido predicho se calculó como el promedio del valor obtenido para cada aa según cada método de predicción empleado. La conservación media de cada péptido se calculó como: (número de aa totalmente conservados entre todas las secuencias/el total de aa analizados para ese epitope) x 100.

A los datos volcados en la tabla anterior podemos agregar que para la proteína MSA-2b, la antigenicidad media fue de 1,016, con un mínimo de 0,865 en la posición 145 y 146 en los aa Arginina (R) y Ac. Aspártico (D); y el máximo fue de 1,173 en el aa Valina (V) en la posición 82 en la que se encuentra el péptido B 2 predicho según la tabla R. 5. La hidrofiliidad media para toda la secuencia, según el método de Parker fue de 2,039, con un máximo de 6,314 en la posición 162 donde se encuentra el aa Ac. Aspártico (D), y un mínimo de - 4,071 en la posición 118 donde se encuentra el aa Arginina (R) y que coincide con la ubicación del péptido predicho B 3 según la tabla R. 5. Finalmente al aplicar el método de Emini para calcular la accesibilidad a la superficie, la secuencia de la proteína presentó una media de 1, con un máximo de 4,876 en la posición 151 sobre el aa Tirosina (Y) en donde está ubicado el péptido predicho B 4; y un mínimo de de 0,075 en el aa Leucina (L) ubicado en la posición 81 que abarca al péptido predicho B 2 según la tabla R. 5.

Aplicando los mismos parámetros para el análisis de la secuencia predicha para la proteína MSA-2a1 se encontró que la antigenicidad media según el método de Kolaskar y Tongoankar fue de 1,010, con un máximo de 1,142 en las posiciones 80 y 81 donde se encuentran los aa Isoleucina (I) y Leucina (L) y que corresponde con la ubicación del péptidos predicho A 2 según la tabla R. 6.; y el mínimo de 0,872 se ubico sobre el aa Glicina (G) ubicado en la posición 146. Cuando analizamos la secuencia de acuerdo a su hidrofiliidad según el método de Parker encontramos que la media fue de 2,407 y el máximo fue de 6,6 en el aa Glutamina (Q) ubicado en la posición 244, con un mínimo de - 4,457 hallado en la posición 80 y 81 sobre los aa Isoleucina (I) y Leucina (L) respectivamente y coincidente con la presencia de un epitope B predicho, el A 2 según la tabla R. 6.

Finalmente el análisis sobre la accesibilidad en la superficie de Emini encontramos que la media fue de 1, hallándose el máximo de 4,599 en el aa Ac. Glutámico (E) ubicado en la posición 51, y el mínimo recayó en la posición 78 sobre el aa Valina (V), siendo de 0,083, y coincidente con la ubicación del péptido predicho A 2 según la tabla R. 4.

R. III.2. Selección de epitopes para ensayos de inmunización de ratones

Basados en los péptidos predichos por el método de Kolaskar y Tongaonkar a partir de las secuencias de aa de las proteínas de la familia MSA-2 se seleccionaron 4 péptidos, 2 correspondientes a MSA-2c, uno a MSA-2b y el cuarto perteneciente a MSA-2a1.

Principalmente la elección se basó en los que tenían la media de antigenicidad más alta, seguido del grado de conservación de dichos péptidos entre las secuencias de los distintos aislamientos y cepas. En el caso de los dos péptidos elegidos pertenecientes a la proteína MSA-2c, uno de ellos posee también un promedio de hidrofiliidad alto, mientras que el otro corresponde en principio a una zona hidrofóbica.

En cuanto al péptido seleccionado perteneciente a la secuencia de la proteína MSA-2b aunque no es el que presenta el mayor índice de antigenicidad según el método de Kolaskar y Tongaonkar, si está 100% conservado entre todas las secuencias y es el que presenta mayores medias en cuanto a hidrofiliidad y accesibilidad en la superficie.

Finalmente, para la secuencia de la proteína MSA-2a1, se eligió un determinante antigénico que si bien no era el que presentaba mayor índice de antigenicidad es el que se encuentra mas conservado entre las distintas secuencias, y cuyos valores medios en cuanto a hidrofiliidad y accesibilidad fueron bastante altos.

Los péptidos seleccionados fueron los siguientes: ELLKLLIEA, perteneciente a la proteína MSA-2c y de ahora en más denominado “péptido 1” (P 1); la secuencia YYKKHIS de la proteína MSA-2b y llamado “péptido 2” (P 2); de la secuencia MSA-2a1 se seleccionó KDYKTMVKFCND que se denominó “péptido 3” (P 3) y finalmente la secuencia aminoacídica THDALKAVKQLIKT correspondiente a la proteína MSA-2c también y denominado “péptido 4” (P4). Previo a ser enviados a una firma comercial para su síntesis química, estas secuencias fueron analizadas en cuanto a su composición aminoacídica e hidrofobicidad en el sitio de acceso libre <http://www.sigma-genosys.com/calc/pepCalc.asp>, el cual proporciona advertencias y recomendaciones en cuanto a solubilidad, pureza, rendimiento, estabilidad, dificultad en la síntesis, etc, si es que halla dificultades que se pudieran presentar en estos aspectos.

Para dicho análisis las 4 secuencias se introdujeron con la modificación del agregado de 3 glicinas y una cisteína en el extremo carboxilo terminal y la acetilación en el extremo amino terminal, como se explicó en Materiales y Métodos. Asimismo, en el caso del péptido P 3, se omitió uno de los residuos, el aa final Ac. Aspártico (D) para que no formara un puente con las glicinas.

El resultado arrojado de este análisis puede observarse en la Figura R. 18.

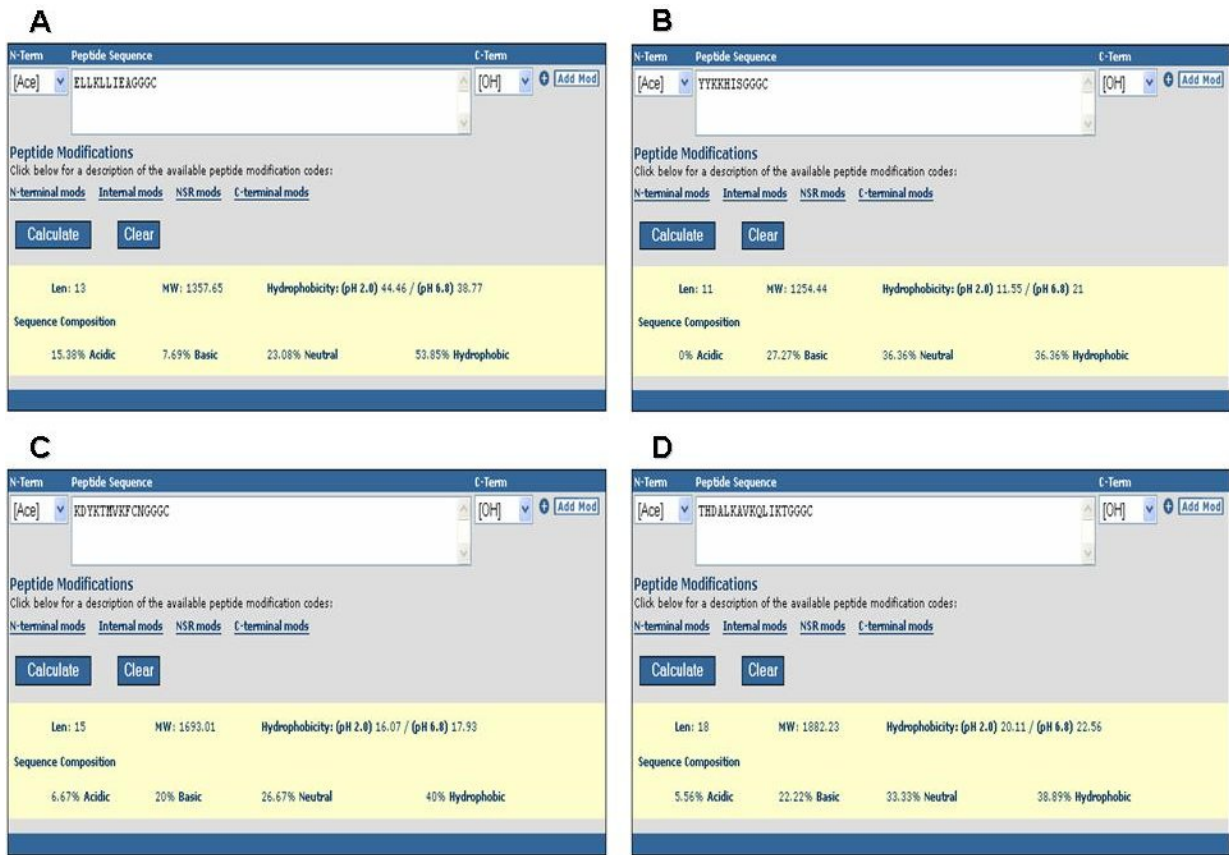


Figura R. 18.: Análisis de los péptidos seleccionados en cuanto a su composición aminoacídica, hidrofobicidad y solubilidad en agua con el programa de acceso libre en el sitio <http://www.sigma-genosys.com/calc/pepCalc.asp>

Como puede observarse en la figura anterior, ninguno de los análisis arrojó objeciones con respecto a posibles dificultades en la solubilización de los mismos y todos deberían según este análisis poder solubilizarse en agua sin inconvenientes.

En dicha figura también podemos observar la composición de la secuencia en cuanto al porcentaje de residuos ácidos, básicos, neutros e hidrofílicos de cada una, como también la hidrofobicidad a dos pH diferentes, uno ácido (pH 2) y otro neutro (pH 6,8).

Se encargaron formas libres y conjugadas a KLH de cada uno de estos péptidos a una firma comercial. Lograron sintetizarse los 4 péptidos con una gran pureza, siendo la misma de 75,79 % para el péptido P 1, 87,91 % para el péptido P 2, 86,4 % para el péptido P 3 y finalmente para el péptido P 4 fue de 87,2 %.

Al momento de solubilizarlos, pese a las predicciones mostradas en la Fig. R. 18., el péptido P 1 resultó soluble en agua sólo cuando estaba unido a la proteína carrier KLH, pero no lo hizo en su forma libre. El péptido P 2, por su parte, se solubilizó sin inconvenientes en

agua tanto en su forma libre como conjugada, mientras que los péptidos P 3 y P 4 no resultaron solubles en agua.

Entonces se calculó la carga neta y atributo de cada péptido de acuerdo a su composición aminoacídica, ya que esto nos da pautas para su posterior solubilización, de acuerdo a ello el péptido 1 resultó ácido con una carga neta de -1, los péptidos 2, 3 y 4 resultaron básicos con una carga neta de 3, 2 y 3, respectivamente.

De acuerdo a esto se intentó la solubilización en 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) en agua, lo cual resultó efectivo para los péptidos insolubles en agua, y se pudo proceder entonces con la inmunización de los ratones.

Antes de la inoculación con los péptidos conjugados a KLH, disueltos de esta manera, se probó la inocuidad de la inmunización con DMSO, procediendo a la formulación de la vacuna con DMSO-PBS para la parte acuosa, en las mismas proporciones que se usó para disolver los péptidos, formulado en adyuvante. Dado que la misma resultó inocua para los ratones, se procedió entonces a formular las vacunas con los péptidos e inoculación de los distintos grupos como se describió en la sección M. 10.1.2.

R. III.3. Reconocimiento de los sueros anti-péptido por merozoitos de *B. bovis*

Se hicieron ensayos de ELISA e inmunofluorescencia para probar el reconocimiento por parte de merozoitos de *B. bovis* de los sueros murinos contra los distintos péptidos obtenidos. De este modo, se pudo analizar experimentalmente si los epitopes B predichos por técnicas bioinformáticas correspondían a regiones antigénicas verdaderas expresadas en los parásitos.

R. III.3.1. ELISA

Se utilizó un ensayo de ELISA en el cual el antígeno consiste en un extracto de mz (descrito en el punto M. 16.1.) para evaluar si los sueros de los ratones inmunizados con los diferentes péptidos eran capaces de reconocer proteínas del merozoito en su estado nativo. Este ensayo se aplica de rutina para el diagnóstico de sueros bovinos en la Estación Experimental Rafaela, INTA. Se estimó un punto de corte para el ELISA mz calculando en primer lugar el promedio de la absorbancia de 3 sueros anti- Mz, al que se le asignó el 100% de positividad. En base a este valor, se calculó el % P para 45 animales evaluados en el T=0. El promedio de dichos valores sumados tres desvíos estándar fue seleccionado como punto de corte y resultó ser 60 %. Los valores iguales o superiores a este punto de corte, fueron considerados positivos para esta prueba. En la Figura R. 19. se grafica el % P alcanzado por

cada suero murino dentro de los grupos de ratones inmunizados ya sea con uno de los 4 péptidos sintéticos, acoplados a KLH (n=10 en cada grupo) o con PBS (n=5), correspondientes al T=70 d.p.i.

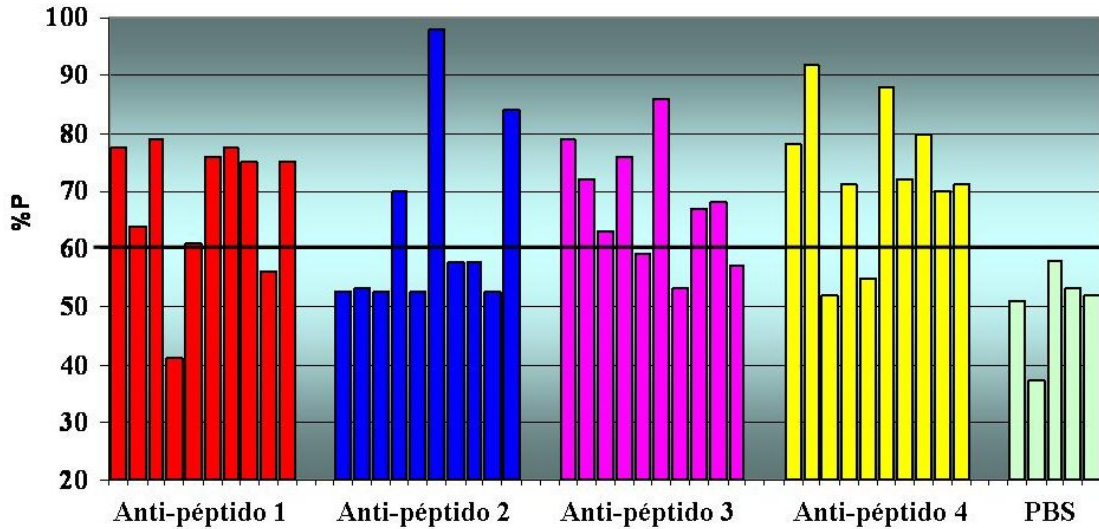


Figura R. 19.: ELISA MZ. Se evaluó el reconocimiento de extractos de mz por sueros del tiempo 70 d.p.i. de ratones inmunizados con el péptido 1 (MSA-2c), 2 (MSA-2b), 3 (MSA-2a1), 4 (MSA-2c) y controles inmunizados con PBS. Las barras indican el valor alcanzado por cada suero expresado como % P. El punto de corte se estableció como la media del % P de 45 sueros al T=0 más 3 D.E., lo que resultó en 60%.

En la figura podemos observar que todos los sueros de los animales vacunados con PBS en el T= 70 d.p.i. están por debajo del punto establecido como corte. Asimismo, en los cuatro grupos de ratones vacunados con preparaciones peptídicas, hubo sueros con niveles de anticuerpos por encima del punto de corte. La eficiencia de las distintas preparaciones para generar una respuesta humoral fue variable, siendo 8/10 para el grupo inoculado con el péptido P1, 3/10 para el grupo inoculado en el péptido P2, 7/10 para el grupo que recibió el péptido P3 y 8/10 para el grupo vacunado con el péptido P4. Estas diferencias pueden deberse al distinto grado de antigenicidad de los péptidos, aunque también hay un cierto grado de error introducido al inocular a cada ratón. Mas allá de las diferencias individuales entre ratones, podemos concluir de este experimento que los cuatro sueros anti-péptido reconocieron proteínas nativas de los mz.

R. III.3.2. Inmunofluorescencia

Habiéndose determinado por ELISA cuáles sueros murinos reconocían extractos crudos de mz, se procedió a llevar a cabo una prueba de inmunofluorescencia, para determinar si el reconocimiento estaba dirigido a la superficie de los parásitos, dado que es la localización esperada para los epitopes B que se predijeron.

Se utilizaron los de la cepa vacunal mexicana RAD para los sueros anti péptido P 1 y P 2, experimentos que fueron realizados en el INIFAP, México y de la cepa vacunal argentina R1A para evaluar los sueros anti péptido P 3 y P 4.

Se probaron varios sueros de cada grupo, incluyendo el grupo control vacunado con PBS-Adyuvante, como así también suero normal de ratón y suero policlonal Anti-MSA-2c, como controles negativo y positivo de la técnica.

En la Figura R. 20. podemos observar fotos de los resultados obtenidos para dos sueros anti péptido P 1 y P 2, como así también del control positivo y negativo.

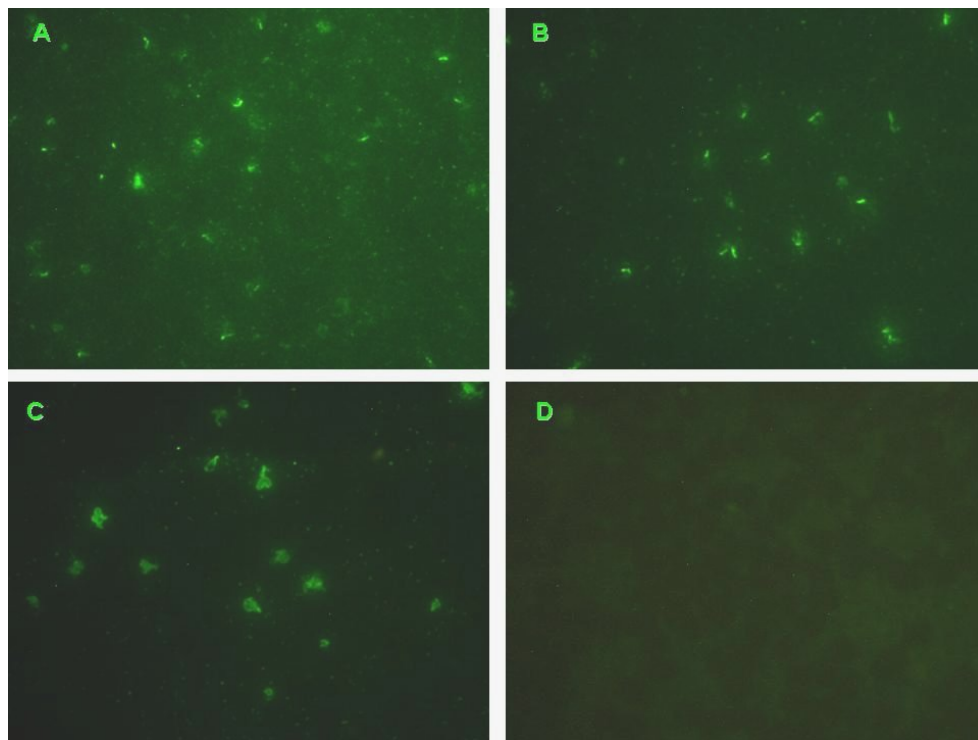


Figura R. 20.: Reconocimiento de los merozoitos de la cepa mexicana RAD de *B. bovis* A través de la técnica de inmunofluorescencia se comprobó la reactividad de los sueros murinos anti péptido 1 (A), anti péptido 2 (B) y anti rMSA-2c (C) y la no reactividad del suero obtenido de ratones inmunizados con PBS-Adyuvante (D), todos correspondientes al T= 70 d.p.i.. Aumento 1000 X.

Si bien la reacción fue débil y tuvo un cierto grado de inespecificidad, se pudo observar una clara reacción de los sueros anti-péptido con la superficie de los merozoitos. Asimismo, pudo verse que el tipo de reacción fue puntilleada.

El control positivo en el que se empleó un suero policlonal anti la forma recombinante de MSA-2c mostró una fuerte reacción, mientras que los preparados en los que se utilizó el suero de un ratón vacunado con PBS-Adyuvante la señal fue muy baja e inespecífica.

R. III.3.3. Sensibilidad a la neutralización de los epitopes B seleccionados

La determinación de epitopes neutralizantes y en general protectores es de vital importancia para el desarrollo de vacunas de eficacia superior, siendo los péptidos de regiones con alta propensión antigénica muy útiles en la identificación de los mismos, especialmente los de naturaleza lineal. Por este motivo, se llevó a cabo un ensayo de neutralización, en el cual se evaluó si los sueros murinos anti-péptido obtenidos tenían capacidad de interferir con la invasión de eritrocitos bovinos por parte de los mz en cultivos *in vitro*.

Se utilizaron sueros correspondientes al tiempo 70 del ensayo, y como control negativo, sueros de ratones inmunizados con PBS-Adyuvante del mismo tiempo. La elección de los sueros a testear se basó en los resultados obtenidos por los sueros en los ensayos de ELISA e inmunofluorescencia. Los detalles de este ensayo están descritos en la Sección M. 13., pero brevemente, los mz fueron incubados con los distintos sueros (30 min, 8 °C), luego de lo cual fueron puestos en cultivo con eritrocitos bovinos. Al cabo de 96 h, se midió el porcentaje de eritrocitos parasitados (PPE) por observación microscópica de frotis teñidos. La significancia estadística de las diferencias entre los valores de las muestras y el control fueron determinadas por el test *t* de Student.

Los PPE obtenidos para cada caso se observan en la tabla R. 8.

Muestra Sueros	PPE
Control PBS	4,5
Anti-Péptido 1	4,7
Anti-Péptido 2	1,2 (*)
Anti-Péptido 3	1,5 (*)
Anti-Péptido 4	6,4
Anti-Mz	1,5 (*)
Anti-MSA-2c	0,8 (*)
Anti-MSA-2b	2,1 (**)

Tabla R. 8.: Ensayo de neutralización de la invasión de eritrocitos. El PPE se calculó como $(N^{\circ} \text{eritrocitos parasitados} / \text{eritrocitos totales}) \times 100$, luego de la observación al microscopio de 5 campos con aproximadamente 450 eritrocitos cada uno a las 96 h. del inicio de la infección *in vitro*. Los resultados muestran el promedio de tres determinaciones paralelas. Los asteriscos entre paréntesis indican el decremento significativo en los valores de PPE respecto del control inoculado con PBS-Ady. (*) $p < 0,005$, (**) $p < 0,01$.

En la misma podemos observar que las disminuciones en los PPE de los antisueros anti P2 y P3 con respecto al control inoculado con PBS-Ady. resultaron significativas con una $P < 0,005$.

Por otra parte, para analizar estos resultados y poder concluir si hubo neutralización de la invasión de los eritrocitos por los merozoitos en alguno de estos casos, se calculó la media de los PPE obtenidos para las muestras tratadas con suero de ratón inoculado con PBS-Adyuvante, y se le resto 3 desvíos estándar. Si los PPE obtenidos en el resto de los grupos están por debajo de ese valor, esto estaría indicando que hubo neutralización de la invasión por parte de esos antisueros, y si el valor de PPE obtenido esta por encima de ese valor podemos señalar que no hubo reducción del porcentaje de los eritrocitos infectados y por lo tanto esos antisueros no neutralizaron la invasión de los merozoitos al eritrocito como puede observarse en la Fig. R. 21.

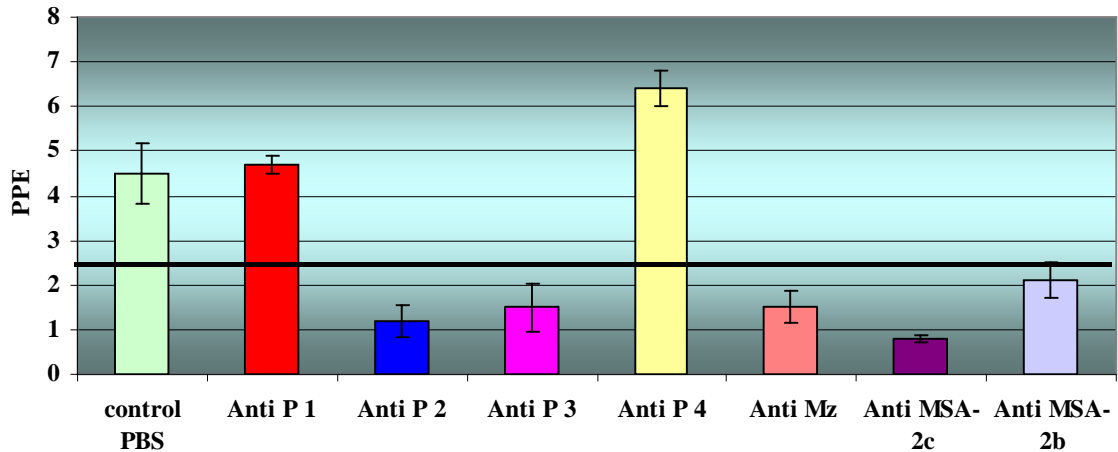


Figura R. 21.: Ensayo de neutralización *in vitro* de la invasión de merozoitos a los eritrocitos. Las barras indican el % de eritrocitos parasitados (PPE) alcanzadas luego de tratar los merozoitos con los diferentes antisueros. La línea negra indica el valor alcanzado por el promedio del PPE de los sueros control menos tres desvíos estándares y que fue de 2, 47.

En la figura podemos observar que tanto el control inoculado con PBS-Ady. como los merozoitos tratados con los sueros anti- P 1 y P 4 alcanzaron valores que superaron el propuesto como corte, es decir que no hubo neutralización de la invasión en esos casos.

En cambio, los PPE obtenidos tanto por los antisueros controles inmunizados con extracto de merozoitos y las proteínas recombinantes MSA-2c y MSA-2b como los correspondientes a los animales inmunizados con el péptido 2 y 3 disminuyeron significativamente su porcentaje de eritrocitos parasitados (PPE) respecto del grupo control. Estos resultados están indicando que los epitopes B representados por los péptidos 2 y 3 son sensibles a la neutralización.

R. III.3.4. Análisis de la potencial capacidad de los péptidos seleccionados de actuar como epitopes T.

A dos de los ratones vacunados con el péptido 1 (de MSA-2c) se les realizó un ensayo de linfoproliferación, previa inmunización 5 días antes con las correspondientes proteínas recombinantes para re-estimular a los linfocitos T de memoria. Luego de la eutanasia de los ratones, seguido de la homogenización de los bazo y obtención de suspensiones de esplenocitos en medio de cultivo, estos fueron expuestos a distintas preparaciones de proteínas o péptidos por 72 h, luego de lo cual se midió la incorporación de ^3H timidina.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R. 22. Cada grupo de barras pertenece a la respuesta de los linfocitos de un mismo ratón inoculado con las preparaciones que se detallan en el eje horizontal frente a diferentes antígenos: proteína recombinante MSA-2c (1/250 y 1/500) que corresponden a aproximadamente 2,5 y 5 $\mu\text{g/pocillo}$; Péptido 1 (1/250 y 1/500), correspondientes a 2 y 4 $\mu\text{g/pocillo}$ respectivamente, una preparación recombinante de EMA-1 de *Theileria equi*, producida en el mismo sistema de MSA-2c, equivalente a aproximadamente 4 $\mu\text{g/pocillo}$ utilizada como control negativo, un extracto crudo de mz de *B. bovis* conteniendo aprox. 4 $\mu\text{g/pocillo}$ y 2 $\mu\text{g/pocillo}$ de Concanavalina A utilizada como control positivo de estimulación. El eje de las ordenadas corresponde al Índice de estimulación (definido como la relación entre las cpm incorporadas por los linfocitos estimulados con los diferentes antígenos y las cpm incorporadas con medio)

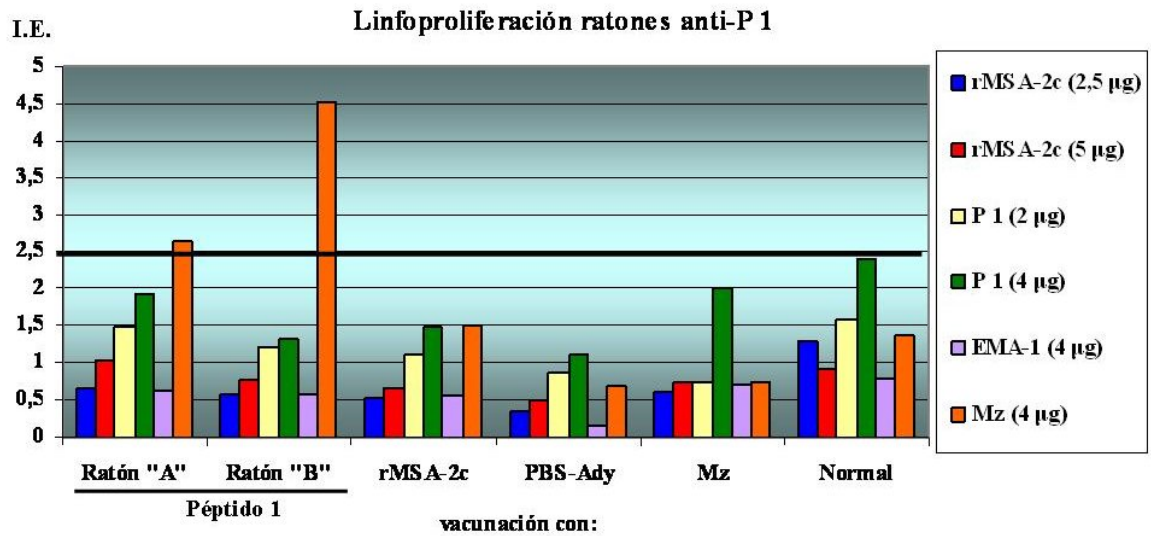


Figura R. 22.: Evaluación de la respuesta inmune celular a través del ensayo de linfoproliferación de los ratones vacunados con el péptido 1. El Índice de Estimulación (I.E.) graficado en el eje vertical se calculó como las cpm incorporadas por los linfocitos estimulados con los diferentes antígenos/las cpm incorporadas con medio. El mismo se consideró positivo al ser $\geq 2,5$, el cual se grafica como una línea horizontal negra. En el eje horizontal se grafican los ratones vacunados con las distintas preparaciones. Cada barra corresponde al antígeno con el cual fueron estimulados que se detallan en el recuadro.

Se puede observar que, en los ratones del grupo inoculado con el P 1 (denominados ratones "A" y "B"), hubo linfoproliferación cuando fueron estimulados con un extracto de merozoitos (I.E. $\geq 2,5$). Esto no ocurre en el ratón del grupo control negativo (inmunizado con PBS-Adyuvante) y en el ratón normal. Tampoco se observó estimulación en ningún caso

cuando los linfocitos fueron enfrentados a dos cantidades distintas del péptido 1 libre ni a la forma recombinante de la proteína MSA-2c. Como era de esperarse la exposición de los linfocitos provenientes de los distintos ratones a la proteína no relacionada EMA-1 no produjo ningún tipo de estimulación.

Por otra parte todos los ratones estudiados presentaron I.E. positivo con el mitógeno Con A el cual fue de 12 para el ratón “A”, 6, 8 para el ratón “B”, 21 para el ratón vacunado con rMSA-2c, 7,57 para el ratón que se vacuno con PBS-Ady, 4 para el que se vacunó con extracto de mz y finalmente 8,41 para el ratón Normal.

Se realizaron experimentos similares con ratones inoculados con péptido 2. Sin embargo no se observó en este caso un efecto estimulante de la proliferación al ser expuestos los linfocitos a preparaciones de mz, como se obtuvo con el péptido 1.

R. IV. Resultados Capítulo IV: Desarrollo de métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina basados en un miembro del grupo MSA-2

R. IV.1. Epitopes B de la proteína MSA-2c son reconocidos específicamente por el sistema inmune de bovinos infectados con *B. bovis*.

Habiéndose observado que los antígenos MSA-2 poseen epitopes B conservados entre aislamientos geográficos distantes de *B. bovis* (R. II.2.), y dado que MSA-2c es el miembro más conservado de este grupo, se evaluó si éste antígeno era capaz de estimular el sistema inmune bovino durante una infección con este parásito, dando lugar a una respuesta humoral.

Para ello, se probó por medio de un Western blot, si una forma recombinante de MSA-2c reaccionaba con un suero de un bovino experimentalmente infectado con la cepa vacunal R1A de *B. bovis*, cedido por el Dr. Ignacio Echaide (INTA-Rafaela). Como control negativo se utilizaron sueros de animales no infectados. La figura R. 23. muestra la reacción positiva del suero bovino inmune hacia la proteína rMSA-2c. Asimismo, se observa una reacción positiva del suero contra (i) MSA-2b, otro antígeno del grupo MSA-2; (ii) MSA-1, antígeno que pertenece junto con las MSA-2 al grupo VMSA; (iii) RAP-1, antígeno localizado en las roptrias de *B. bovis*. Tanto MSA-1 como RAP-1 habían sido previamente caracterizadas como inmunodominantes (Hines, S.A. *et al.*, 1995; Suarez, C. *et al.*, 1993 y 2000); mientras que para MSA-2c y MSA-2b, sólo se sabía que generaban una respuesta de anticuerpos en bovinos infectados con la cepa mexicana Mo7 (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002).

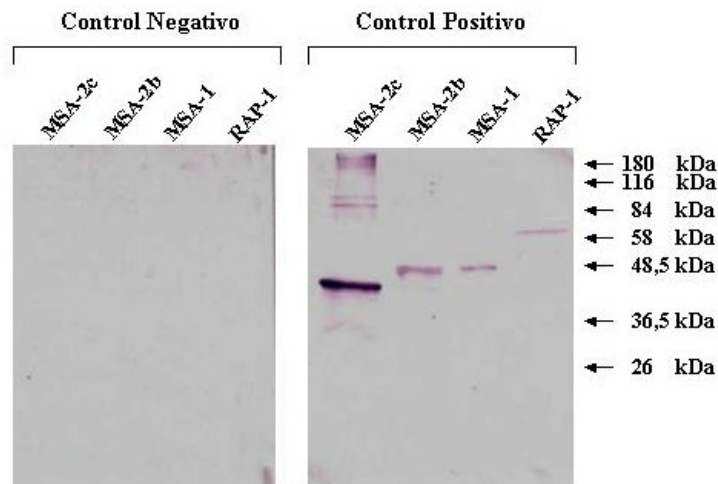


Figura R. 23.: Western blot mostrando la reactividad de un suero proveniente de un bovino experimentalmente infectado con la cepa R1A de *B. bovis* y de un animal negativo hacia formas recombinantes de MSA-2c, MSA-2b, MSA-1 y RAP-1.

Dado que se observó reacción positiva del suero contra rMSA-2c, se procedió a analizar un número mayor de sueros, provenientes de infecciones experimentales y naturales. Todos los sueros fueron previamente analizados por inmunofluorescencia tanto para *B. Bovis* como para *B. bigemina* y *A. marginale*. Asimismo, se probó la reacción contra MSA-2c de sueros positivos por inmunofluorescencia para *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*, dado que es común hallar en animales de campo co-infección con estos hemoparásitos.

La dilución de suero utilizada para un primer abordaje fue de 1:50, independientemente del título de anticuerpos o el estado de la enfermedad.

En la Tabla R. 9 se muestran los resultados obtenidos.

Agente infeccioso	Origen de la infección	Reactividad contra rMSA-2c
Ninguno	N/C	0 (<i>n</i> = 5)
<i>B. bovis</i>	Experimental (cepa R1A)	8 (<i>n</i> = 8)
<i>B. bigemina</i>	Experimental (cepa S1A)	0 (<i>n</i> = 8)
<i>A. marginale</i>	Natural	0 (<i>n</i> = 5)
<i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	Experimental (cepas R1A y S1A)	7 (<i>n</i> = 7)
<i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> y <i>A. marginale</i>	Natural (provincia de Salta, Argentina)	13 (<i>n</i> = 15)
<i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	Natural	0 (<i>n</i> = 2)

Tabla R. 9: Reactividad de diferentes sueros bovinos hacia rMSA-2c. La reactividad de sueros provenientes de bovinos natural o experimentalmente infectados con *B. bovis*, *B. bigemina* y/o *A. marginale* contra rMSA-2c purificada se testeó por Western blot. El número de reacciones positivas hacia rMSA-2c se agrupó de acuerdo al agente infeccioso y origen de la infección. *n*: corresponde al número total de bovinos por grupo y se muestra entre paréntesis.

En dicha tabla podemos observar que todos los animales experimentalmente infectados con la cepa R1A de *B. bovis* o con esta y la cepa S1A de *B. bigemina* reaccionaron con rMSA-2c. Además, los sueros de 13 de 15 animales naturalmente infectados con aislamientos de campo de *B. bovis* (Salta, Argentina) reaccionaron positivamente con este antígeno. No se observó reacción positiva cuando se evaluó el suero proveniente de bovinos natural o experimentalmente infectados con *B. bigemina* y/o *A. marginale*.

Estos resultados muestran que MSA-2c contiene epítopos B que son específicamente reconocidos por el sistema inmune de bovinos infectados con *B. bovis*. Es importante mencionar que rMSA-2c también fue reconocida por el suero proveniente de la mayoría de los bovinos naturalmente infectados que se testearon, indicando la conservación de los altamente inmunogénicos epítopos B en los aislamientos de campo de *B. bovis*. Estas características sugirieron que rMSA-2c puede ser útil para el desarrollo de técnicas diagnósticas para la babesiosis bovina causada por *B. bovis*.

R. IV. 2. Desarrollo de un ELISA indirecto.

En vista de los resultados descritos en la sección R. I.2 y R. I.3., se desarrolló un test de ELISA indirecto basado en MSA-2c para la detección de inmunoglobulinas G contra *B. bovis*. Asimismo, dado que el antígeno RAP-1 había sido caracterizado por otros autores como candidato diagnóstico (Goff, W. *et al.*, 2003b; Boonchit, S., *et al.*, 2002; Suárez, C. *et al.*, 1991a), se desarrolló en forma paralela un ELISA indirecto basado en esta proteína, con fines comparativos.

Para estos tests, se utilizaron formas recombinantes de MSA-2c y RAP-1 obtenidas y purificadas del mismo modo, como puede observarse en la figura R. 4. para MSA-2c y en la figura R. 24. para RAP-1, la cual fue gentilmente cedida por la Dra. Marisa Farber. En el caso de MSA-2c, la forma recombinante corresponde al marco de lectura abierto completo. En cambio en el caso de RAP-1, la forma recombinante corresponde a un segmento de 248 aminoácidos de la región carboxilo-terminal.

Muchos son los parámetros que se pueden variar para establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo un ELISA. Entre ellos, los que consideramos de mayor importancia, fueron: titulación de antígenos, pre-absorción de los sueros y tipos de bloqueantes.

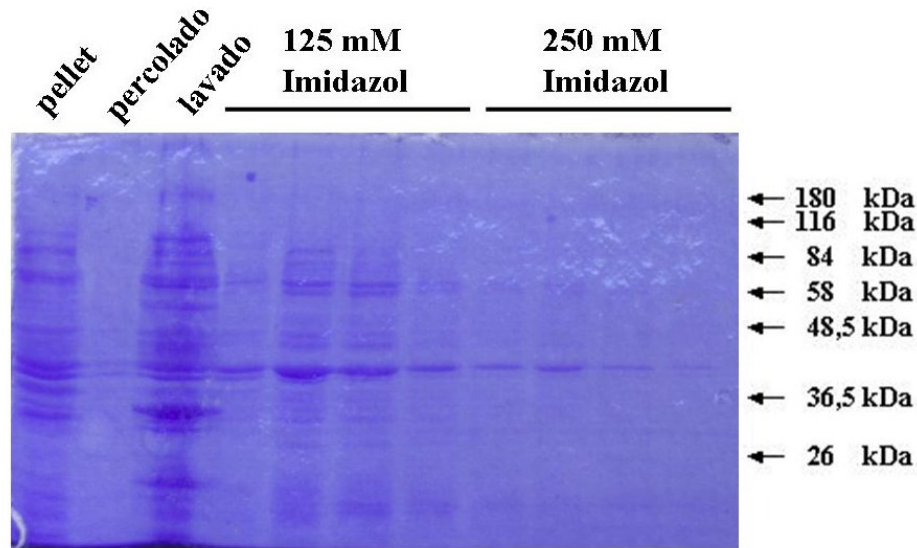


Figura R. 24.: Gel de poliacrilamida mostrando el producto de cada uno de los pasos de la purificación de la proteína rRAP-1. Se observa en este caso una mejor elución con una concentración de 250mM de imidazol. La forma recombinante de RAP-1 tiene un peso molecular esperado de 43,28 kDa.

R. IV. 2.1. Titulación de los antígenos.

La titulación de antígenos permite determinar la concentración óptima de los mismos en que se pegarán a las placas. Esto es importante para poder encontrar una concentración donde se alcance el mayor rango de absorbancia para distintas diluciones de anticuerpo. Si se fija poca cantidad de proteína en los pocillos, menor será el poder de detección (sensibilidad). Si, por el contrario, se pega mayor cantidad de proteína que la concentración óptima, entonces puede ocurrir una inhibición estérica de los antígenos, que impiden el pegado de los anticuerpos. La cantidad de antígeno que comúnmente se usa para llegar a la saturación del pocillo, se encuentra entre 50 a 500 ng/pocillo; esto equivale a una concentración que va de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, si se sensibiliza con 50 $\mu\text{l/pocillo}$.

Para la titulación de antígenos se utilizó una técnica levemente modificada descrita en Elisa: Theory And Practice (Crowther, J.R., 1995a; 1995b). Simplemente consiste una dilución seriada del antígeno y en forma perpendicular una dilución única, en este caso del suero positivo con anticuerpos como de un suero negativo sin anticuerpos específicos.

En la Figura R. 25. se grafican los resultados obtenidos en el caso de MSA-2c.

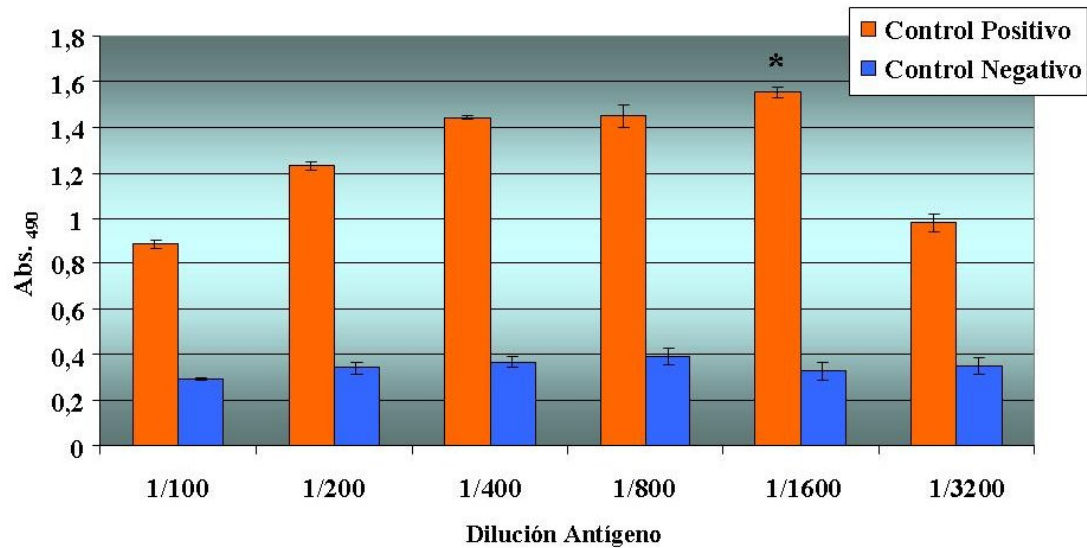


Figura R. 25: Titulación del antígeno recombinante MSA-2c, utilizando una dilución 1/100 de los sueros control positivo y negativo. Los valores graficados en el eje de las ordenadas corresponden a la absorbancia medida a 490 nm ($Abs_{490\text{ nm}}$). En el eje de las abscisas se representan las diluciones de antígeno evaluadas. Se indica con un asterisco la dilución óptima de uso.

En la figura precedente podemos observar que la dilución óptima para pegar en la placa correspondiente al antígeno recombinante MSA-2c es 1/1600, la cual se señala con un asterisco en la parte superior. Dicha dilución corresponde a la máxima absorbancia alcanzada por el suero control positivo y la máxima diferencia obtenida entre las absorbancias de los sueros positivo y negativo, y equivale a 8,5 ng de proteína por pocillo.

El mismo procedimiento se llevo a cabo para la titulación de la forma recombinante de la proteína RAP-1 volcándose los resultados obtenidos en la Figura R. 26.

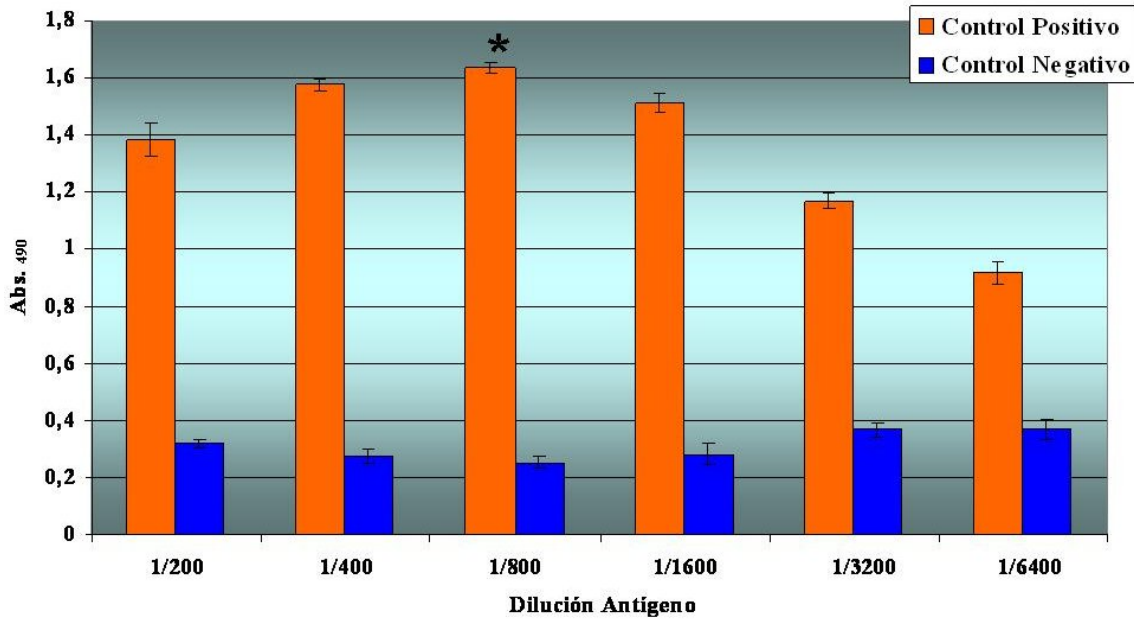


Figura R. 26.: Titulación del antígeno recombinante RAP-1, utilizando una dilución 1/100 de los sueros control positivo y negativo. Los valores graficados en el eje de las ordenadas corresponden a la Abs._{490 nm} +/- el desvío estándar. En el eje de las abscisas se representan las diluciones de antígeno evaluadas. Se indica con un asterisco la dilución óptima de uso.

Como se puede observar la dilución óptima de antígeno seleccionada fue de 1/800, ya que esta dilución ofreció la mayor absorbancia óptica para el suero positivo y además mantuvo la máxima diferencia entre la muestra control positiva y la muestra control negativa. Esta dilución equivale a 8 ng proteína por pocillo.

R. IV. 2.2. PreadSORCIÓN de los sueros

Como se describió en la sección Materiales y Métodos, los antígenos recombinantes utilizados fueron producidos en cultivos de *E. coli*. Si bien se obtuvo un alto grado de pureza utilizando cromatografía de afinidad, las preparaciones finales presentaban contaminación con antígenos bacterianos. Estos pueden dar falsos positivos en los tests de ELISA, ya que los sueros bovinos normalmente contienen anticuerpos anti-antígenos de *E. coli*. Por esta razón, se llevó a cabo un experimento para establecer si era necesario preincubar los sueros bovinos con un extracto de *E. coli* para adsorber los anticuerpos contra estos antígenos inespecíficos y en caso positivo, establecer la cantidad de antígeno de *E. coli* necesaria. La preparación del extracto de *E. coli* y la incubación de los sueros se efectuaron como se describe en la sección M. 16.2.2. Se compararon un suero positivo y otro negativo utilizando diluciones fijas del antígeno MSA-2c (1/1600) y RAP-1 (1/800) y de los sueros (1/100), variando los porcentajes

de extracto celular con los que se preadsorbió el suero. A modo de ejemplo se grafica la respuesta obtenida para la proteína MSA-2c se que se puede visualizar en la Figura R. 27.

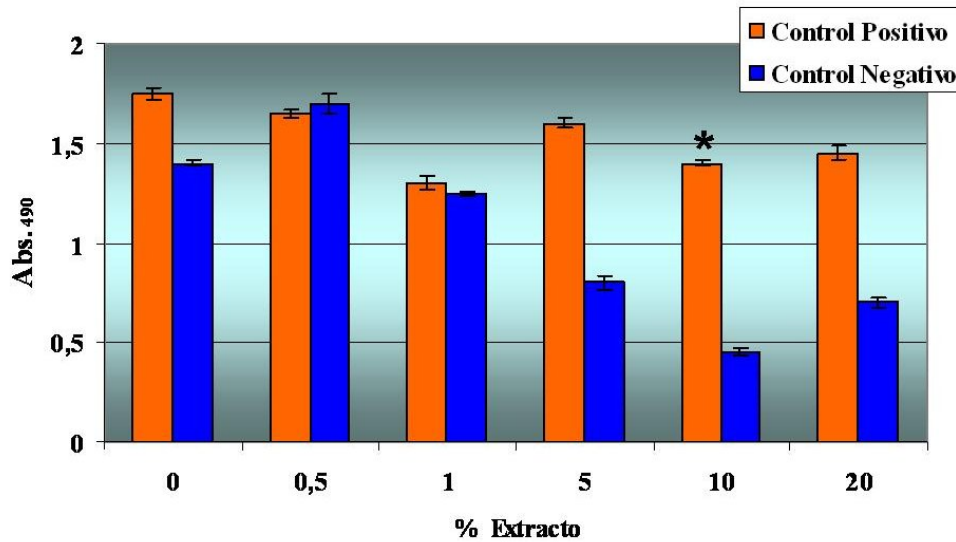


Figura R. 27.: Efecto de la preincubación de los sueros con distintas concentraciones de extracto de *E. coli* en la detección de anticuerpos anti-MSA-2c por ELISA. Se grafica la Absorbancia a 490 nm (Abs._{490 nm}) por un suero control positivo y negativo versus distintos porcentajes de extracto bacteriano. El asterisco indica el porcentaje seleccionado, en el que se obtuvo la mayor reducción del pegado inespecífico del suero negativo.

Se observa claramente que, en sueros sin preadsorber, las diferencias obtenidas entre sueros positivos y negativos son mínimas o inexistentes. Por otra parte, las diferencias se van acrecentando a medida que se aumenta la concentración de extracto bacteriano utilizada. Dados estos resultados, se decidió en este estudio preadsorber todos los sueros con un 10% (v/v) de extracto de *E. coli*. Esto es equivalente a una concentración final de 0,2 mg/ml de proteína bacteriana (medición hecha por la técnica de Bradford).

Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó RAP-1 como antígeno.

R. IV.2.3. Tipos de bloqueantes.

El bloqueo de las placas tiene como finalidad evitar la absorción inespecífica del anticuerpo a testear y del conjugado enzimático. Es fundamental en el desarrollo de un test de ELISA establecer las condiciones óptimas de bloqueo. En este estudio, se analizó la efectividad de cuatro agentes bloqueantes: leche, gelatina (Gelat.), ovoalbúmina (Ova) y suero normal equino (Sne).

Las absorbancias obtenidas para el suero control positivo como para el suero control negativo se graficaron en función de los distintos bloqueantes para ambas proteínas

recombinantes MSA-2c y RAP-1. A modo de ejemplo los resultados obtenidos utilizando como antígeno rMSA-2c se grafican en la Figura R. 28.

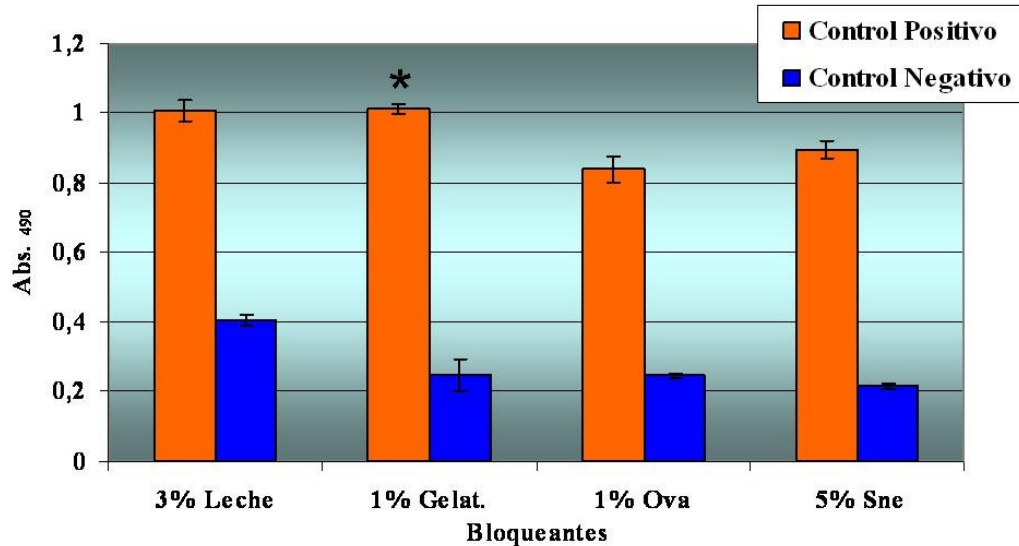


Figura R. 28: Efecto de cuatro tipos de agentes bloqueantes (leche, gelatina, ovoalbúmina y suero normal equino) utilizando rMSA-2c como antígeno. En el eje de las abscisas se observa la densidad óptica alcanzada +/- el desvío estándar tanto por el suero control positivo (naranja) como negativo (azul) de acuerdo a los agentes bloqueantes utilizados, graficado en el eje de las ordenadas. El asterisco señala el bloqueante seleccionado.

En dicha figura podemos observar la disminución del pegado inespecífico del suero negativo de acuerdo al bloqueante utilizado. La sustancia elegida como bloqueante fue gelatina ya que fue con la que se obtuvo mayor densidad óptica para el suero positivo (junto con la leche) y conjuntamente se disminuyó el pegado inespecífico del suero negativo de manera de obtenerse la mayor diferencia entre ambos sueros controles evaluados.

Resultados similares fueron obtenidos para la utilización de rRAP-1 como antígeno, eligiéndose el mismo agente bloqueante.

R. IV.3. Uso de los ELISAI para evaluar sueros provenientes de infecciones experimentales: comparación entre RAP-1 y MSA-2c en infecciones con R1A y S2P

Utilizando los protocolos de ELISA desarrollados en este trabajo, se analizó la evolución a lo largo del tiempo de los niveles de IgG totales contra los antígenos MSA-2c y RAP-1 en 4 bovinos infectados experimentalmente con *B. bovis*. Dos de ellos (S/C y 3181) fueron inoculados con la cepa atenuada R1A y los otros dos (3083 y 3142) con la cepa patógena S2P. Se midieron los títulos de anticuerpos contra los mencionados antígenos en

muestras de suero obtenidas a los días 0, 10, 15, 21, 28, 35, 42, 52, 59 y 66 posteriores a la infección. El título se calculó como el valor del logaritmo decimal de la inversa de la máxima dilución de suero para la cual la absorbancia duplicaba el valor obtenido al tiempo cero.

Los resultados se muestran en las Figuras R. 35. y R. 36., donde se han graficado los valores promedio de muestras triplicadas de suero +/- la desviación estándar.

R. IV.3.1. MSA-2c

Los títulos obtenidos de los sueros inoculados con la cepa atenuada y patógena contra la forma recombinante de la proteína MSA-2c de *B. bovis* se muestran en la Figura R. 29. Cabe aclarar que cuando los títulos fueron inferiores a 1,7 (que corresponde a una dilución 1/50, la mínima que se utilizó en este experimento), se utilizó el valor 0,2 de modo simbólico para expresar que el título corresponde a un valor menor a 1,7.

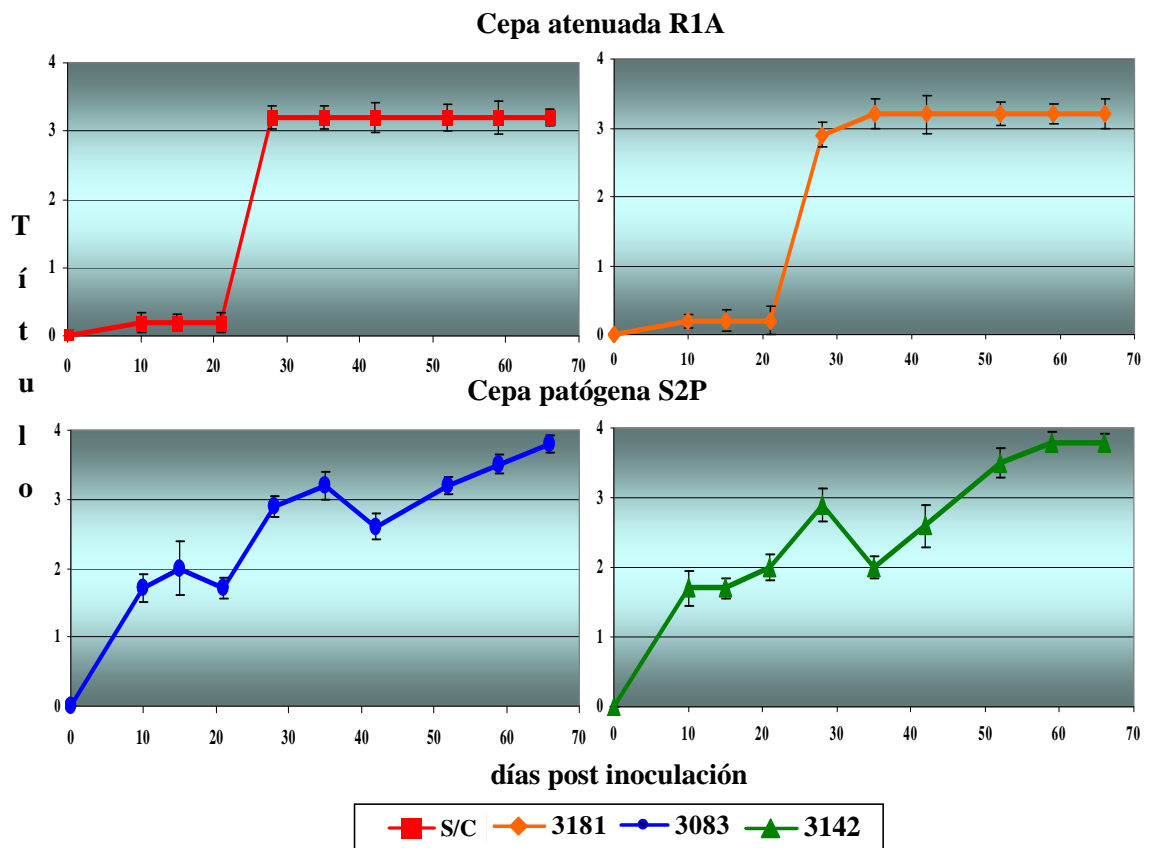


Figura R. 29.: Título de anticuerpos anti-MSA-2c en dos animales infectados con la cepa atenuada R1A y en dos animales con la cepa patógena S2P. Se grafican los títulos de anticuerpos obtenidos de cada día que se extrajo sangre al animal, expresado en función del \log_{10} de la inversa de la máxima dilución de suero para la cual la absorbancia óptica duplicaba el valor obtenido al tiempo cero.

Puede observarse que en ambos animales infectados con la cepa atenuada R1A (S/C y 3181), los títulos anti-MSA-2c se mantienen bajos hasta el día 21, aumentando luego bruscamente y alcanzando un pico en el día 28 que se mantiene así hasta el final del período de observación (día 66). Por otra parte en los animales infectados con la cepa patógena S2P (3083 y 3142), los títulos anti-MSA-2c comienzan a subir inmediatamente luego de la inoculación, alcanzando valores altos ya hacia el día 10 y continúan subiendo progresivamente durante todo el período de observación.

Es importante destacar que estas diferencias no serían debidas a un tamaño diferente de inóculo de parásitos, ya que los dos animales inoculados con S2P tuvieron inóculos diferentes (10^5 para 3083 y 10^7 para 3142), y sin embargo, sus perfiles de anticuerpos son muy similares.

R. IV.3.2. RAP-1

Los títulos obtenidos cuando se utilizó la forma recombinante de la proteína RAP-1 de *B. bovis* se muestran en la Figura R. 30. Al igual que en el caso anterior, es importante aclarar que cuando los títulos fueron inferiores a 1,7 (que corresponde a una dilución 1/50, la mínima que se utilizó en este experimento), se utilizó el valor 0,2 de modo simbólico para expresar que el título corresponde a un valor menor a 1,7.

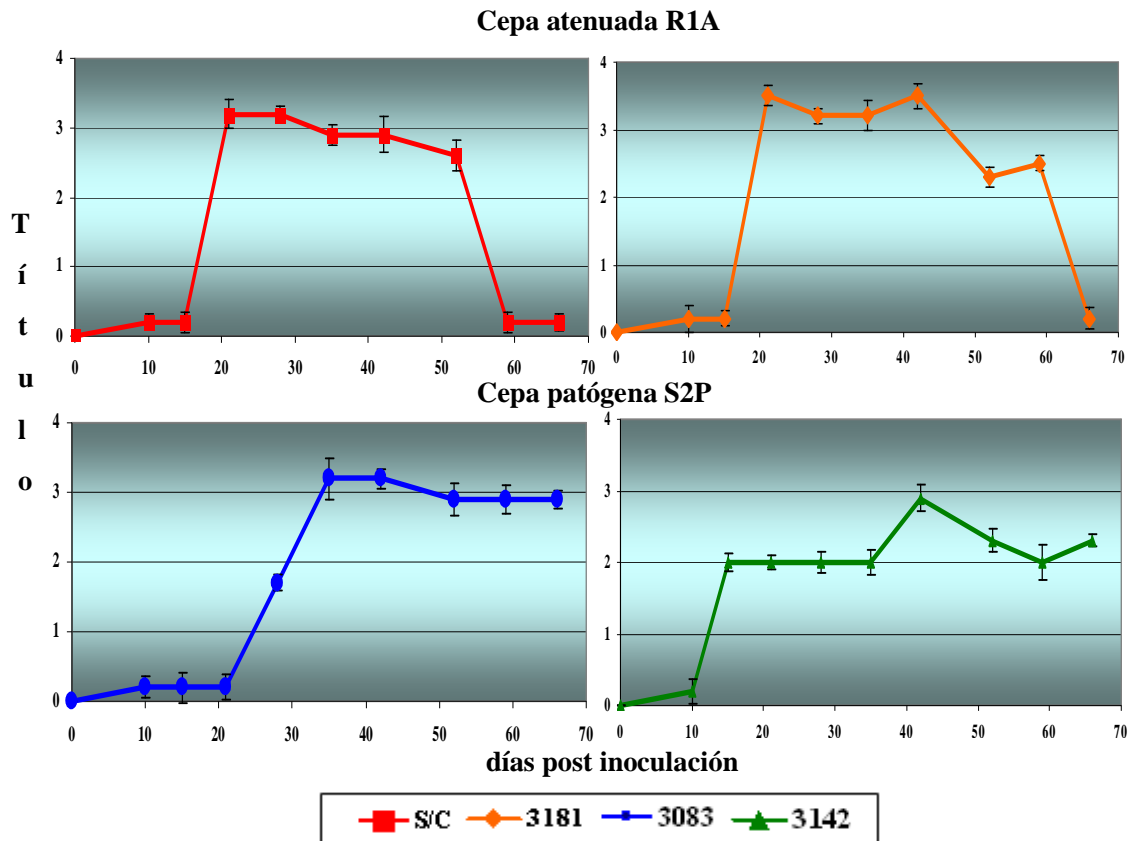


Figura R. 30.: Título de anticuerpos anti-RAP-1 en dos animales infectados con la cepa atenuada y en dos animales con la cepa patógena. Se grafican los títulos de anticuerpos obtenidos de cada día que se extrajo sangre al animal, expresado en función del \log_{10} de la inversa de la máxima dilución del suero cuya absorbancia duplica la del suero en el tiempo cero.

En la figura anterior podemos observar que para el caso de los animales que sufrieron infección con la cepa atenuada R1A, los títulos suben abruptamente después del día 15 y alcanzan su pico en el día 21. Luego mantienen un *plateau* ligeramente descendente hasta el día 50 en un caso y 59 en otro, para luego disminuir abruptamente y llegar a valores mínimos en el día 59 (S/C) o 66 (3181), respectivamente. Esta brusca disminución de los títulos anti-RAP-1 no se observa en los animales infectados con la cepa patógena S2P. En este caso, la evolución de los títulos es ligeramente diferente entre los dos animales, siendo más rápida en el caso del animal 3142, donde se detectan anticuerpos antes (día 10) y también llega antes al *plateau* (día 15) que en el caso del animal 3083, en que recién se comienzan a detectar anticuerpos a partir del día 28 y se alcanza el *plateau* en el día 35. Sin embargo, en ambos casos, la respuesta se mantiene alta hasta el final del experimento, sin observarse disminuciones abruptas de los títulos, como en los animales infectados con R1A. Las

diferencias observadas entre los dos animales infectados con S2P podrían deberse al número de parásitos con que se inoculó a cada animal, ya que el animal de respuesta más rápida (3142) recibió una mayor dosis (10^7 parásitos) que el animal 3083, de respuesta más lenta (10^6 parásitos).

Las diferencias en la detección de anticuerpos anti-RAP-1 en infecciones experimentales con las dos cepas analizadas podrían deberse a una diferente dinámica en la expresión de antígenos en estos dos tipos de parásitos. Esto es particularmente interesante dado que se trata de una cepa atenuada y una patógena y son pocas las diferencias encontradas hasta el presente, que correlacionen con la virulencia de una cepa. Estos resultados serán discutidos más extensamente en la discusión.

Independientemente a estas consideraciones, estos experimentos ponen de manifiesto que MSA-2c resultó más eficiente que RAP-1 en la detección de anticuerpos específicos durante infecciones experimentales.

R. IV.3.3. Utilización del ELISA indirecto contra MSA-2c y RAP-1 para analizar muestras de campo.

En una siguiente etapa, se utilizaron los tests de ELISAi basados en MSA-2c y RAP-1 para la detección de anticuerpos contra dichas proteínas en 139 muestras de campo provenientes de una zona endémica para babesiosis bovina del Noroeste argentino.

R. IV.3.3.1. Calculo del cut-off

Una vez ajustadas las condiciones óptimas del ensayo, se procedió al análisis de un número significativo de sueros en una dilución única a testear de 1/100 y por duplicado, con el fin de determinar el punto de corte o *cut-off* en cada caso. Para ello se evaluaron 85 sueros negativos provenientes de bovinos de la provincia de Buenos Aires, libre de babesiosis bovina, y 30 sueros positivos caracterizados por un ELISA de merozoitos y provenientes de un ensayo de vacunación y desafío, como se menciona en la sección M. 10.2.3. En primer lugar se calculó el promedio de las replicas y luego ese promedio se expresó como porcentaje de positividad (%P) frente a un control positivo colocado en cada placa, al cual se le asignó el valor de 100 %. Este control positivo consistió en un suero cedido por los Dres. Ignacio Echaide y Susana Torioni de Echaide de la E.E.A Rafaela, proveniente de una infección experimental y utilizado por su grupo como control en el ELISA de merozoitos.

Los valores obtenidos se analizaron por el método estadístico de curvas ROC del

programa MedCalc. Los resultados obtenidos para rMSA-2c se presentan en la figura R. 31.

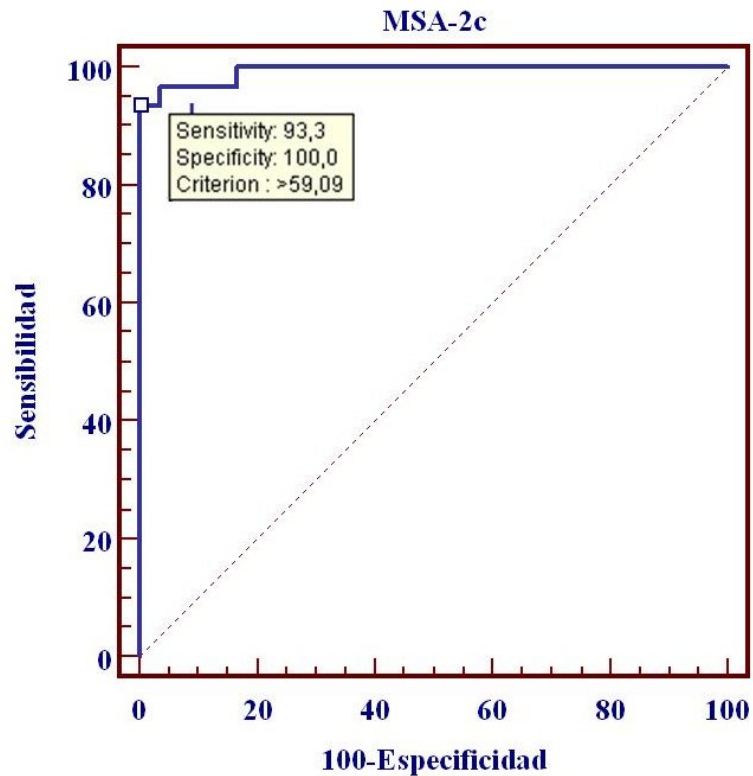


Figura R. 31.: Análisis de curvas ROC para el iELISA con rMSA-2c como antígeno, en el que se evaluaron 85 sueros negativos y 30 positivos. Se grafica los valores de sensibilidad en el eje de las ordenadas y los de especificidad (100-E) en el eje de las abscisas.

En la figura precedente se puede observar el dibujo arrojado por el programa en el cual se brinda el punto de corte y los valores de sensibilidad y especificidad correspondientes a dicho valor. El cuadrado indica el punto con más alta precisión para los datos analizados. Luego con el mismo programa se graficó el diagrama interactivo, el cual puede observarse en la figura R. 32., el mismo permite mover la línea negra horizontal correspondiente al punto de corte y ver como varía de esa manera la sensibilidad y especificidad.

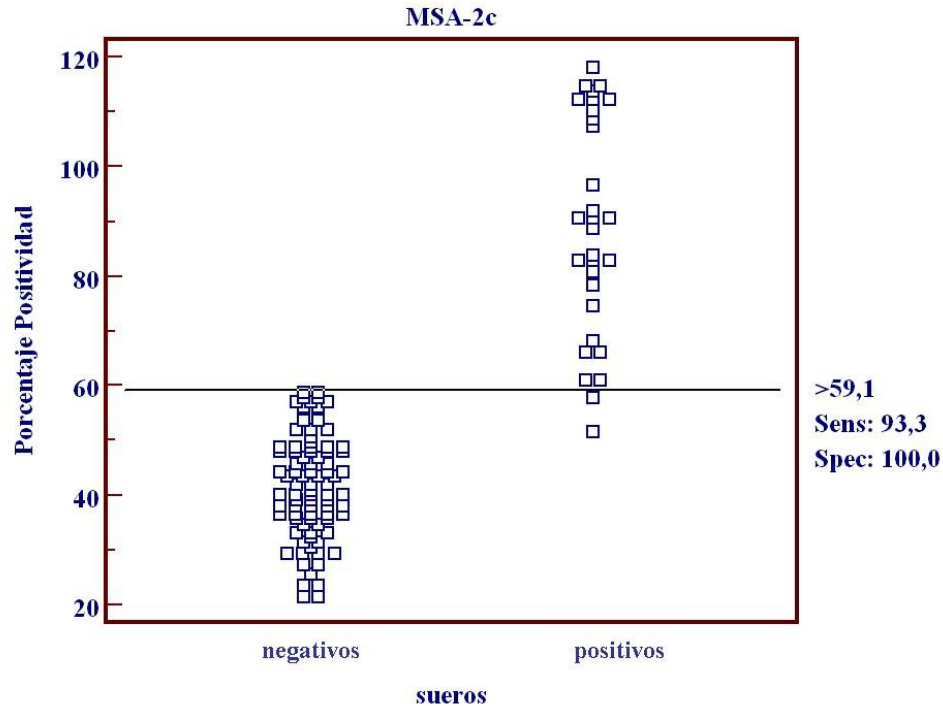


Figura R. 32.: Diagrama interactivo del análisis ROC para los datos obtenidos por iELISA con MSA-2c como antígeno. Se grafica el porcentaje de positividad alcanzado por las 85 muestras negativas y 30 positivas evaluadas. La línea negra horizontal indica el punto de corte seleccionado en el que se incluyen todas las muestras negativas, y los valores de sensibilidad y especificidad que lo acompañan.

De acuerdo a lo observado en la figura R. 32. se decidió no modificar el valor predeterminado arrojado ya que como se observa con dicho valor de 59,1% se incluyen todos los valores correspondientes a los sueros negativos analizados. Por lo tanto para el caso de utilizar la proteína recombinante MSA-2c como antígeno recombinante el punto de corte para el ELISA indirecto es de 59,1 % con el cual se obtiene una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 93,3 % ya que 2 de los 30 sueros positivos que se evaluaron resultaron negativos por este ensayo

De igual manera se procedió a analizar los datos obtenidos cuando se utilizó la proteína recombinante RAP-1 como antígeno, con el software estadístico MedCalc.

El análisis de curvas ROC para los 85 sueros negativos y 30 sueros positivos estudiados arrojó el gráfico que se observa en la figura R. 33.

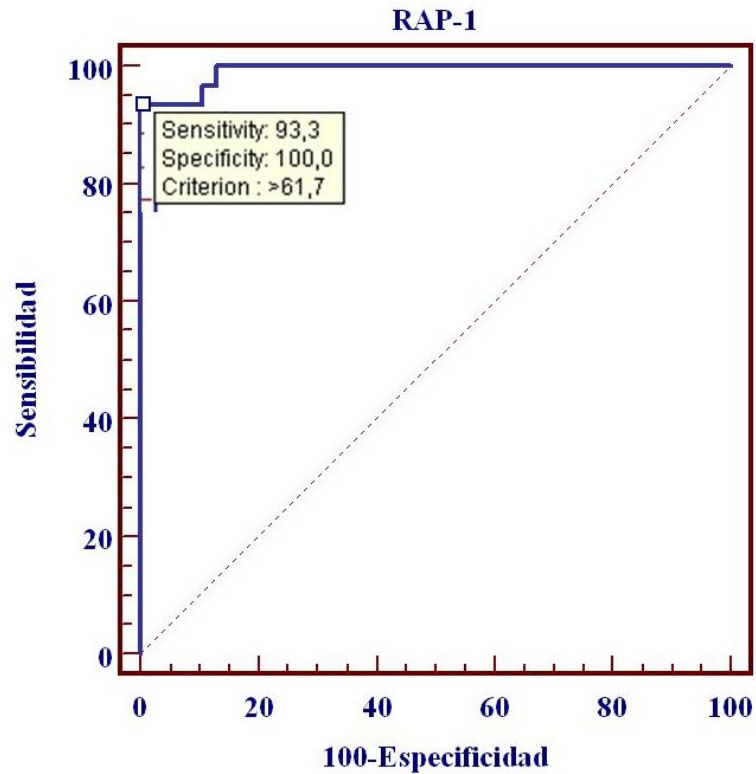


Figura R. 33.: Análisis de curvas ROC para el iELISA con rRAP-1 como antígeno, en el que se evaluaron 85 sueros negativos y 30 positivos. Se grafica los valores de Sensibilidad en el eje de las ordenadas y los de Especificidad (100-E) en el eje de las abscisas.

Nuevamente podemos observar en la figura precedente con un cuadrado vacío el punto de más alta precisión obtenido y la especificidad y sensibilidad que lo acompañan a dicho punto de corte.

Cuando se efectuó el análisis que brinda por el diagrama interactivo del programa, se obtuvo el dibujo que se grafica en la Figura R. 34.

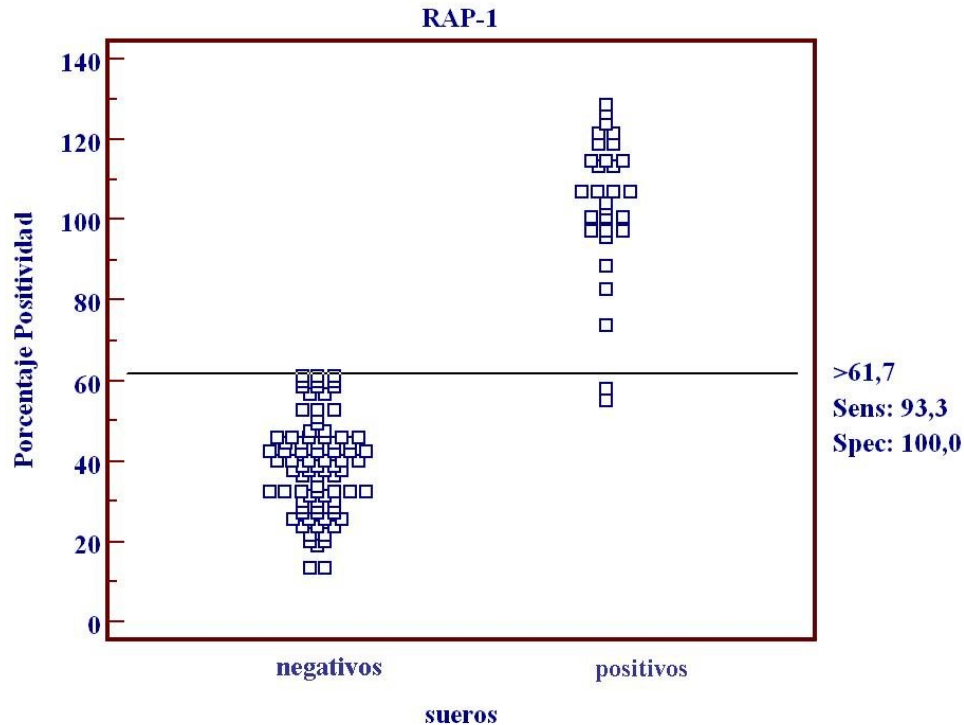


Figura R. 34.: Diagrama interactivo del análisis ROC para los datos obtenidos por iELISA con rRAP-1 como antígeno. Se grafica el porcentaje de positividad alcanzado por las 85 muestras negativas y 30 positivas evaluadas. La línea negra horizontal indica el punto de corte seleccionado en el que se incluyen todas las muestras negativas, y los valores de sensibilidad y especificidad que lo acompañan.

Nuevamente el valor obtenido como punto de corte contenía todos los sueros negativos estudiados, de manera que dicho valor fue el seleccionado siendo este de 61,7 % acompañado de una sensibilidad del 93,3 % ya que de los 30 sueros positivos que se evaluaron, 2 resultaron negativos por este ensayo y una especificidad del 100 %.

R. IV.3.3.2. Uso de los ELISAS indirectos para la detección de serología positiva para babesiosis bovina en muestras provenientes de zona endémica.

Una vez obtenidos los puntos de corte para ELISA de ambos antígenos, se evaluaron las 139 muestras de campo de la región del noroeste argentino, correspondientes a las localidades de El Fisco, Isca Yacu, Pozo Hondo ubicadas en la provincia de Santiago del Estero y las localidades de 7 de Abril, Esteco, Metán y Paso del Durazno ubicadas en la provincia de Salta, obteniéndose los datos que se vuelcan en la Tabla R. 10.

	Positivo RAP-1	Negativo RAP-1
Positivo MSA-2c	53	44
Negativo MSA-2c	5	37

Tabla R. 10.: Comparación del número de muestras provenientes de zona endémica que son detectadas como positivas o negativas con el ELISA de MSA-2c y RAP-1.

Los resultados muestran un mejor desempeño de MSA-2c que RAP-1 para detectar muestras de campo positivas para *B. bovis* en las condiciones estudiadas. Sin embargo 5 muestras fueron detectadas como positivas con RAP-1 y no con MSA-2c.

Por otro lado se compararon los resultados en ambos ELISAS indirectos utilizando los antígenos recombinantes con los resultados obtenidos por la Dra. Susana Torioni de Echaide con el que utiliza el extracto de merozoitos pegados a la placa el cual también se comparó con la técnica de inmunofluorescencia, que es la que consideramos como estándar. Los resultados de esta última comparación se visualizan en la Tabla R. 11.

	ELISA Mz Positivo	ELISA Mz Negativo
IFI Positivo	95	3
IFI Negativo	0	41

Tabla R. 11.: Comparación del número de muestras provenientes de zona endémica que son detectadas como positivas o negativas con el ELISA de Merozoitos (MZ) y la técnica de inmunofluorescencia (IFI).

De los datos de la tabla anterior se desprende que el ELISA de Mz posee una especificidad relativa del 100 % y una sensibilidad relativa del 97 % respecto al ensayo de inmunofluorescencia.

Ahora si, de la comparación de los ELISAS utilizando MSA-2c y RAP-1 como antígenos con respecto al que utiliza Merozoitos se obtuvieron los resultados volcados en la tabla R. 12.

	ELISA Mz Positivo	ELISA Mz Negativo
Positivo MSA-2c	72	25
Negativo MSA-2c	23	19
Positivo RAP-1	49	7
Negativo RAP-1	46	37

Tabla R. 12.: Comparación del número de muestras provenientes de zona endémica que son detectadas como positivas o negativas con el ELISA de Merozoitos (Mz) y los ELISAs que utilizan las proteínas recombinantes MSA-2c y RAP-1 como antígenos a detectar.

En la tabla precedente podemos observar que la concordancia entre sueros positivos con el ELISA de MSA-2c (72) es mayor que la del ELISA de RAP-1 (49), ambos con respecto al ELISA de mz. Por otro lado el ELISA anti RAP-1 detecta mayor cantidad de falsos negativos (46) que en anti MSA-2c (23), comparado con el ELISA anti Mz.

Sin embargo también se puede observar que el ELISA anti MSA-2c detecta un mayor número de sueros falsos positivos (25) respecto del anti RAP-1 (7) respecto ambos del ELISA anti Mz.

El índice kappa de concordancia para ambos ensayos, que tiene en cuenta la precisión en la detección tanto de sueros positivos como de negativos, fue de 0,19 cuando se comparo MSA-2c respecto de Mz como antígenos, y de 0,28 cuando se comparó RAP-1 respecto de Mz como antígenos. Estos valores corresponden a un grado de acuerdo insignificante y bajo respectivamente.

Estas observaciones indican que estos ELISAs indirectos no tienen suficiente sensibilidad y especificidad para ser utilizados en muestras de campo

R. IV.4. Desarrollo de un ELISA competitivo.

Los resultados descriptos en la sección anterior mostraron a MSA-2c como un candidato atractivo para el desarrollo de un ELISA, pero asimismo mostraron la necesidad de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo, ya que el ELISA indirecto basado en este antígeno resultó ser adecuado para detectar muestras de infecciones experimentales, pero no resultó tan adecuado para detectar eficientemente las muestras provenientes de infecciones naturales. Por este motivo, se decidió desarrollar un ELISA competitivo basado en este

antígeno como así también en un anticuerpo monoclonal (Mab) también desarrollado contra esta proteína. Este test esta basado en la reactividad que poseen los anticuerpos presentes en los sueros positivos para *B. bovis* con la proteína MSA.-2c en su forma recombinante pegada a la placa de ELISA. Con la correspondiente posterior incubación con el MAb, éste se pegará a las moléculas de MSA-2c disponibles, y esta unión puede ser detectada con un anticuerpo anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado a peroxidasa y un sustrato cromógeno. La cantidad de color desarrollada está, por tanto, inversamente relacionada al título de anticuerpos anti-MSA-2c presentes en los sueros bovinos testeados.

R. IV.4.1. Obtención de un monoclonal y caracterización.

Se obtuvo un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c, como se describió en M. 15. Este monoclonal se denominó H2P2C2 por su ubicación en la placa donde fue cultivado (pocillo correspondiente a la fila H y columna 2) y segundo pasaje (P2) y segundo clonado (C2).

Para determinar si el MAb H2P2C2 reconocía a la forma nativa de MSA-2c, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con merozoitos de la cepa atenuada mexicana RAD. En el mismo se observó una reacción positiva como puede observarse en la figura R. 35., al igual que cuando se utilizó sangre infectada de otros dos aislamientos Chetunal y Veracruz, del mismo país.

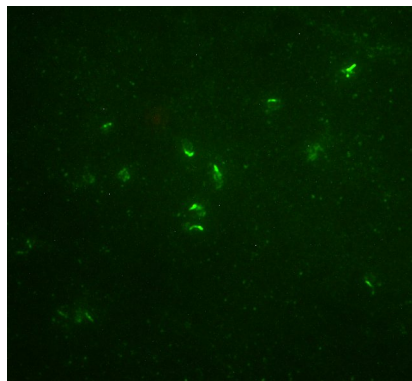


Figura R. 35.: Inmunofluorescencia indirecta del anticuerpo monoclonal H2P2C2 anti MSA-2c utilizando extendidos de merozoitos de la cepa mexicana RAD, con un 4% de PPE.

Como puede verse, H2P2C2 reconoce un epítipo ubicado en la superficie del parásito, no obteniéndose en cambio reacción cuando se evaluó suero de ratón normal o el anticuerpo monoclonal no relacionado anti Tryp-1 (datos no mostrados).

Por otro lado se estudió la reactividad del mismo con varios antígenos de *B. bovis*, como ser eritrocitos infectados y la forma recombinante de la proteína MSA-2c a través del ensayo

de Western Blot. Para el mismo se utilizaron eritrocitos infectados con la cepa argentina R1A como así también eritrocitos provenientes de bovinos sanos, la proteína rMSA-2c y como control de la misma la proteína rRAP-1 obtenida en el mismo sistema y a los efectos de control negativo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti Tryp-1.

Los resultados obtenidos podemos observarlos en la figura R. 36.

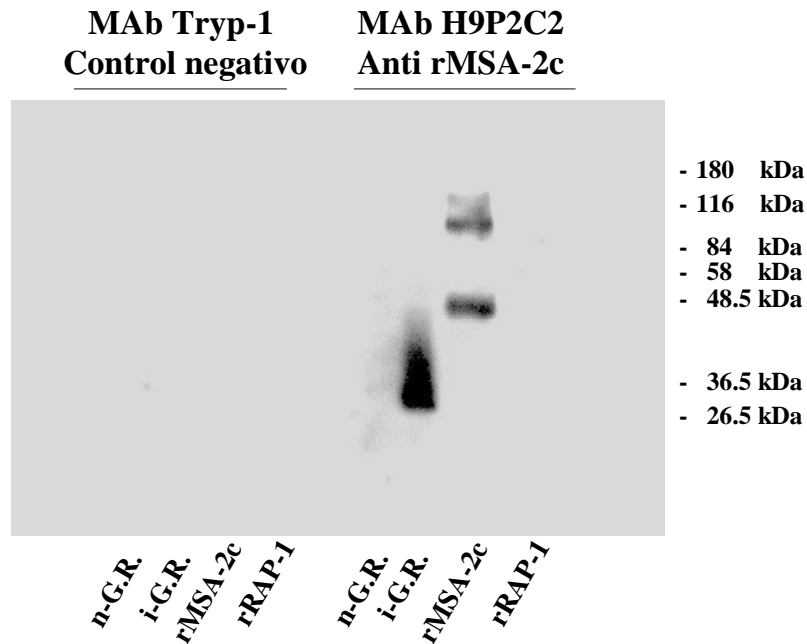


Figura R. 36.: El anticuerpo monoclonal (MAb) H9P2C2 reacciona positivamente con eritrocitos infectados con la cepa R1A de *B. bovis* y la proteína rMSA-2c. n-G.R.: eritrocitos normales, i-G.R.: eritrocitos infectados con la cepa R1A, rMSA-2c: proteína MSA-2c recombinante, rRAP-1: proteína RAP-1 recombinante. Se estudio la reactividad de un monoclonal no relacionado (MAb Tryp-1) con las mismas preparaciones de antígenos como control negativo.

El análisis del Western Blot demostró que MAb H9P2C2 reconoció una proteína correspondiente a una banda de 30-kDa en los eritrocitos infectados con la cepa R1A de *B. bovis*, mientras que no se observó reacción hacia los eritrocitos no infectados.

Por otro lado la reacción de H9P2C2 con la proteína recombinante MSA-2c fusionada a tioeredoxina brindó una banda del tamaño esperado de aproximadamente 45 kDa, al mismo tiempo que no se observó reacción positiva hacia la proteína recombinante RAP-1 de *B. bovis* producida en el mismo sistema de expresión.

R. IV.4.2. Determinación del isotipo.

Con el propósito de determinar el isotipo de inmunoglobulina del monoclonal H9P2C2 se llevó a cabo un ELISA indirecto con MSA-2c como antígeno y los diferentes anti inmunoglobulina de ratón G1, M, G2a, G2b o G3 y los controles correspondientes.

Lecturas significativas de absorbancia sólo fueron obtenidas con la anti inmunoglobulina G1, habiendo todos los controles anti isotipo reaccionado con los controles de bp26 de *B. abortus* y gD de Herpes Virus Bovino-1.

De esta manera, los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal H9P2C2 es del isotipo Ig G1.

R. IV.4.3. Optimización de ciertos parámetros del ensayo.

Con el propósito de determinar cuáles concentraciones de reactivos daban la máxima sensibilidad al test, se ensayaron por un lado diluciones seriadas de sueros positivos y negativos contra diluciones de la forma recombinante de la proteína MSA-2c y una concentración fija de H9P2C2 como se grafica en la figura R. 37. y también una concentración fija de rMSA-2c y diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal, cuyos resultados se pueden observar en la figura R. 38.

Los sueros utilizados corresponden a un bovino experimentalmente infectado con la cepa R1A de *B. bovis* (0 d.p.i. y 65 d.p.i.), los cuales fueron previamente caracterizados como negativo y positivo, respectivamente a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

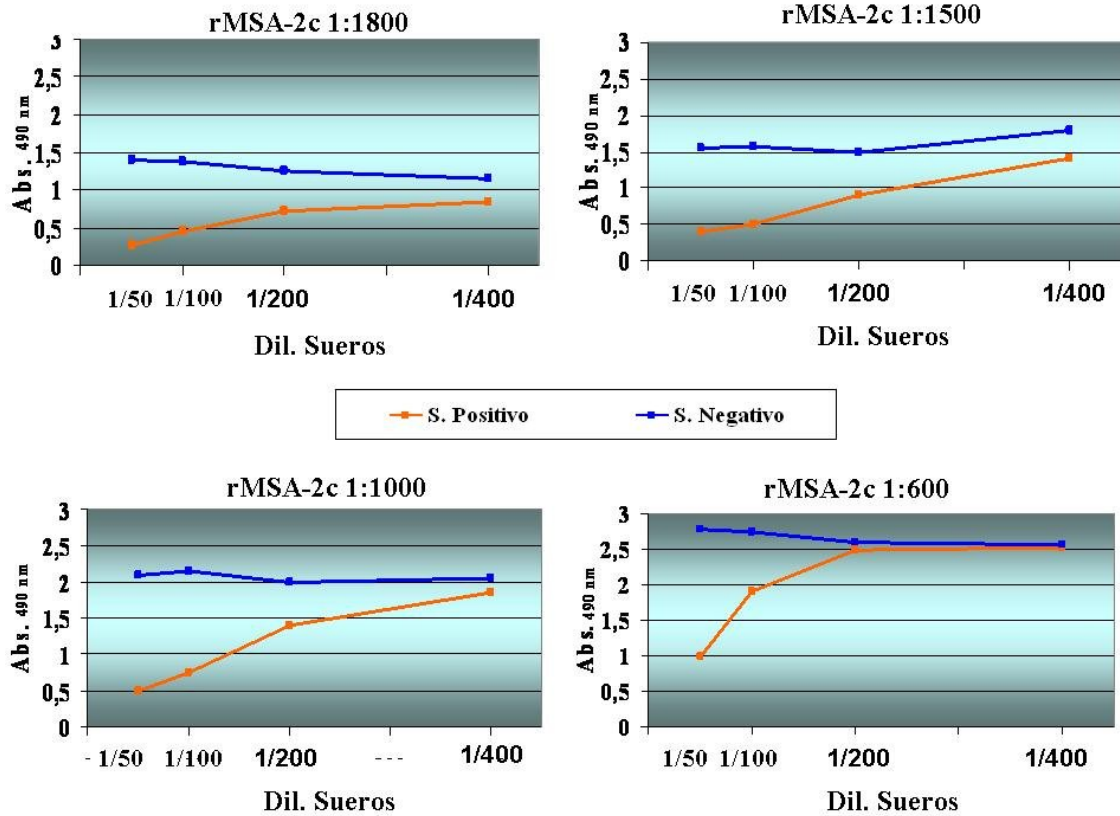


Figura R. 37.: Dilución óptima de antígeno: Se testearon diferentes diluciones de rMSA-2c en cELISA con diluciones de un suero positivo y negativo para *B. bovis* y una concentración fija del MAb H9P2C2 (1:7500). Se seleccionó la concentración de antígeno que mostró máxima sensibilidad y especificidad (1/1500 = 8.5 ng/pocillo).

Cada uno de los paneles de la Figura R. 37. corresponde a una dilución diferente de proteína recombinante MSA-2c utilizada como antígeno y en todos los casos se utilizaron diluciones seriadas al medio de suero positivo y negativo frente a una dilución única de MAb.

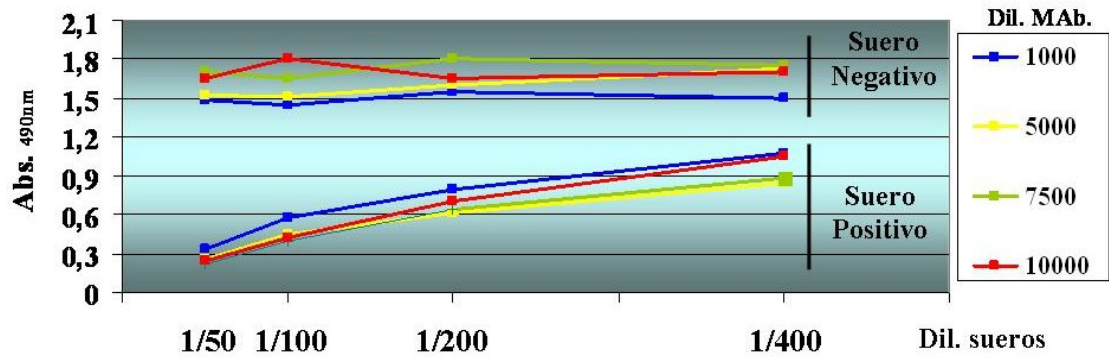


Figura R. 38.: Dilución óptima de MAb. Se testearon diluciones de un suero positivo y negativo para *B. bovis* en cELISA utilizando una concentración fija de antígeno (8.5 ng/pocillo) y diferentes diluciones del MAb H9P2C2. La dilución 7500 mostró la máxima diferencia en Absorbancia medida a 490 nm entre el suero positivo y negativo en todas las diluciones y fue la seleccionada para el resto de los experimentos.

De las dos figuras anteriores se desprende que 8.5 ng/pocillo de antígeno y una dilución de 7500 del anticuerpo monoclonal brindó la máxima diferencia de absorbancia a 490 nm entre los sueros negativos y positivos testeados, en todas las diluciones. Estas condiciones fueron las seleccionadas para el resto de los experimentos. La dilución usada de anticuerpo corresponde a un título de 3,9, calculado como la inversa de la dilución.

Otra variable que se ensayó fue el tipo de bloqueante a utilizar, habiéndose probado PBST-1% Gelatina, PBST- 1% OVA y PBST-5% SNE. Los mejores resultados para evitar el pegado inespecífico se obtuvieron cuando se utilizó gelatina como bloqueante (datos no mostrados).

R. IV.4.4. Uso del cELISA en muestras provenientes de infecciones experimentales y de campo.

Utilizando las condiciones seleccionadas, se testearon a través de este ensayo muestras extraídas en diferentes momentos en el tiempo de bovinos experimentalmente infectados con la cepa R1A de *B. bovis* (n = 6) o la cepa S2P (n = 2). En el caso de los animales infectados con R1A, se testearon los días 0, 35 y 65 post inoculación (p.i.); y en los infectados con S2P, los días 0, 21 y 65 p.i. Los resultados obtenidos expresados como porcentaje de inhibición (% I) según la fórmula $100 - [(A_{490nm} \text{ Suero a testear} \times 100) / \text{Promedio Abs.}_{490nm} \text{ Sueros Negativos}]$ se muestran en la figura R. 12. donde puede observarse que los anticuerpos anti-rMSA-2c pueden detectarse claramente en ambas muestras de suero de los animales infectados con la cepa argentina R1A, de los días 35 y 65 p.i.

En el caso de los bovinos infectados con la cepa patógena S2P, los anticuerpos presentes en el suero pudieron ser detectados hacia el día 65 post-inoculación en ambos bovinos y en uno de ellos (II), un porcentaje alto de inhibición (% I) se obtuvo también hacia el día 21 p.i. Esta diferencia entre los dos animales podría deberse a que el bovino II fue inoculado con una dosis de 10^7 parásitos, mientras que el inoculo utilizado para el bovino I fue de 10^5 parásitos. Las muestras que mostraron un %I significativos de acuerdo a este test fueron también diagnosticadas positivamente para *B. bovis* por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

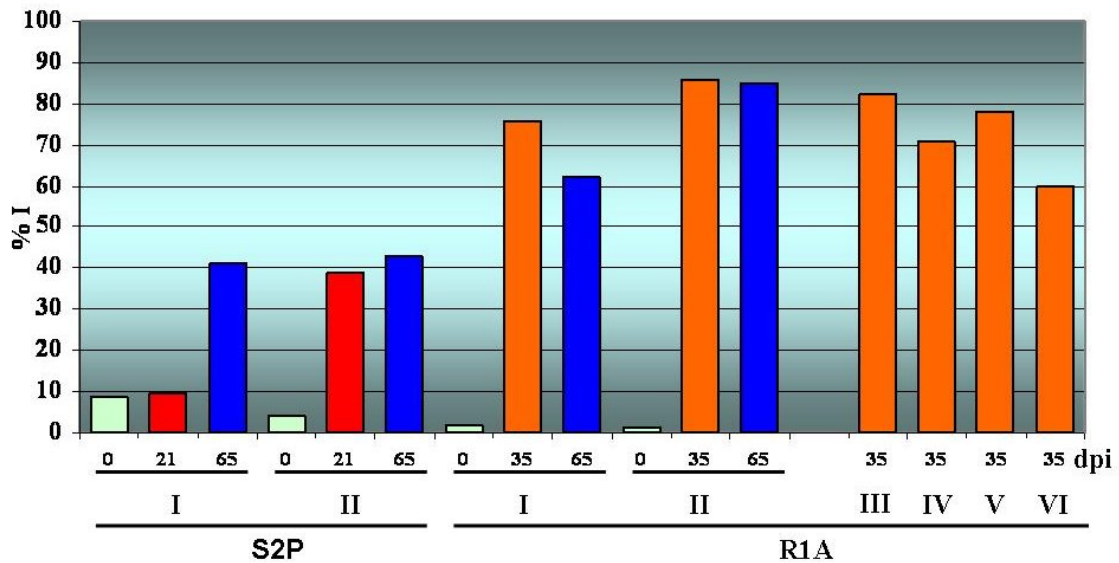


Figura R. 39.: Detección por ELISA competitivo de infecciones en bovinos experimentalmente inoculados con la cepa argentina patógena de *B. bovis* S2P o la atenuada R1A. Las muestras de sueros extraídas previo ($t=0$ d.p.i.) y a diferentes tiempos después de la inoculación redujeron significativamente el pegado del MAb H9P2C2 a rMSA-2c, mientras que no se observó inhibición con los sueros negativos (dilución de los sueros 1:50). Los números romanos indican los diferentes bovinos. Los resultados están expresados en Porcentaje de Inhibición (% I), calculado como $100 - [(Abs_{490\text{ nm}} \text{ Suero a testear} \times 100) / \text{Promedio } Abs_{490\text{ nm}} \text{ Sueros Negativos}]$, y representa la media de determinaciones realizadas por triplicado.

Puede observarse también en esta figura que no hubo inhibición en el pegado del anticuerpo monoclonal a la rMSA-2c en el caso de las muestras de sueros negativos ($n=4$).

Además se testeó el suero proveniente de bovinos naturalmente infectados con cepas de campo de *B. bovis* provenientes de una región endémica la provincia de Salta, Argentina. Estas muestras fueron previamente caracterizadas como positivas con el test de inmunofluorescencia indirecta. Todos los sueros testeados ($n=8$) mostraron una disminución

significativa en las lecturas de Abs_{490 nm} y por consiguiente altos valores de %I como puede observarse en la figura R. 40.

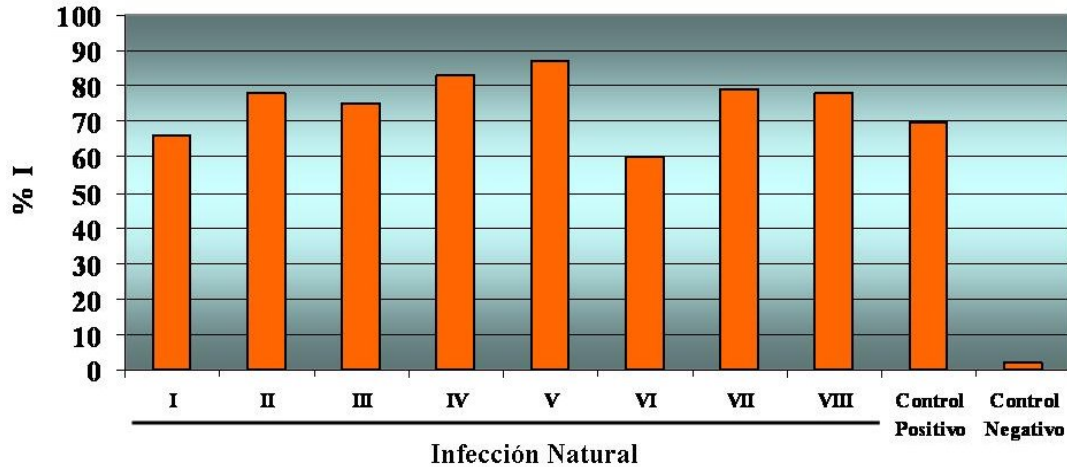


Figura R. 40.: Detección de sueros con infecciones naturales provenientes de una región endémica para babesiosis de Argentina. Sueros infectados con *B. bovis* caracterizados como positivos por inmunofluorescencia, fueron diagnosticados por cELISA (dilución 1:50). Los números romanos indican diferentes bovinos. Los sueros control negativo y positivo corresponden a un bovino infectado experimentalmente con la cepa R1A (T= 0 y T= 65 d.p.i. respectivamente)

Los resultados obtenidos precedentemente indican que la forma recombinante del antígeno de superficie de *B. bovis*, MSA-2c y el anticuerpo monoclonal contra la misma, puede ser empleado en el desarrollo de un test de ELISA competitivo para este patógeno.

R. IV.4.5. Uso del Elisa competitivo para la detección de anticuerpos anti *B. bovis* en el búfalo de agua.

Un ELISA competitivo como el desarrollado en esta Tesis puede ser además útil para la detección de anticuerpos específicos contra *B. bovis* en otras especies animales que pueden cumplir un rol en la epidemiología de estos parásitos. Se aplicó este test para estudiar el estatus epidemiológico de *B. bovis* en el búfalo de agua, cuya crianza y utilización en nuestro país, especialmente en la región del NEA ha crecido significativamente en los últimos años.

A tal fin se optimizaron las condiciones del ensayo para ser usado con sueros bubalinos, evaluándose distintos tipos de bloqueantes como así también de la dilución de suero a testear. Los tiempos y temperaturas de incubación se mantuvieron constantes a lo largo de los ensayos siendo las mismas que se utilizaron para el cELISA con sueros bovinos.

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en los ensayos de evaluación de bloqueantes y dilución de suero se grafican directamente el promedio de los triplicados de las Absorbancias, para cada muestras. Luego para establecer el punto de corte y analizar las muestras de búfalos incógnita, las absorbancias se expresan en Porcentaje de Inhibición.

R. IV.4.5.1. Tipos de bloqueantes.

Se ensayaron dos tipos de agentes bloqueantes: Albúmina de Suero Bovino (BSA) en una concentración de 1% (peso en volumen) en PBS-0.05% Tween frente a Gelatina 1% en PBS-0.05% Tween. A falta de controles positivos bubalinos se utilizaron como controles de placa distintos sueros positivos bovinos así también como negativos. En este ensayo, se testearon 16 sueros de búfalos considerados negativos provenientes de la provincia de Buenos Aires zona libre del vector *Ripicephalus microplus* y por lo tanto, libre de *B. bovis*.

Los resultados obtenidos para este ensayo se grafican en la Figura R. 41.

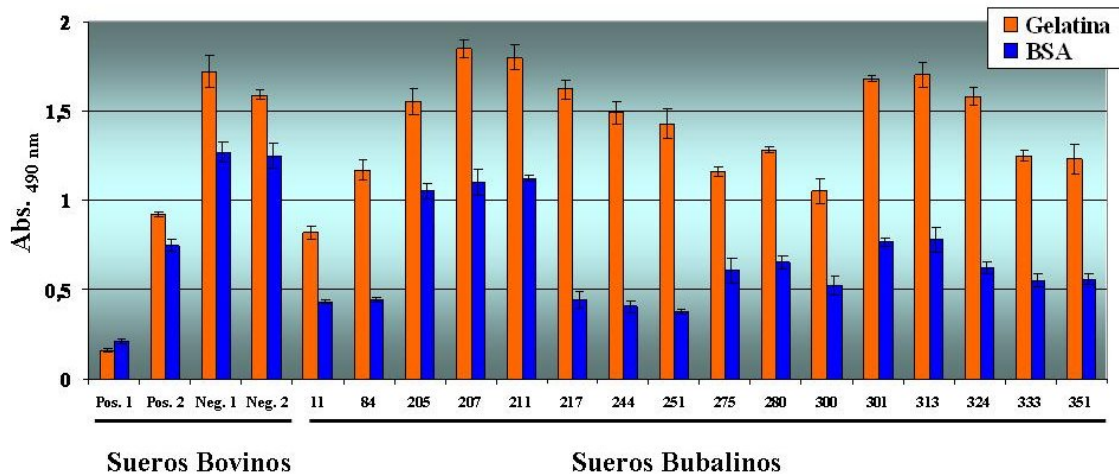


Figura R. 41: Efecto de dos tipos de agentes bloqueantes (gelatina y BSA) para la evaluación de sueros bubalinos en el cELISA. En el eje de las abscisas se observa la absorbancia alcanzada +/- el desvío estándar cuando se utiliza Gelatina (naranja) y BSA (azul) como agentes bloqueantes. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1/50.

Es notable la diferencia que se observa entre estos dos bloqueantes en lo que respecta a los sueros de búfalo, no tan así para los sueros bovinos, designados como Positivo (Pos.) 1 y 2 y Negativo (Neg.) 1 y 2. En base a estos resultados se eligió Gelatina como bloqueante, ya que impide el pegado inespecífico de los sueros bubalinos negativos.

R. IV.4.5.2. Dilución de los sueros a testear.

En el paso siguiente se probaron diferentes diluciones de suero. Por un lado se probó una dilución 1:50 en PBS-T 0.05%, y por el otro sueros sin diluir, dado que esta condición es usada en un ensayo competitivo para sueros bovinos, desarrollado con el antígeno de las roprias de *B. bovis*, RAP-1. (Goff, W.L. *et al*, 2006)

El siguiente grafico muestra las diferencias obtenidas con distintas diluciones de suero. Los sueros 1, 2 y 3 son bovinos positivos (+) o negativos (-), los demás sueros son bubalinos.

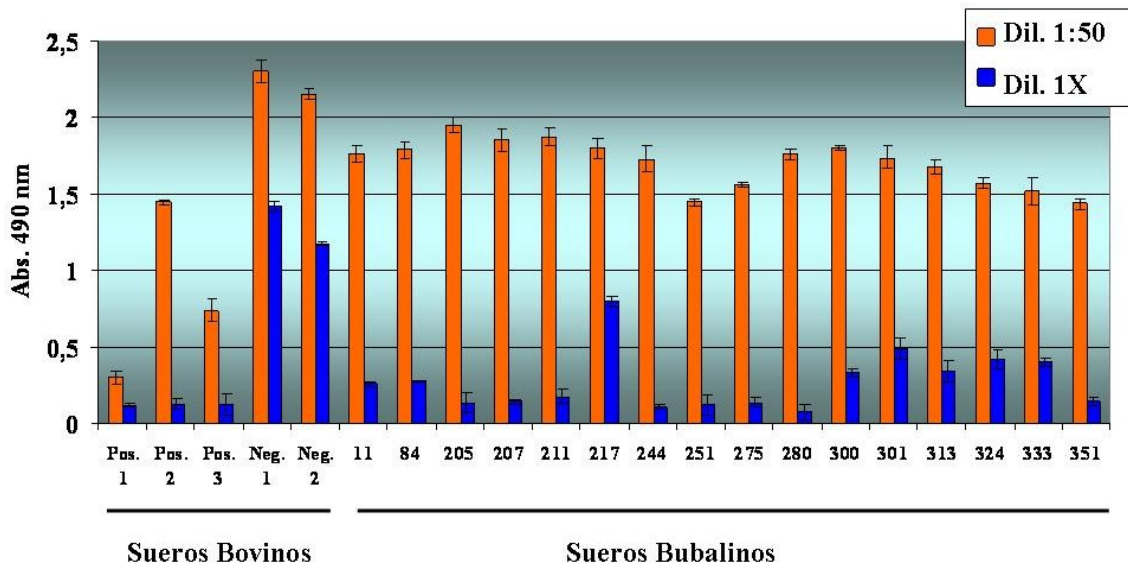


Figura R. 42.: Resultados obtenidos al comparar los sueros diluidos frente a sin diluir. Comparación entre dos diluciones de suero. Los valores graficados en el eje de las ordenadas corresponde a la Absorbancia leída a 490 nm para los diferentes sueros testeados y el correspondiente desvío estándar ya que las mediciones se realizaron por triplicado. Por otro lado los sueros tanto bubalinos como bovinos se grafican en el eje de las abscisas en las dos diluciones testeadas.

Se puede observar que en la dilución 1:50 de suero, los controles negativos tanto bovinos como bubalinos se comportaron en forma similar. Sin embargo, usando sueros sin diluir, se obtienen valores muy bajos de absorbancia con los sueros negativos bubalinos, indicando un pegado inespecífico a la placa. En el caso de los sueros bovinos, si bien la absorbancia de los sueros negativos también disminuye en sueros sin diluir, los cocientes entre sueros negativos y positivos son óptimos. Estas observaciones con respecto a los sueros bovinos serán exploradas con mayor detalle en experimentos futuros, junto al análisis de un mayor número de muestras de manera de mejorar si es posible las condiciones del cELISA.

El mayor pegado inespecífico observado en los sueros bubalinos con respecto a los sueros bovinos puede deberse a su diferente composición y/o propiedades físicas, tales como viscosidad y densidad.

Los resultados de la Fig. R.42 muestran que no es apropiado utilizar sueros bubalinos sin diluir debido a su pegado inespecífico. Para aumentar la sensibilidad del ensayo, se decidió probar si una dilución 1/20 daría mejores resultados que 1/50. El *buffer* de dilución usado fue siempre PBS-T 0.05%.

El experimento no mostró diferencias significativas entre las diluciones 1/20 y 1/50 de los sueros bubalinos negativos. En otras palabras, una dilución 1/20 no provocaba un pegado inespecífico a la placa significativamente diferente que la dilución 1/50. Por este motivo, decidió usarse la dilución 1/20, para poder detectar títulos más bajos de anticuerpos (resultados no mostrados).

R. IV.4.5.3. Determinación del punto de corte.

Una vez obtenidos estos datos, se procedió a calcular el *cut off* o punto de corte del ensayo. Las absorbancias obtenidas para 31 sueros de búfalos negativos de la provincia de Buenos Aires se expresaron como Porcentaje de Inhibición con la fórmula $\% I = 100 - (\text{Abs}_{.490 \text{ nm}} \text{ Suero Testeado} \times 100) / \text{Promedio Abs}_{.490 \text{ nm}} \text{ Sueros Bovinos Negativos}$. A dicho valor se le sumaron 2 desvíos estándar obteniéndose un valor de 23%, siendo los valores por encima de este porcentaje considerados positivos y los que se encuentran por debajo dicho valor se consideran negativos. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R. 43.

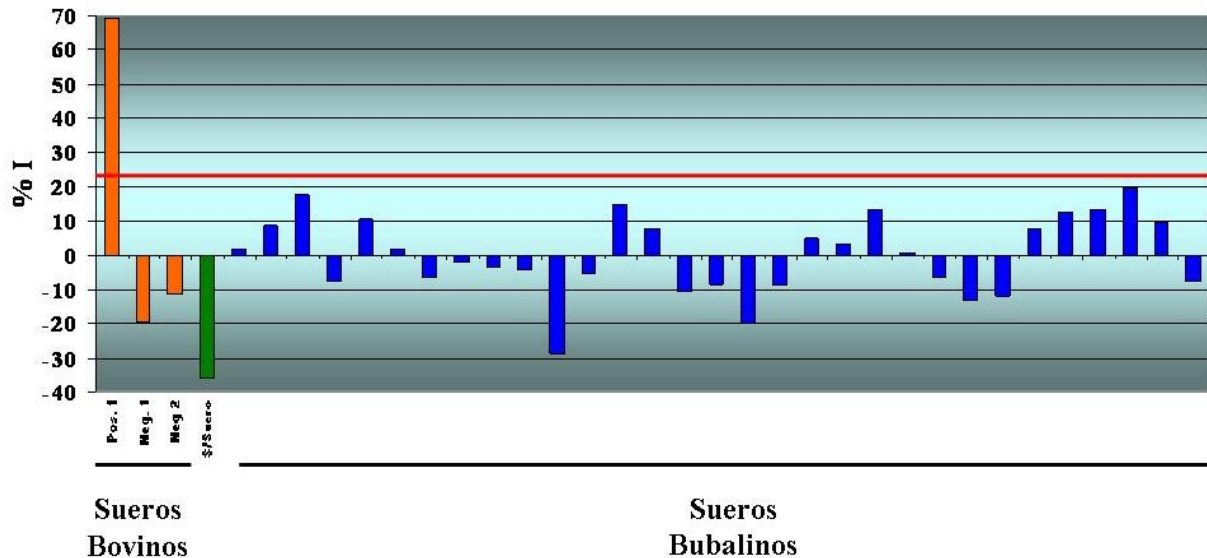


Figura R. 43.: Determinación del *cut off* o punto de corte para los sueros bubalinos. En el eje de las abscisas se grafica el Porcentaje de Inhibición (% I) alcanzado por los sueros testeados y en el eje de las ordenadas los 31 sueros de búfalos pertenecientes a una zona libre de *B. bovis* evaluados y los controles correspondientes de 3 sueros bovinos positivos y el valor obtenido sin suero. El % I se calculo como $100 - (\text{Abs}_{.490 \text{ nm}} \text{ Suero Testeado} \times 100) / \text{Promedio Abs}_{.490 \text{ nm}} \text{ Sueros Bovinos Negativos}$. La línea horizontal roja indica el punto de corte calculado en 23 %.

Como puede observarse en la figura con dicho valor de punto de corte todos los sueros de búfalo testeados se encuentran por debajo de dicho valor, como así también los dos sueros de bovinos negativos que se utilizaron como control, al igual que el control sin suero. Por otro lado el suero bovino utilizado como control positivo alcanza un valor por encima del punto de corte seleccionado.

Por otro lado se graficó la distribución de frecuencias del Porcentaje de Inhibición de dichos sueros utilizando el programa estadístico MedCalc, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura R. 44.

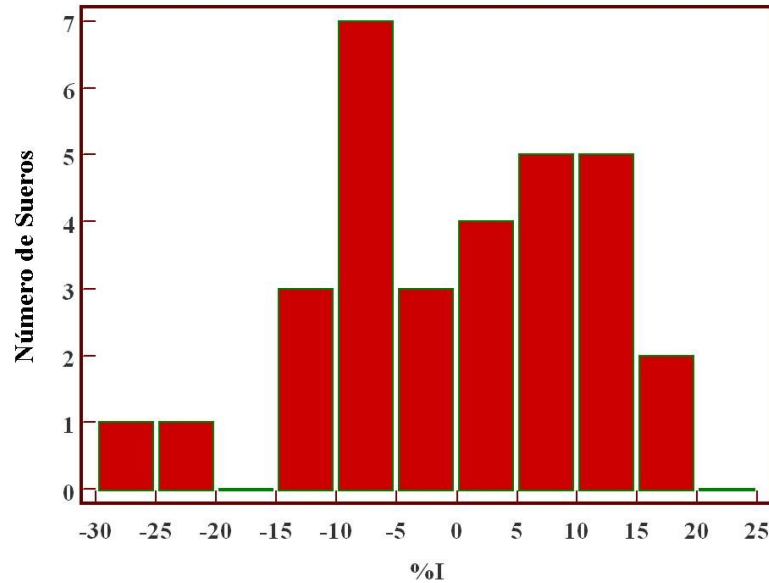


Figura R. 44.: Distribución de frecuencias del Porcentaje de Inhibición (% I) del pegado del Anticuerpo Monoclonal H9P2C2 en el cELISA por muestras conocidas de sueros de búfalos correspondientes a una zona libre de *B. bovis*.

Como podemos observar, los 31 sueros bubalinos utilizados alcanzan valores de %I que se distribuyen entre el -30% y 20%.

R. IV.4.6. Evaluación de sueros bubalinos de campo con el cELISA.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para desarrollar este ensayo como así también el punto de corte correspondiente se procedió a analizar 103 sueros de búfalos provenientes de distintos establecimientos de la provincia de Corrientes, separados de la siguiente manera: 36 sueros provenientes del denominado Campo “A” ubicado en la localidad de Lavalle, 38 muestras correspondientes al Campo “B” ubicado en la ciudad de Mercedes, otras 5 muestras provenientes del denominado Campo “C” ubicado también en la ciudad de Mercedes y finalmente 24 muestras de sueros de búfalos pertenecientes al Campo “D” perteneciente a la localidad de Ituzaingó. Cabe mencionar que las localidades de Lavalle e Ituzaingó están situadas en la zona endémica de la provincia de Corrientes, mientras que la ciudad de Mercedes esta ubicada en la denominada zona de erradicación de dicha provincia (ver mapa en la sección I. 3.3.). Los resultados obtenidos expresados como % de Inhibición (%I) para dichos sueros a través del ensayo de ELISA competitivo se muestran a continuación a figura R. 45.

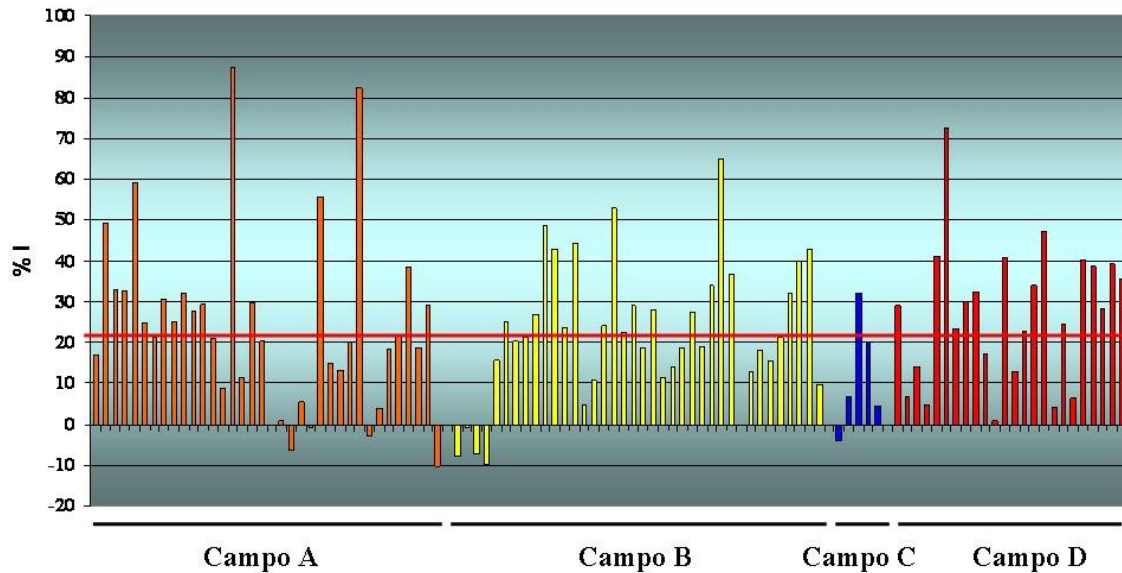


Figura R. 45.: ELISA competitivo en el que se evaluaron 103 muestras de sueros de búfalos procedentes de 4 establecimientos diferentes provenientes de la provincia de Corrientes. A partir de las absorbancias obtenidas se calculó el Porcentaje de Inhibición para cada muestra el cual se grafica en el eje de las abscisas. En base al punto de corte establecido en 23 % (línea horizontal roja) se procedió a la clasificación de cada suero como positivo o negativo.

Del análisis de los datos obtenidos en la figura precedente se desprende que en total 50 muestras resultaron positivas bajo las condiciones ensayadas, lo que representa una prevalencia del 48,54 %. Los porcentajes obtenidos para cada campo fueron: Campo A: 44,44 %, Campo B: 44,73 %, Campo C: 20 % y Campo D: 66,66 %. La mayor prevalencia observada en el campo D podría deberse a que el mismo se encuentra dentro de la zona endémica de la provincia de Corrientes.

De esta manera se pudo corroborar no sólo que los búfalos pueden estar actuando como carriers o reservorio de la enfermedad, sino que también la técnica es adecuada y lo suficientemente sensible como para detectarlos.

D. Discusión

D. Discusión

Las infecciones de bovinos con el hemoparásito protozoario *Babesia bovis* son causa de grandes pérdidas económicas e importantes limitaciones en la explotación ganadera en vastas regiones del mundo donde se desarrolla su vector, la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. La vacunación con cepas atenuadas es una de las medidas en uso para su control. Si bien son efectivas, estas vacunas presentan inconvenientes como la necesidad de una cadena de frío, corto tiempo de almacenamiento, peligro de reversión de los parásitos a la virulencia, ser seguras solamente en animales menores de 1 año de edad y la posibilidad de cotransmisión de otros microorganismos. Estos problemas resaltan la importancia de desarrollar una vacuna a subunidades. Con este objeto se realizó la identificación *in silico* de epitopes B en miembros de la familia de antígenos de superficie MSA-2 de *Babesia bovis*, que estén ampliamente conservados entre distintos aislamientos y se evaluó luego para algunos de ellos si eran expresados en los parásitos y si eran sensibles a la neutralización. Los epitopes B superficialmente expuestos están sometidos a la permanente presión de selección del sistema inmune del bovino. Por lo tanto, su conservación entre cepas distantes geográficamente sugiere un impedimento funcional a la variabilidad, constituyendo así posibles blancos vacunales. Dado que una vacuna multiepitópica ha sido efectiva en estudios experimentales contra un parásito muy cercano a *B. bovis*, *Plasmodium falciparum*, este enfoque puede llegar a ser exitoso en el caso de la babesiosis bovina. Por otra parte se utilizó la forma recombinante de la proteína MSA-2c como antígeno para el desarrollo de un ELISA indirecto, el cual fue comparado con el ampliamente utilizado RAP-1, y dada la baja sensibilidad de ambos ensayos para evaluar sueros de campo, se desarrolló un ELISA competitivo utilizando rMSA-2c y un anticuerpo monoclonal contra el mismo, que resultó útil para el diagnóstico tanto de sueros bovinos como bubalinos.

D. 1. Caracterización molecular e inmunológica de la proteína de superficie del merozoito -2c (MSA-2c) para el desarrollo de nuevas vacunas a subunidades contra la babesiosis bovina.

Previamente se demostró que *msa-2c*, un miembro del complejo de la familia de genes *msa-2* de *B. bovis*, está presente como una única copia en el genoma de la cepa mexicana biológicamente clonada Mo7, se expresa en merozoitos y es reconocida por

anticuerpos presentes en los bovinos inmunizados con *B. bovis* (Florin-Christensen M. *et al*, 2002). En la presente tesis se muestra el potencial de la proteína MSA-2c para su inclusión en tests diagnósticos mejorados y vacunas a subunidades, dada su localización superficial, la conservación de epitopes B, inmunogenicidad en bovinos y su importancia funcional.

Para la expresión de MSA-2c recombinante se seleccionó un sistema procariótico/células bacterianas, debido a las numerosas ventajas que presenta para la expresión de proteínas. La expresión fue confirmada mediante ensayos de Western blot revelados con anticuerpos bovinos policlonales anti *B. bovis*. La misma no resultó tóxica para el sistema y se obtuvo en niveles aceptables.

Los datos sobre la reactividad de diferentes sueros bovinos contra MSA-2c muestran la alta conservación de epitopes B entre la cepa vacunal argentina R1A y aislamientos de campo de *B. bovis*. El amplio rango de sueros bovinos contra *B. bovis* que reaccionaron con la forma recombinante de MSA-2c en inmunoblots indicaban que este antígeno posee importante valor diagnóstico para el desarrollo de un test inmunológico específico.

Además, la secuencia de nucleótidos del gen transcripto *babr* 0.8 de la cepa australiana “K” comparte una identidad relativamente alta con los genes *msa-2c* de Mo7 y R1A (Florin-Christensen, M. *et al*, 2002). Sin embargo, nunca fue reportada con anterioridad la expresión de los genes *babr*. De esta forma, nuestros resultados sobre la reactividad de anticuerpos anti-MSA-2c de R1A con preparaciones de antígeno de la cepa Australia “S” son los primeros en mostrar la expresión de una proteína similar a MSA-2c en esta cepa. Los resultados en este trabajo de inmunofluorescencia con preparaciones de merozoitos vivos muestran que MSA-2c se expresa en la superficie celular del parásito. Esto es consistente con lo que ha sido informado con anterioridad en otros miembros de la familia VMSA (Jasmer D.P. *et al*, 1992). Además, la reactividad de los anticuerpos anti-MSA-2c de R1A con la superficie de merozoitos del aislamiento S2P demuestra la conservación de epitopes B de MSA-2c expuestos en la superficie entre estas dos cepas homólogas. Ya que las proteínas de superficie del parásito están expuestas a la presión de selección del sistema inmune bovino, la conservación de los epitopes B expuestos en la superficie observada sugiere que MSA-2c puede jugar un rol funcional crítico y significativo. Más aún, su relevancia funcional para la supervivencia del parásito está también avalada por los resultados de los experimentos de neutralización descritos en esta tesis, en los cuales la incubación con suero anti-rMSA-2c afectó significativamente la

invasión de los merozoitos de R1A a los eritrocitos bovinos. Sin embargo, a pesar de los efectos significativos obtenidos en la neutralización, algunos parásitos sobrevivieron al tratamiento con los anticuerpos anti-rMSA-2c y fueron capaces de invadir los eritrocitos. Esto sugiere que la función de MSA-2c puede ser también cumplida por otras proteínas del parásito, tales como otros miembros de la familia VMSA.

En resumen, nuestros datos indican que el producto del gen *msa-2c* de la cepa Argentina R1A es altamente antigénico, está expresado en la superficie de los merozoitos, posee epitopes B extensamente conservados y juega un rol funcional significativo en el proceso de la invasión de los eritrocitos. Importantemente, estos hallazgos indican que MSA-2c es un nuevo candidato vacunal potencial y antígeno para diagnóstico.

D. 2. Estudio del polimorfismo de genes de la familia *msa-2* en distintas cepas y aislamientos de *B. bovis*

Como se mencionó en la introducción, se ha caracterizado con anterioridad, entre otros, dos tipos de antígenos en merozoitos de *B. bovis* como blancos para el desarrollo de vacunas: las proteínas asociadas con las organelas del complejo apical de los merozoitos, tales como RAP-1 (Suarez, C.E. *et al.*, 1994, 1991a, 1991b) y las proteínas uniformemente distribuidas en la superficie de los merozoitos (Hines S.A. *et al.*, 1989 y 1992, Jasmer, D.P. *et al.*, 1992) representadas por MSA-1 y MSA-2. Estas dos últimas, junto con los transcritos de tres genes denominados *babr* identificados en la cepa australiana “K” y los genes recientemente caracterizados *msa-2a2*, *msa-2b* and *msa-2c* en la cepa Mo7 (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002, Cowman, A.F. *et al.*, 1984), son miembros de la familia VMSA (Hines SA, 1992). La familia de genes VMSA ha sido definida como polimórfica debido a la carencia de conservación de un epitope B, reconocido por un anticuerpo monoclonal, entre las cepas México, Israel y Australia (Palmer, G. *et al.*, 1991). Sin embargo, se desconoce si este polimorfismo se extiende a otros epitopes B en los miembros de VMSA de estas cepas. Resultados recientes han mostrado que la variación génica en la familia VMSA puede estar más limitada entre cepas americanas. Primero, un epitope B sensible a la neutralización en la proteína MSA-1 es compartido entre Mo7 y la cepa argentina R1A (Suarez, C.E. *et al.*, 2000). Segundo, se encontró un moderado a alto grado de conservación de secuencias predichas de aminoácidos en todos los miembros de la familia *msa-2* de las cepas Mo7 y R1A (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002). Estas observaciones, junto con los resultados sobre la conservación de epitopes B en MSA-2c

entre la cepa R1A y S2P y la significancia funcional descriptos en esta tesis apoyan la opinión que los miembros de la familia VMSA pueden ser candidatos para el desarrollo de vacunas mejoradas y herramientas diagnósticas.

En el presente trabajo se analizaron las secuencias de aminoácidos predichas de los genes *msa-2a1*, *msa-2b* y *msa-2c* en aislamientos y cepas de distintas regiones geográficas de Argentina, México y Estados Unidos. Los alelos de los genes *msa-2a* y *msa-2b* poseen extremos 5' y 3' comunes, por lo que ambos son amplificados en la reacción de PCR conjuntamente cuando se usan oligonucleótidos para el marco de lectura completo. Los productos de amplificación fueron clonados y secuenciados y las secuencias predichas de aminoácidos se compararon con las correspondientes a la cepa clonada mexicana Mo7. Las nuevas secuencias se clasificaron de acuerdo a los porcentajes de identidad con respecto a MSA-2a1 y b de Mo7. De esta manera, se encontraron 4 nuevas variantes para MSA-2a1, en cepas argentinas (Salta y Corrientes) y de México; y 5 nuevas variantes de MSA-2b en cepas de Corrientes y México. Estos resultados se mostraron en la Tabla R. 1.

Asimismo, se encontró una forma “intermedia”, correspondiente a un aislamiento de la provincia de Corrientes. Al alinear dicha secuencia, se observó que esta forma tenía fragmentos alternados de MSA-2a y MSA-2b. Estas formas son posiblemente producto de eventos de recombinación, ya sea intra-locus, durante las etapas asexuales del parásito, o entre cepas, en la etapa sexual que ocurre en el intestino de la garrapata.

En esta tesis se analizaron y compararon las secuencias predichas de aminoácidos de las proteínas MSA-2a1, MSA-2b y MSA-2c de diferentes aislamientos y cepas americanos de *B. bovis*. Se encontró un alto grado de conservación en el extremo amino terminal, el cual corresponde al péptido señal (aminoácidos 1 a 22 para MSA-2a1 y b y 1 a 21 para MSA-2c) y la señal de anclaje a GPI (secuencia final de 22 aminoácidos), respectivamente. Ambos péptidos están ausentes en las proteínas maduras.

Como pudimos observar en la Figura R. 15, la cual muestra el alineamiento predicho para la proteína MSA-2a1, el mismo muestra un moderado a alto grado de conservación entre aislamientos americanos, que va desde el 68 a 96 % de identidad con respecto a la secuencia de R1A. Las sustituciones presentadas se distribuyeron regularmente a lo largo de las secuencias y también se encontraron algunos pequeños gaps cerca de la zona carboxilo terminal.

Por otra parte en la Figura R. 14 observamos el alineamiento de las secuencias pertenecientes a la proteína MSA-2b. Es interesante mencionar que dos secuencias de *msa-*

2b fueron amplificadas para la cepa mexicana RAD (denominadas RAD 1 y RAD 2 en el alineamiento), compartiendo un 85,7 % de identidad entre las mismas en la secuencia peptídica predicha. Ya que RAD es una cepa clonada, estos resultados sugieren que el genoma de RAD contiene al menos dos genes parálogos de *msa-2b*. El grado de identidad de las secuencias pertenecientes a MSA-2b osciló entre el 70% y 84 % respecto a la secuencia de R1A. Notablemente, 3 de las secuencias (M1A, M2P y Tabasco) mostraron dos gaps consecutivos de 15 y 12 residuos cada uno, separados por una isla de 7 residuos (SAAPQTS) en una región rica en el aminoácido prolina, cercano a la zona carboxilo terminal. Estos resultados sugieren que la correspondiente región de MSA-2b en las otras cepas no es esencial funcionalmente para el parásito. Una región hipervariable rica en prolinas cercana también al extremo carboxilo terminal ha sido encontrada en los alelos *msa-2a/b* de aislamientos pertenecientes a brotes australianos (Berens, S.J. *et al.*, 2005). Se ha sugerido que esta región rica en prolinas podría estar involucrada en las interacciones iniciales entre los merozoitos y la superficie del eritrocito durante la invasión ya que tanto varias proteínas de superficie bien estudiadas de *Plasmodium spp.* involucradas en la invasión y las prociclinas de *Trypanosoma brucei* también contienen regiones ricas en prolinas llamadas PRRs. Estas prociclinas son también proteínas de superficie ancladas por GPI, similares a las proteínas MSA-2a/b, que poseen PRRs adyacentes a la secuencia señal de anclaje a GPI y Acosta-Serrano *et al.* (2001) postularon que la función de esta región podría ser proteger al parásito durante su pasaje a través del intestino. La existencia de formas de MSA-2b que poseen gaps en esta región encontradas en esta tesis sugiere que o bien esta zona no tiene en realidad importancia funcional, contrario a lo sugerido por Berens y Acosta-Serrano, o bien que los alelos de *msa-2b* que fueron amplificados y secuenciados en este trabajo no se expresan o no dan lugar a proteínas MSA-2b funcionalmente activas, aunque esta última posibilidad es mas remota.

La proteína MSA-2c es la más corta y más conservada entre los miembros de la familia MSA-2, con un porcentaje de identidad entre el 86 y 94 % respecto de R1A. Estos resultados concuerdan con datos previamente reportados (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002) y los estudios realizados en los aislamientos australianos (Berens, S.J. *et al.*, 2005).

En la Figura R. 13 se mostró las α -hélices predichas para la proteína MSA-2c de la cepa vacunal Argentina R1A. Se puede observar que la misma posee un arreglo en tandem de 9-10 α -hélices separados por secuencias cortas sin estructura. Solamente pequeños cambios en esta estructura predicha fueron encontrados en las diferentes proteínas de MSA-

2c de las otras cepas analizadas, y esto puede ser asociado a las sustituciones de aminoácidos en esas regiones o regiones vecinas. Tales cambios consistieron en por ejemplo en la aparición o desaparición de α -hélice cortas o la división de una α -hélice larga en dos cortas, o bien inversamente, la unión de dos α -hélices separadas en una sola.

La observación más notable del análisis es que la estructura de α -hélice está conservada en las proteínas de MSA-2a1, b y c de todos los aislamientos y cepas americanos analizados, al igual que en las proteínas MSA-2c y MSA-2a/b de las cepas y aislamientos australianos descritos en el trabajo de Berens, S.J. *et al.* (2005), sugiriendo que este tipo de plegamiento predicho puede ser esencial para su funcionalidad.

D. 3. Predicción, selección y caracterización experimental de los epitopes B seleccionados.

Utilizando el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar (1990), se predijeron epitopes B de entre 20 y 40 aminoácidos a lo largo de las secuencias de las proteínas MSA-2a, b y c de la cepa R1A. El algoritmo de predicción empleado está basado en la hidrofiliidad, entorno aminoacídico y comparación con epitopes ya descritos en otras especies. En esta Tesis se identificaron nueve epitopes putativos en MSA-2a1, 8 en MSA-2b y 7 en MSA-2c (Tablas R. 4., R. 5. y R. 6. y Figuras R. 13., R. 14. y R. 15.). En la mayoría de los casos dichos epitopes coincidieron con estructuras de α -hélices, pero no todas las α -hélices contienen epitopes predichos.

Cuatro péptidos denominados P 1 (*msa-2c*): ELLKLLIEA; P 2 (*msa-2b*): YYKKHIS; P 3 (*msa-2a1*): KDYKTMVKFCND y P 4 (*msa-2c*): THDALKAVKQLIKT fueron elegidos para posteriores estudios, porque cumplían uno o más de los siguientes criterios: alta conservación entre aislamientos y cepas, alta antigenicidad media predicha y alta accesibilidad media predicha (Tabla R. 7.). Estos péptidos fueron químicamente sintetizados, conjugados a KLH, e inoculados en ratones. A través de un ELISA indirecto se evaluó la reactividad de cada suero inmune de ratón contra extracto de merozoitos de la cepa R1A (Figura R. 19.). Las muestras evaluadas en cada grupo reaccionaron con los m/z de R1A, mostrando que los epitopes B predichos *in silico* están efectivamente expresados en los parásitos y que los anticuerpos obtenidos contra los péptidos sintéticos son capaces de reconocer los epitopes en su forma nativa en los antígenos de MSA-2 en todos los casos. El número de sueros positivos obtenidos, sin embargo, varió con los diferentes péptidos entre 3 y 8 de los 10 ratones inmunizados para cada grupo, siendo para el péptido 2 para el

que se obtuvo el menor número de ratones positivos. Estos resultados pueden indicar que la antigenicidad en ratones del péptido 2 es baja y es consistente con las predicciones *in silico*.

A través de la técnica de inmunofluorescencia se testeó el reconocimiento de la superficie del parásito por los cuatro sueros anti-péptido, utilizando extendidos de eritrocitos infectados de las cepas argentina R1A o mexicana RAD. Los cuatro sueros anti péptido reaccionaron con la superficie de los parásitos en ambas cepas, resultando en patrones de fluorescencia homogéneos en todos los casos (Figura R. 20. para los anti-péptidos 1 y 2, y resultados no mostrados para los anti-péptidos 3 y 4). Tomados juntos, estos resultados (i) confirman que los epitopes B predichos están efectivamente expresados en el parásito, (ii) demuestran que los anticuerpos anti-péptido son capaces de reconocer las proteínas nativas de los parásitos, (iii) indican que estos epitopes B están homogéneamente distribuidos en la membrana de la superficie de los merozoitos, y (iv) muestran que están conservados entre aislamientos americanos geográficamente distantes, ya que los anticuerpos anti-péptido reaccionan tanto con merozoitos de las cepas R1A como de la cepa RAD.

En etapas futuras sería interesante comprobar si los péptidos seleccionados son inmunodominantes, o sea si son reconocidos por diferentes sueros de campo. Para ello se planea realizar ya sea un ensayo de ELISA indirecto o de Western blot, con los cuatro péptidos acoplados al *carrier* OVA y de esa manera evaluar un alto número de muestras provenientes de infecciones naturales y poder comprobar si se encuentran conservados entre las cepas circulantes en el campo.

Además, se evaluó la capacidad de estos cuatro sueros anti péptido de inhibir la invasión de los merozoitos a los eritrocitos. Brevemente, los merozoitos de la cepa R1A fueron separados de los eritrocitos bovinos por exposición a baja temperatura, incubados con los diferentes sueros, y puestos nuevamente en contacto con eritrocitos frescos, bajo condiciones que permiten el crecimiento. Las muestras de sueros empleadas poseían alto %P por ELISA y también reconocían la superficie del parásito por inmunofluorescencia. Como controles positivos se utilizaron sueros murinos obtenidos contra rMSA-2b, rMSA-2c y extractos completos de merozoitos de R1A. El suero de un ratón inoculado con PBS fue utilizado como control negativo. Después de 96 h de crecimiento se calcularon los PPE en extendidos analizados microscópicamente (Tabla R. 8.). Se pudo observar que la exposición temprana de los merozoitos al suero contra el péptido 2 (YYKKHIS, derivado de MSA-2b) y 3 (KDYKTMVKFCN, derivado de MSA-2a1) inhibió la invasión de

eritrocitos bovinos, como quedó evidenciado por las bajas parasitemias obtenidas después de 96 h de incubación. Se observaron resultados similares para los sueros obtenidos contra las proteínas rMSA-2b, rMSA-2c, y extracto de merozoitos. De esta forma, los datos sugieren que los péptidos YYKKHIS y KDYKTMVKFCN corresponden a epitopes B sensibles a la neutralización y que a su vez están alta o completamente conservados entre las cepas argentinas y mexicanas. Es notable mencionar que la secuencia YYKKHIS coincide con el pico más hidrofílico para el antígeno MSA-2b (Florin-Christensen, M. *et al.*, 2002). Interesantemente, los motivos YYK y VKFCN, muestran absoluta conservación en las secuencias de los péptidos MSA-2a/b provenientes de aislamientos de brotes ocurridos en Australia (Berens, S.J. *et al.*, 2005). Además, la secuencia ANYIKFLT de MSA-2a1 está también altamente conservada entre los aislamientos australianos (Berens, S.J. *et al.*, 2005) y americanos (Figura R. 13) y contribuye con 7 de los 8 aminoácidos presentes en uno de los epitopes B identificados en esta tesis (VANYIKFL, Tabla R. 16).

En particular, las proteínas expuestas en la superficie del parásito contienen epitopes B sensibles a la neutralización que son blancos atractivos para el desarrollo de vacunas. Y como se acaba de mencionar, dos de los epitopes estudiados en esta tesis de los predichos por métodos bioinformáticos, que pertenecen a la proteína MSA-2b y 2a1 resultaron sensibles a la neutralización bajo las condiciones experimentadas, lo que nos indica que esas regiones en particular son importantes en la interacción de estas dos proteínas del parásito con la superficie del eritrocito bovino y por lo tanto deberían estar incluidas en el desarrollo de una vacuna multiepitópica, junto a otras que puedan surgir de estudios posteriores.

Por otra parte, los péptidos 1 y 4, derivados de MSA-2c, no mostraron un efecto inhibitorio en la invasión de los eritrocitos. Dado que los sueros utilizados reaccionaron con los extractos de mz en el ensayo de ELISA, mostrando niveles similares de positividad como los sueros anti-péptido 2 y 3, es improbable que la carencia de efecto obtenido sea debida al bajo título de anticuerpos. Es interesante también mencionar que los sueros contra los péptidos 1 y 4 reaccionaron positivamente con la superficie de los parásitos en el ensayo de inmunofluorescencia, pero no neutralizaron la invasión. Sin embargo nuestros resultados (Figura R. 7. y Tabla R. 8) y estudios previos realizados (Mosqueda, J. *et al.*, 2002b) muestran que la forma recombinante de la proteína MSA-2c efectivamente contiene epitopes B sensibles a la neutralización. Por lo tanto, como posibles explicaciones para este fenómeno, es posible hipotetizar que (i) las regiones de la proteína representadas por los

péptidos 1 y 4 no son críticas para la invasión, (ii) MSA-2c cambia su estructura tridimensional antes de la invasión de tal forma que esos epitopes B se vuelven críticos y no son alcanzados por los anticuerpos, o (iii) existen epitopes B conformacionales que participan en el proceso de invasión y son formados en la proteína rMSA-2c.

Es posible que el algoritmo utilizado por el método predictivo desarrollado por Kolaskar y Tongaonkar posea una sensibilidad algo reducida, ya que por el mismo no se predijo como epitope B una región de la proteína MSA-2a1 que es reconocida por el anticuerpo monoclonal previamente caracterizado MAb 23/70.174 (Goff, W.L. *et al.*, 1988; Reduker, D.W. *et al.*, 1989; Palmer, G.H. *et al.*, 1991; Jasmer, D.P. *et al.*, 1992; Hines, S.A. *et al.* 1992). De todas maneras, el método empleado en este trabajo resultó ser útil para identificar otros epitopes B en las proteínas MSA-2 de *B. bovis*, dos de los cuales resultaron ser sensibles a la neutralización. Esta información, tanto como la aplicación de esta metodología para otros antígenos posibles candidatos vacunales, pueden proveer una ayuda significativa en el futuro desarrollo de vacunas a subunidades contra la babesiosis bovina.

Como se mencionó anteriormente, existen dos vacunas experimentales contra el parásito apicomplejo humano *Plasmodium falciparum* (FALVAC-1, y una versión mejorada FALVAC-1A) que están basadas en proteínas recombinantes quiméricas compuestas de epitopes B y T alineados provenientes de varios antígenos del parásito expresados en diferentes estadios del ciclo de vida del mismo. Estas formulaciones vacunales, producidas tanto en sistemas procarióticos como eucarióticos, resultaron inmunogénicas en ratones y conejos, e indujeron respuestas inmunes que tuvieron actividad anti-parasitaria *in vitro* en los estadios esporozoito y sanguíneo de los parásitos (Shi, Y.P. *et al.*, 1999 y 2000; Zhou, Z. *et al.*, 2006; Ravi, G. *et al.*, 2008). Además, experimentos de vacunación y desafío en monos mostraron protección parcial bajo el desafío (Collins, W.E. *et al.*, 2005). Recientemente también se ha experimentado una vacuna contra malaria en humanos infantes de la zona altamente endémica de Mozambique, la cual se encuentra en fase I/II de experimentación, con resultados muy promisorios. La misma utiliza una proteína recombinante que fusiona una parte de la proteína circumsporozoite de *P. falciparum* con el antígeno de superficie de la hepatitis B, y tiene como blanco la respuesta inmune contra el estadio inyectado por los mosquitos (Aponte, J.J. *et al.*, 2007). *P. falciparum* y *B. bovis* muestran fuertes similitudes: ambos son parásitos apicomplexos transmitidos por vectores, poseen un estadio intraeritrocítico el cual es crítico para su supervivencia, y comparten características en su patobiología (Krause, P.J. *et al.*, 2007). De

esta forma, es posible hipotetizar que una vacuna multiepitópica contra *B. bovis* podría conferir protección al igual que ha sido observado para *P. falciparum*. Por lo tanto, la línea de investigación comenzada en la presente tesis abre la posibilidad de evaluar si este enfoque es útil para la babesiosis bovina.

Finalmente se evaluó la capacidad potencial de dos de los péptidos seleccionados de actuar como epitopes T. Se pudo observar que la vacunación de los ratones con péptido 1 unido a KLH pareciera haber dado lugar a una respuesta de linfocitos T helper, los cuales respondieron a la estimulación con este epítipo al encontrarlo nuevamente en las preparaciones de merozoito. Estos resultados sugieren que el péptido 1 actúa como epítipo T. La falta de estimulación luego de la exposición al péptido (libre, no unido a KLH) podría deberse a que éste no fue provisto en una forma adecuada o en la concentración óptima para ser reconocido por los linfocitos. Por otra parte, la falta de reacción por MSA-2c recombinante, que debería contener el mencionado epítipo T podría deberse a que no fue encontrada la concentración de trabajo adecuada. Cuando los linfocitos provenientes de ratones inoculados con mz, fueron expuestos a esta misma preparación no mostraron una respuesta proliferativa. Una posible explicación para este resultado podría ser que las células estuvieran sobreestimuladas y que estuvieran comenzando a morir. Esta conclusión deriva del hecho que el índice de estimulación con concanavalina A (mitógeno inespecífico) fue bajo en estas muestras.

Por otra parte, cuando se estudió este mismo tipo de respuesta linfoproliferativa de los linfocitos provenientes de ratones inoculados con el péptido 2, no se observó ningún efecto estimulante de la proliferación al ser expuestos a preparaciones de mz, como se obtuvo con el péptido 1. Esto podría indicar o bien que el péptido 2 no actúa como epítipo T, o que se deban ensayar mejor las condiciones y tiempos óptimos para este tipo de experimento, ya que se utilizaron las condiciones previamente seleccionadas por la Dra. Zamorano en experimentos con el Virus Aftosa y Herpes Virus Bovino tipo 1, sin realizar cambios sustanciales.

A pesar que estos experimentos fueron realizados en ratones, los cuales no son un huésped natural de *B. bovis*, se puede hipotetizar que este epítipo también será reconocido por el sistema inmune del bovino ya que numerosos experimentos relativos a la búsqueda de epitopes fueron realizados en ratón y posteriormente confirmados en bovinos (Zamorano, P. *et al.*, 1994, 1995, 1998). En una próxima etapa se espera poder optimizar las condiciones de este ensayo para repetir lo obtenido con los ratones inmunizados con los

péptidos 1 y 2 y agregar los grupos correspondientes a los ratones inmunizados con los péptidos 3 y 4 que aún no han sido evaluados.

D. 4. Desarrollo de métodos de diagnóstico basados en MSA-2c

D. 4.1. Comparación de MSA-2c y RAP-1 en ELISAs indirectos en infecciones experimentales y naturales.

El diagnóstico periódico de la babesiosis bovina en áreas de inestabilidad enzoótica permite evaluar el estatus inmunológico del ganado y determinar la necesidad de vacunación. Los métodos más comunes ampliamente utilizados son la inmunofluorescencia y el ELISA Indirecto basado en extractos de parásitos. En el caso de *Babesia bovis*, la proteína asociada a las roptrias 1 (RAP-1) ha también sido ampliamente explotada en el desarrollo de kits diagnósticos (Boonchit, S. *et al.*, 2002 y 2004). Como se demostró en la presente tesis, MSA-2c posee las condiciones necesarias para constituir un promisorio candidato para diagnóstico por expresarse en la superficie de los merozoitos, ser inmunodominante y por su alto grado de conservación entre diversos aislamientos distantes geográficamente.

En la sección Resultados se describe que la forma recombinante de la proteína MSA-2c es capaz de detectar las inmunoglobulinas presentes en el suero bovino en el transcurso de una infección experimental tanto con una cepa patógena como atenuada a lo largo del tiempo y que su eficiencia es mayor que cuando se utiliza el antígeno RAP-1, que como se mencionó anteriormente, fue el más utilizado hasta el momento en test diagnósticos.

Esto es consistente con lo observado por Bono, M.F. *et al.* (2008) quienes utilizaron un ELISA indirecto basado en la forma recombinante de la proteína de superficie MSA-2c para evaluar muestras a lo largo de 336 días de bovinos inmunizados y reinmunizados con las formas vacunales de *B. bovis* y *B. bigemina*. En este trabajo, se observó que este ELISA resultaba ser útil y altamente sensible en detectar anticuerpos solamente entre los días 42 y 98 luego de la primera inmunización y altamente específico en el análisis de sueros provenientes de áreas no endémicas. Sin embargo, luego de la reinmunización el ensayo mostró menor especificidad. También Kim, CH.M., *et al.* (2008) obtuvieron resultados similares, al desarrollar un test inmunocromatográfico rápido para el serodiagnóstico simultáneo de la babesiosis bovina causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el que utilizaron como antígenos para cada una de las especies formas recombinantes de las

proteínas MSA-2c y RAP-1 respectivamente. Antes de probar dichos antígenos en el test ICT (Immunochromatographic test), desarrollaron dos ELISAs indirectos basados en éstas proteínas. La sensibilidad y especificidad relativas de ambos ensayos fueron determinadas con 30 sueros positivos y 50 sueros negativos de campo previamente evaluados por IFAT y ambas estuvieron por encima del 93 % para ambos ensayos. Con estos ELISAs luego fueron capaces de detectar anticuerpos en sueros provenientes de bovinos experimentalmente infectados entre los días 14 y 93 y 13 y 274 post infección respectivamente. En el trabajo no mencionan la detección de sueros provenientes de animales de campo, salvo para la puesta a punto de los ensayos.

Por otra parte, y aunque no era objeto de esta tesis, es interesante mencionar las diferencias que se observaron en cuanto a la respuesta de los animales inoculados tanto con la cepa patógena como atenuada ante alguno de los antígenos.

Se observó claramente (Figura R. 29.) que los títulos anti-MSA-2c se desarrollan mucho más rápidamente en la cepa patógena que en la atenuada y en ambos casos se mantienen altos a lo largo del tiempo en el período estudiado. Por otra parte, en ambos animales inoculados con la cepa vacunal, los títulos anti-RAP-1 (Figura 30.) descienden abruptamente hacia el final del período de observación, mientras que no se observan descensos de este tipo en ninguno de los dos animales inoculados con la cepa patógena. Por lo tanto estas observaciones podrían indicar una diferencia entre cepas atenuadas y patógenas en cuanto a la expresión de estas proteínas de superficie en el progreso de la infección.

Por otra parte, se ha comparado el rendimiento de las proteínas recombinantes MSA-2c y RAP-1 para detectar anticuerpos anti *B. bovis* presentes en muestras de campo cuando se utilizan en ELISAs indirectos. En el caso de RAP-1 fue utilizado el fragmento C-terminal para evitar la reactividad cruzada con sueros infectados con *B. bigemina*. Se establecieron las condiciones óptimas para los ELISAs, ajustando la concentración de antígeno, el agente bloqueante, el sustrato para el revelado y las condiciones de incubación. Se analizaron 139 muestras de sueros de áreas endémicas para *B. bovis* del Noroeste argentino y 85 de una provincia del Sur de Argentina, utilizando los ELISAs basados en MSA-2c y RAP-1, C-terminal. Los valores para el punto de corte (*cut-off*) fueron calculados por una modificación del método ROC de manera de incluir como negativos todos los valores del área libre de garrapatas.

Los resultados obtenidos revelaron un aparente mejor comportamiento de rMSA-2c que RAP-1 para detectar muestras de campo positivas para *B. bovis* bajo las condiciones utilizadas; al igual que lo observado cuando se compararon los resultados obtenidos con estas proteínas recombinantes comparado cuando se utilizó extracto crudo de mz como antígeno, donde el número de falsos negativos fue el doble para el ensayo de RAP-1 como antígeno que para MSA-2c. Por otra parte cuando se utiliza rMSA-2c como antígeno se detectan una mayor cantidad de falsos positivos.

De todas formas el índice kappa mostró que ambos ensayos no resultan adecuados cuando se los compara con el que utiliza mz como antígeno (y altamente comparable con el ensayo de IFAT).

En conclusión, el ELISA indirecto utilizando una forma recombinante de la proteína MSA-2c como antígeno resulta útil para la detección de anticuerpos en infecciones experimentales, pero no es lo suficientemente sensible cuando se utilizan muestras provenientes de infecciones naturales, bajo las condiciones ensayadas.

D. 4.2. Un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c de *Babesia bovis* adecuado para el desarrollo de un test de ELISA competitivo.

En este trabajo se desarrolló un anticuerpo monoclonal contra MSA-2c de *B. bovis* al que se llamó MAb H9P2C2. En primer lugar se testeó si este MAb era capaz de reaccionar con antígenos de *B. bovis*. El análisis de Western blot demostró que el mismo reconoce una proteína de una banda del tamaño esperado en eritrocitos infectados con la cepa R1A de *B. bovis*, mientras que no se observó reacción hacia eritrocitos no infectados como se mostró en la Fig. R. 36. La reacción del MAb H9P2C2 con la proteína recombinante MSA-2c fusionada a tiorredoxina brindó también la banda del tamaño esperado, mientras que tampoco se observó reacción hacia la proteína rRAP-1 de *B. bovis* producida en el mismo sistema de expresión, que se utilizaron como control negativo (Figura R. 36.)

También se determinó el isotipo de inmunoglobulina G de este MAb anti-MSA-2c en un test de ELISA indirecto. Se obtuvieron lecturas de absorbancia detectables solamente con la anti-inmunoglobulina G1. De esta forma, los resultados claramente muestran que el MAb H9P2C2 es del tipo de inmunoglobulina G1.

Luego, con el objeto de tratar de aumentar la sensibilidad y especificidad brindada por el ELISA indirecto se desarrolló un ELISA competitivo utilizando la proteína rMSA-2c y el anticuerpo monoclonal H9P2C2. Como se describió en Resultados, el test está basado

en la reactividad de los anticuerpos presentes en sueros positivos para *B. bovis* hacia la proteína rMSA-2c pegada a las placas de ELISA, que luego con la incubación con el MAb anti-MSA-2c H9P2C2, el mismo es capaz de unirse a las moléculas de MSA-2c disponibles. La posterior incubación con el conjugado anti-IgG murina unido a peroxidasa y el sustrato cromógeno permite la detección de las moléculas de MSA-2c que en el primer paso no fueron pegadas por anticuerpos bovinos, y la cantidad de color desarrollado está inversamente relacionada a los títulos de anticuerpos anti-MSA-2c.

A través de este ensayo se testaron sueros bovinos provenientes en diferentes momentos de tiempo de animales infectados experimentalmente con la cepa R1A o con la patógena S2P de *B. bovis*, los cuales habían sido previamente caracterizados como positivos por IFAT. Se observó un claro decremento en las mediciones de absorbancia a 490 nm en los sueros positivos con respecto a los controles. Como se pudo observar en la Figura R. 39, los anticuerpos anti-rMSA-2c fueron claramente detectados a los 35 días post infección en los animales infectados con la cepa R1A. En el caso de los bovinos infectados con la cepa S2P, los anticuerpos anti-rMSA-2c pudieron ser detectados a los 65 dpi en ambos casos. Además, en uno de los animales se detectó también un alto porcentaje de inhibición (39%) hacia el día 21 dpi. Interesantemente éste bovino fue inoculado con 10^7 parásitos, mientras que el inóculo utilizado para el bovino I fue de 10^5 . Las muestras que mostraron un porcentaje de inhibición (%I) significativo de acuerdo a este test fueron también diagnosticadas positivamente para *B. bovis* por la técnica de inmunofluorescencia como se mencionó anteriormente. En este punto es importante mencionar que los sueros utilizados en este ensayo correspondientes a la infección experimental son los mismos utilizados en el ensayo de ELISA indirecto, mas cuatro sueros adicionales en el caso de los infectados con la cepa vacunal R1A. Para el caso del ELISA indirecto se analizó los sueros extraídos secuencialmente a partir del día cero de la experiencia, mientras que en el ELISA competitivo no se probaron todos los tiempos, sino tres tiempos sueltos. Con respecto a esto para el caso los sueros provenientes de los animales inoculados con la cepa vacunal, ambos fueron detectados por los dos ensayos en los tiempos 35 y 65 d.p.i., mientras que para el caso de las muestras provenientes de los animales infectados con la cepa S2P ambos sueros en el día 21 post infección fueron detectados por el ELISA indirecto, en tanto que sólo uno de ellos pudo ser detectado por el ELISA competitivo; para el día 65 nuevamente ambos sueros fueron detectados por las dos técnicas. Esto podría indicar una menor sensibilidad del ELISA competitivo con este antígeno para las muestras provenientes de infecciones

experimentales. Por lo tanto, en un futuro cercano se proyecta evaluar este ensayo colocando los sueros sin diluir como una posibilidad de aumentar la sensibilidad del método, ya que ésta condición es la que se utiliza en un trabajo posterior al momento de la puesta a punto de este ensayo, que utiliza RAP-1 como antígeno en un ELISA competitivo (Goff, W.L. *et al.*, 2006). Dado que en nuestros ensayos se obtuvieron mejores resultados al utilizar MSA-2c que RAP-1 en el ELISA indirecto, podemos pronosticar que con el ELISA competitivo utilizando MSA-2c se obtendrán mejores resultados que los obtenidos por Goff, W.L. *et al.*

Además se testearon sueros provenientes de bovinos naturalmente infectados con cepas de campo de *B. bovis* provenientes de una región endémica en la provincia de Salta, Argentina. Estas muestras fueron caracterizadas como positivas por IFAT. Se encontró que todos los sueros testeados ($N = 8$) mostraron un significativo decremento en las lecturas de absorbancia a 490 nm y por lo tanto valores altos en los %I (Figura R. 40).

Estos resultados claramente muestran que la forma recombinante del antígeno de superficie MSA-2c de *B. bovis* y el anticuerpo monoclonal contra la misma pueden ser empleados en el desarrollo de un ELISA competitivo para este patógeno. Ensayos utilizando un mayor número de muestras de suero provenientes de diferentes provincias de regiones endémicas de Argentina y países vecinos, como así también de un mayor número de tiempos secuenciales en el caso de infecciones experimentales, se llevarán a cabo próximamente en nuestro laboratorio para evaluar la eficacia del ensayo con este tipo de muestras.

D. 4.3. Detección de infecciones por *Babesia bovis* en búfalos de la provincia de Corrientes

Se describe asimismo en esta Tesis el uso del ELISA competitivo para comprobar si era posible detectar la infección de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) con los parásitos causantes de la babesiosis bovina. Para ello en primer lugar se hallaron las condiciones óptimas para el uso de dicho ELISA para la detección de anticuerpos anti-*B. bovis* en muestras de suero de estos animales. En este punto es importante destacar que no es conveniente utilizar los sueros bubalinos sin diluir. Cuando se trató de hacerlo de esta forma para tratar de aumentar la sensibilidad del ensayo, hubo reacciones inespecíficas, a diferencia de lo que ocurre con los sueros bovinos. Como se mencionó anteriormente en Resultados esto podría deberse a una composición diferente en los sueros bubalinos.

Muchos autores concuerdan en mencionar que existen diferencias entre los sueros bubalinos y bovinos, aunque no se han hecho estudios profundizando a que nivel son dichas diferencias (Benítez, D., comunicación personal)

Una vez puesto a punto este ensayo, se probó con muestras de búfalos de la provincia de Corrientes, en el que un alto número de muestras (50 de las 103 analizadas) resultaron positivas, indicando que los búfalos de agua pueden estar infectados por estos parásitos.

Lamentablemente no se cuenta en este momento con resultados de inmunofluorescencia, como técnica estándar o de referencia para comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas, por lo tanto en un futuro se espera poder poner a punto la técnica de inmunofluorescencia para ensayar los sueros bubalinos y poder realizar dicha comparación.

La provincia de Corrientes, de donde provienen las muestras estudiadas, es de particular interés ya que en ella se está implementando el Plan Nacional de Lucha contra la Garrapata. Este programa implica la aplicación de baños periódicos con acaricidas en los bovinos de ciertas regiones de la provincia, para eliminar al vector de la babesiosis bovina, la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Por ello, es relevante la importancia de los búfalos de agua como reservorios de garrapatas y de los patógenos que estas transmiten a los bovinos. Estudios preliminares mostraron que las garrapatas *R. microplus* pueden alimentarse sobre la piel de los búfalos, atacando en particular las regiones de piel más fina, como la zona inguinal y las axilas. No existen aún estudios para determinar si las garrapatas pueden completar su ciclo completo durante varias generaciones sobre los búfalos en total ausencia de bovinos, aunque esto es bastante probable ya que tanto la garrapata *R. microplus* como los búfalos de agua son originarios de la India, y podrían por tanto estar adaptados uno al otro y a los parásitos de *Babesia sp.* desde hace mucho tiempo atrás. En cambio sí se ha estudiado que la garrapata de los bovinos es capaz de completar su fase parasítica sobre la especie bubalina cuando se infectaron experimentalmente búfalos del Mediterráneo de 7 meses de edad con larvas de garrapata, aunque el periodo fue levemente mas corto que en el bovino (Benitez, D. *et al.*, 2007).

El hallazgo que el búfalo de agua posee anticuerpos contra el parasito *Babesia bovis*, de acuerdo a los resultados del ELISA competitivo utilizando MSA-2c que se han mostrado en esta Tesis, indican que el búfalo de agua podría actuar como reservorio de *B. bovis*. Estos resultados son sustentados por la detección por nested PCR de la presencia de ADN del parásito en sangre de búfalos de zona endémica (Ferrerri. L. *et al.*, 2008). Estos

resultados son importantes a la hora de implementar medidas para el control de la babesiosis bovina, para las que será útil contar con una herramienta diagnóstica para poder detectar el ganado bubalino seropositivo.

En resumen, este trabajo de Tesis ha aportado herramientas metodológicas e información novedosa que pueden llevar a una mejor comprensión de la biología, variabilidad y patogenicidad de un parásito de gran importancia veterinaria como *B. bovis*, y pueden contribuir al desarrollo de vacunas recombinantes y mejorar los métodos de diagnóstico existentes como así también desarrollar nuevos para su control.

C. Conclusiones

- ♣ Los genes que codifican para los antígenos de superficie de la familia MSA-2: MSA-2a1, 2b y 2c se encuentran presentes en aislamientos de *B. bovis* argentinos, mexicanos y norteamericanos, con un grado de conservación de moderado a alto.
- ♣ Los genes codificantes para MSA-2c son los más conservados de esta familia.
- ♣ MSA-2c se expresa en la superficie de los merozoitos de las cepas R1A y S2P y posee epitopes B sensibles a la neutralización
- ♣ Existe conservación de epitopes B de MSA-2c entre la cepa argentina R1A y la cepa australiana "S".
- ♣ Las proteínas de la familia MSA-2 poseen una estructura secundaria predicha que consiste en una serie de alfa hélices ubicadas en tandem y dada la conservación de esta estructura básica entre aislamientos, se presume que tiene importancia funcional.
- ♣ A través de métodos bioinformáticos fue posible seleccionar epitopes B en los distintos miembros de la familia MSA-2, para los cuales se comprobó empíricamente que eran verdaderos epitopes B presentes en merozoitos de *B. bovis*. Se demuestra por tanto la utilidad de la metodología empleada para la identificación de epitopes B.
- ♣ Algunos de los epitopes B seleccionados resultaron ser sensibles a la neutralización de la invasión de los merozoitos. Estos epitopes constituyen candidatos de elección para el desarrollo de vacunas multiepitópicas para la babesiosis bovina.
- ♣ La secuencia correspondiente al péptido 1, perteneciente a la proteína MSA-2c podría estar actuando como epitope T.
- ♣ La proteína MSA-2c resultó ser un candidato diagnóstico para el desarrollo de un test de ELISA.
- ♣ El ELISA indirecto utilizando una forma recombinante de la proteína MSA-2c como antígeno resulta útil para la detección de anticuerpos en infecciones experimentales. Sin embargo, al igual que lo que ocurre en el ELISA indirecto basado en RAP-1, este ensayo no es lo suficientemente sensible ni específico al compararlo con el ELISA indirecto basado en merozoitos.

- ♣ Se logró producir un anticuerpo monoclonal anti la proteína MSA-2c. Dicho anticuerpo junto a la forma recombinante de la proteína MSA-2c resultaron adecuados para el desarrollo de un ELISA competitivo.
- ♣ El ELISA competitivo resultó efectivo para evaluar muestras de sueros bovinos provenientes tanto de infecciones experimentales como de muestras de campo.
- ♣ El ELISA competitivo es útil también para detectar la presencia de anticuerpos anti *B. bovis* en muestras de búfalo.

B. Bibliografía

B. Bibliografía

- Adler, H., Peterhans, E., Nicolet, J., Jungi, T.W., 1994. Inducible Larginine- dependent nitric oxide synthase activity in bovine bone marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 510–515.
- Ahrens, K.P., Allred, D.R., 1992. Polypeptides reactive with antibodies eluted from the surface of *Babesia bovis*-infected erythrocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87, 21-26.
- Alcaraz, E., 2002. Evaluación de la situación epidemiológica de la babesiosis en Corrientes. En Taller de Babesiosis Bovina, Fundación ArgenINTA, Buenos Aires, Argentina.
- Allred, D.R., Hines, S.A., Ahrens, K.P., 1993. Isolate-specific parasites antigens of *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60, 121-132.
- Anziani, O.S., Guglielmon,e A.A., Abdala, A.A., Aguirre, D.H., Mangold, A.J.,1993. Protección conferida por *Babesia bovis* vacunal en novillos Holando Argentino. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 74, 47-9.
- Aponte, J.J., Aide, P., Renom, M., Mandomando, I., Bassat, Q., Sacarlal, J., Manaca, M.N., Lafuente, S., Barbosa, A., Leach, A., Lievens, M., Vekemans, J., Sigauque, B., Dubois, M.C., Demoitié, M.A., Sillman, M., Savarese, B., McNeil, J.G., Macete, E., Ballou, W.R., Cohen, J., Alonso, P.L., 2007. Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial, *Lancet* 370, 1543–51.
- Bangs, J.D., Hereld, D., Kirakow, J.L., Hart, G.W., Englund, P.T., 1985. Rapid processing of the carbosil terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3207-3211.
- Bannister, L., Mitchell, G., 2003. The ins, outs, and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.* 19, 209-213.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendex, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L., 2002. CD4+ CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507.

- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides, SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340,783-795.
- Benitez, D., Florin-Christensen, M., Cetra, B., 2007, Bovine ticks (*Rhipicephalus microplus*) in water buffalos (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *Parassitologia* 49, 77
- Berens, S.J., Brayton, K.A., Molloy, J.B., Bock, R.E., Lew, A.E., McElwain, T.F., 2005. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun* 73, 7180–7189.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, 247-269.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., Shiels, I.A., Dalgliesh, R.J., 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Parasitol.* 43, 45–56.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Lew, A.E., Kingston, T.G., Fraser, I.R., 1995. Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. *Aust. Vet. J.* 72, 296–300.
- Bono, M.F., Mangold, A.J., Baravalle, M.E., Valentini, B.S., Thompson, C.S., Wilkowsky, S.E., Echaide, I.E., Farber, M.D., Torioni de Echaide, S.M., 2008. Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology* 157, 203–210.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokohama, N., Goff, W.L., Waghela, S.D., Wagner, D., Igarashi, I., 2004. Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein- for detection of specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1601-1604.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W.L., Wagner, G., Igarashi, I., 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3771–3775.

- Brown, W.C., 2001. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 101, 233–248.
- Brown, W.C., Davis, W.C., Tuo, W., 1996. Human IL-12 upregulates proliferation and IFN- γ production by parasite antigenstimulated Th cell clones and γ/δ T cells of cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 795, 321–324.
- Brown, W.C., Logan, K.S., Wagner, G.G. and Tetzlaff, C.L., 1991. Cell mediated immune responses to *Babesia bovis* antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect Immun* 59, 2418–2426.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Hotzel, I., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Stich, R.W., Suárez, C.E., Estes, D.M., Palmer, G.H., 1998. Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 473-482.
- Brown, W.C., Norimine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E., Mcelwain, T.F., 2006b. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunology* 28, 317-327.
- Brown, W.C., Norimine, J., Knowles, D.P., Goff, W.L., 2006a. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology Volume 138 (1-2)*, 75-87.
- Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today* 15, 275–281.
- Brown, W.C., Zhao, S., Woods, V.M., Tripp, C.A., Tetzlaff, C.L., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Rice-Ficht, A.C., 1993. Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis* encoded 77-kilodalton merozoite protein (Bv-I) by use of truncated recombinant fusion protein. *Infect. Immun.* 61, 236-24.
- Callow, L.L., 1977. Vaccination against bovine babesiosis. *Advances in Expl. Med. and Biology* 93, 121-149.
- Callow, L.L., 1979. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. *Journal of the South African Veterinary Association* 50, 353–356.

- Caras, I.W., Weddell, G.N., 1989. Signal peptide for protein secretion directing glycopospholipid membrane anchor attachment. *Science* 243, 1196-1198.

- Clark, I.A., Jacobsen, L.S., 1998. Do babesiosis and malaria share a common disease process? *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 483– 488.

- Collins, W. E., Galland, G.G., Barnwell, J.W., Udhayakumar, V., Sullivan, J.S., Nace, D., Tongren, J.E., Williams, T., Roberts, J., Shi, Y. P., Lal, A..A., 2005. Preliminary observations on the efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* vaccine in *Aotus nancymai* monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 686-693.

- Court, R.A., Jackson, L.A., Lee, R.P., 2001. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. *Int J Parasitol* 19, 29– 37.

- Cowman, A.F., Bernard, O., Stewart, N., Kemp, D.J., 1984. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. *Cell* 37, 653-660.

- Crowther, J.R., 1995. Direct ELISA: Titration of antigen and antibody. En Crowther, J.R. (ed). *Elisa: Theory And Practice*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 119-130.

- Crowther, J.R., 1995. Indirect ELISA. En Crowther, J.R. (ed). *Elisa: Theory And Practice*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 131-160.

- Curnow, J.A., 1968. In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina*. *Nature* 217, 267-268.

- Curnow, J.A., 1973a. Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. *Aust. Vet. J.* 49, 279-283.

- Curnow, J.A., 1973b. The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasites. *Aust. Vet. J.* 49, 290-293.

- Dalrymple, B.P., 1993a. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta trap.* 53, 227-238.

- Dalrymple, B.P., Casu, R.E., Peters, J.M., Dimmock, C.M., Gale, K.R., Boese, R., Wright, I.G., 1993b. Characterization of a family of multi-copy genes encoding rho-try protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis*, and *Babesia canis*. Mol. Biochem. Parasitol. 57, 181-192.
- De Vos, A.J., Bock, R.E., 2000. Vaccination against bovine babesiosis. Ann N Y Acad 916, 540-545
- Dowling, S.C., Perryman, L.E., Jasmer, D.P., 1996. A *Babesia bovis* 225- kilodalton spherical body protein, localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. Infect Immun 64, 2618–2626.
- Draghi, M.G., Cetra, B., Ramirez, L.M., Vanzini, V.R., 1997. Anaplasmosis y Babesiosis. En serie Técnica N°. 28, INTA Mercedes, Corrientes, Argentina.
- Echaide, I., Valentini, B., Torioni de Echaide, S., Mangold, J., Lugaresi, C., 2004. ELISA para el diagnóstico de babesiosis bovina causada por *Babesia bovis*. Resúmenes XIX Congreso Internacional Panamericano de Veterinaria (CD), Buenos.
- Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M., Kutzer, E., 1998. Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. Parasitol. Res 84, 181-187.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., Eisenhaber, F., 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. J Mol Biol. 337(2), 243-253.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related Tools. Nature Protocols 2, 953-971.
- Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., Boger, J., 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol. 55(3), 836-839.
- Estes, D.M., Brown, W.C., 2002. The type 1/type 2 paradigm and regulation of humoral immune responses in cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 90, 1–10.

- Ferguson, M.A.J., Duszenko, M., Lamont, G.S., Overath, P., Cross, G.A.M., 1986. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Biol Chem* 261, 356-363.
- Ferreri, L., Benitez, D., Dominguez, M., Rodríguez, A., Asenzo, G., Mesplet, M., Florin-Christensen, M. and Schnittger, L., 2008. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 149-151.
- Figueroa Millán, J.V., Alvarez Martínez, J.A., 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria* 9(4), 75-104.
- Figueroa, J.V., Buening, G.M., 1991. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 29, 997-1003.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C.E., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., 2002. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect Immun* 70, 3566–3575.
- Friedhoff, K.T., 1988. Transmission of Babesia. En Ristic, M. (ed). *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 23-52.
- Gaffar, F.R., Franssen, F.F.J., de Vries, E., 2003. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. *International Journal for Parasitology* 33(14), 1595-1603.
- Gaffar, F.R., Yatsuda, A.P., Franssen, F.F., de Vries, E., 2004a. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 72, 2947-2955.
- Gaffar, F.R., Yatsuda, A.P., Franssen, F.F., de Vries, E., 2004b. *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in Plasmodium sporozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 25-34.

- Goddeeris, B., 1998. Immunology of cattle. En Pastoret, P.P, Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A. (ed). Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press, San Diego, California, 439-484

- Goff, W., McElwain, T, Suarez, C., Johnson, W.C., Brown, W., Norimine, J., Knowles, D., 2003b. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 38–43.

- Goff, W.L., Davis, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Johnson, W.C., Bailey, J.F., McGuire, T.C..1988. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine serum and monoclonal antibodies. Infect. Immun. 56, 2363-2368.

- Goff, W.L., Johnson, C.C., Cluff, C.W., 1998. *Babesia bovis* immunity. In vitro and in vivo evidence for IL-10 regulation of IFN- γ and iNOS. Ann. N. Y. Acad. Sci. 849, 161–180.

- Goff, W.L., Johnson, W.C., Horn, R.H., Barrington, G.M., Kowles, D.P., 2003a. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. Parasite Immunol 25, 185–188.

- Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Elsasser, T.H., Davis, W.C., Valdez, R.A., 2002a. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- γ - and TNF- α -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. Vet Immunol Immunopathol 84, 237–251.

- Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W., Valdez, R.A., 2001. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ . and inducible nitric oxide synthase mRNA expresión in the spleen. Parasite Immun, 23, 463–471.

- Goff, W.L., Johnson, W.C., Tuo, W., Valdez, R.A., Parish, S.M., Barrington, G.M., Davis, W.C., 2002b. Age-related innate immune response in calves to *Babesia bovis* involves IL-12 induction and IL-10 modulation. Ann N Y Acad Sci 969, 164–168.

- Goff, W.L., Molloy, J.B., Johnson, W.C., Suarez, C.E., Pino, I., Rhalem, A., Sahibi, H., Ceci, L., Carelli, G., Adams, D.S., McGuire, T.C., Knowles, D.P., McElwain, T.F., 2006.

Validation of a Competitive ELISA for Detection of Antibodies Against *Babesia bovis*. Clin. Vaccine Immunol. 13(11), 1112-1116.

- Goodger, B.V., Waltisbuhl, D.J., Wright, I.G., White, M., 1992. *Babesia bovis*, analysis of and preliminary vaccination studies with a defined infected erythrocyte membrane binding antigen. Int. J. Parasitol. 22, 533-535.

- Grupo de Parasitología de la EEA INTA Rafaela, 2003. Tristeza de los bovinos, prevención de la babesiosis y la anaplasmosis bovinas. Revista Hereford 67(630), 60-62.

- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., Precigout, E., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. Parasitology 134, 187-96.

- Hall, T.A., 1999. BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.

- Hein, W.R., Mackay, C.R., 1991. Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. Immunol. Today 12, 30-34.

- Hines, S.A., McElwain, T.F., Buening, G.M., Palmer, G.H., 1989. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. Mol. Biochem. Parasitol. 37, 1-9.

- Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., Suarez, C.E.; Vidotto, O.; Rice-Ficht, A.C., 1995a. Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. Mol Biochem Parasitol, 69, 149-159.

- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Goff, W.L., McElwain, T.F., 1995b. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-I. Infect. Immun. 63, 349-352.

- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., McGuire, T.C., McElwain, T.F., 1992. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. Mol Biochem Parasitol 55, 85-94.

- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469.
- Hope, M., Riding, G., Menzies, M., Colditz, I., Reverter, A., Willadsen, P., 2005. Potential for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate. *Parasite Immunol.* 27(12), 439-45.
- Hüsler, B.R. and Blum, J.W., 2001. Nitrite/nitrate responses to endotoxin in calves. *J Vet Med A* 48, 487–500.
- Igarashi, I., 1988. Host Cell-Parasite Interactions in Babesiosis. En Ristic, M. (ed.), *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, 53-70.
- James, M.A., 1988. Immunology of Babesiosis. En Ristic, M. (ed.), *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 119-130.
- Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Hines, S.A., Perryman, L.E., McGuire, T.C., 1992. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* 55, 75–84.
- Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Perryman, L.E., McGuire, T.C., 1991. A *Babesia bovis* 225-kilodalton protein located on the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane has sequence similarity with a region of glycogen phosphorylase. *Mol Biochem Parasitol* 52, 263–269.
- Jenkins M.C., 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101, 291-310.
- Kakoma, I., and Mehlhorn, H., 1993. *Babesia* of domestic animals. En Kreier, J.P. (ed.), *Parasitic protozoa*, 2° ed., vol. 7. Academic Press, San Diego, California, 141-216.
- Kim, Ch.M., Conza Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. and Igarashi, I., 2008. Development of a Rapid Immunochromatographic Test for Simultaneous Serodiagnosis of Bovine Babesioses Caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78 (1), 117–121.

- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276(1-2), 172-4.
- Krakow, J.L., Hereld, D., Bangs, J.D., Hart, G.W., Englund, P.T., 1986. Identification of a glycolipid precursor of the *Trypanosome brucei* variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem* 261, 12147-12153.
- Krause, P.J., Daily, J., Telford, S.R., Vannier, E., Lantos, P., Spielman, A., 2007. Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. *Trends in Parasitology* 23, 605-610.
- Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., Sugimoto, C., 2004. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 221-227.
- Kuttler, K., 1988. World-wide impact of babesiosis. En Ristic, M. (ed). *Babesiosis of domestic animals and man.* CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 1-22.
- Laemmli U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langley, R.J. and Gray, J.S., 1987. Age-related susceptibility of the gerbil, *Meriones unguiculatus*, to the bovine parasite, *Babesia divergens*. *Exp Parasitol* 64, 466-473.
- Larkin, M.A., Blackshields. G., Brown. N.P., Chenna. R., McGettigan. P.A., McWilliam. H., Valentin. F., Wallace. I.M., Wilm. A., Lopez. R., Thompson. J.D., Gibson. T.J., Higgins D.G., 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948.
- Levy, M.G., Clabaugh, G., Ristic, M., 1982. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 37, 1127-1131.
- Levy, M.G., Ristic, M., 1980. *Babesia bovis*, continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science* 207, 1218-122.
- Lew, A.E., Bock, R.E., Croft, J.M., Minchin, C.M., Kingston, T.G., Dalgliesh, R.J., 1997. Genotypic diversity in field isolates of *Babesia bovis* from cattle with babesiosis after vaccination. *Aust. Vet. J.* 75, 575-578.

- Mahoney, D.F. and Ross, D.R., 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal* 48, 292-298.

- Mahoney, D.F., 1986. Studies on the protection of cattle against *Babesia bovis* infection. In: Morrison, W.I. (ed.). *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Cambridge University Press, 539–545.

- Mayor, S., Menon, A.K., Cross, G.A.M., 1991. Transfer of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors to polypeptide acceptors in a cell-free system. *J cell Biol* 114, 61-71.

- McConville, M.J., Ferguson, M.A.J., 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294, 305-324.

- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., Maguire, T.C., 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J. Immunol.* 138, 2298–2304.

- McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.E., 1991, Molecular characterization and immunogenicity of neutralization sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 213-222.

- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 2002b. *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* 70, 6448–6455.

- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D., Palmer, G.H., 2002a. *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* 70, 1599–1603.

- Musoke, A., Rowlands, J., Nene, V., Nyanjui, J., Katende, J., Spooner, P., Mwaura, S., Odongo, D., Nkonge, C., Mbogo, S., Bishop, R., Morzaria, S., 2005, Subunit vaccine based on the p67 major surface protein of *Theileria parva* sporozoites reduces severity of infection derived from field tick challenge. *Vaccine* 23(23), 3084-95.

- Nevils, M.A., Figueroa, J.V., Turk, J.R., Canto, G.J., Le, V., Ellersieck, M.R., Carson, C.A., 2000. Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. *Parasitol Res.* 86, 437-443

- Nielsen, H. and Krogh, A., 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, 122-130.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1-6.

- Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Mbassa, G., Brown, W.C., 2003. Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect Immun* 71, 5021-5032.

- O'connor, R.M., Lane, T.J., Stroup, S.E., Allred, D.R., 1997. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA 1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 259-270.

- Palmer, G.H., McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., Reduker, D.R., Jasmer, D.P., Shkap, V., Pipano, E., Goff, W.L., Maguire, T.C., 1991. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect Immun* 59 (9), 3340-3342.

- Parker, J.M., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data, correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25(19), 5425-5432.

- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., Jarra, W., 2000. The apilc organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasión, host immunity, and immune evasión. *Microb. Infect.* 2, 1461-1477.

- Ravi, G., Ella, K., Narasu, M. L., 2008. Development of pilot scale production process and characterization of a recombinant multiepitope malarial vaccine candidate FALVAC-1A expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 61, 57-64.
- Reduker, D.W., Jasmer, D.P., Goff, W.L., Perryman, L.E., Davis, W.C., Maguire, T.C., 1989. A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicit bovine antibodies that react with live merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 239-247.
- Riek, R.F., 1963. Piroplasms. En Gammham, Pierce, and Roitt (ed). *Immunity to protozoa*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, England, 160-179.
- Rodriguez, S.D., Buening, G.M., Green, T.J., Carson, C.A., 1983. Cloning of *Babesia bovis* by in vitro cultivation. *Infect Immun.* 42, 15-18.
- Rodriguez, S.D., Buening, G.M., Vega, C.A., Carson, C.A., 1986. *Babesia bovis*: purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp Parasitol* 61, 236–243.
- Ross, J.P., Lohr, K.F., 1968. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9, 557-562.
- Ruef, B.J., Dowling, S.C., Conley, P.G., Perryman, L.E., Brown, W.C., Jasmer, D.P., Rice-Ficht, A.C., 2000. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol* 105(1), 1–12.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2^a edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sam-Yellowe, T.Y., 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* 12, 308-316.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proceedings of National Academy of Science USA* 74, 5463-5467.
- Shi, Y.P, Das, P., Holloway, B., dhayakuma, V.r, Tongren, J.E., Candal, F., Biswas, S., Ahmad, R., Hasnain, S.E., Lal, A.A., 2000. Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate. *Vaccine* 18, 2902-2914.

- Shi, Y.P, Hasnain, S.E., Sacci, J.B., Holloway, B.P., Fujioka, H., Kumar, N., Wohlhueter, R., Hoffman, S.L., Collins, W.E., and Lal, A.A., 1999. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 1615–1620.
- Shoda, L.K.M., Palmer, G.H., Florin-Christensen, J., Florin- Christensen, M., Godson, D.L., Brown, W.C., 2000. Babesia bovis stimulated macrophages express interleukin-10, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. Infect Immun 68, 5139–5145.
- Shoda, L.K.M., Zarlenga, D.S., Hirano, A., Brown, W.C., 1999. Cloning of a cDNA encoding bovine interleukin-18 and análisis of IL-18 expression in macrophages and its IFN- γ -inducing activity. J. Interferon Cytokine Res. 19, 1169–1177.
- Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M., 1996. Molecular cloning of a putative rhopty associated protein homologue from *Babesia divergens*. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 99-102.
- Standfast, N.F. and Jorgensen, W.K., 1997. Comparison of the infectivity of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide (DMSO) or polyvinyl pyrrolidone (PVP). Aust. Vet. J. 75, 62-63
- Stevens, V. L., 1995. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. Biochem. J. 310, 361–370.
- Stich, R.W., Shoda, L.K.M., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T.W., Brown, W.C., 1998. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. Infect Immun 66, 4130–4136.
- Suarez, C. E., Palmer, G. H., Jasmer, D. P., Hines, S. A., Perryman, L. E. and McElwain, T. F., 1991a. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface-exposed epitopes. Mol. Biochem. Parasitol. 46, 45–52.
- Suarez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F., 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (msa-1) locus and identification of a cross-reactive, inhibition-sensitive MSA-1 epitope. Infect Immun 68, 6865–6870.

- Suarez, C.E., McElwain, T.F., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Palmer, G.H., 1994. Interstrain conservation of babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism. *Infect Immun* 62, 3576–9.
- Suarez, C.E., McElwain, T.F., Stephens, E.B., Mishra, V.S., Palmer, G.H., 1991b. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other Apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 329-332.
- Suarez, C. E., Palmer, G. H., Hines, A. and McElwain, T. F., 1993. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infect. Immun.* 61,3511–3517.
- Trueman, K.F., Blight, G.W., 1978. The effects of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aust. Vet. J.* 54, 301–305.
- Uilenberg, G., 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol.* 57(1-3), 19-41.
- Ushe, T.C., Palmer, G.H., Sotomayor, L., Figueroa, J.V., Buening, G.M., Perryman, L.E., McElwain, T.F., 1994. Antibody response to a *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 surface-exposed and neutralization-sensitive epitope in immune cattle. *Infect. Immun.* 62, 5698-5701.
- Vanzini, V.R., Ramirez, L.M., 1994. Babesiosis y Anaplasmosis Bovina, Diagnóstico, epidemiología y control. *INTA-Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)* 25(3), 137-190.
- Wright, I.G., Casu, R., Commins, M.A., Dalrymple, B.P., Gale, K.R., Goodger, B.V., Riddles, P.W., Waltisbuhl, D.J., Abetz, I., Berrie, D.A., 1992. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet. Parasitol.* 44, 3-13.
- Yokoyama, N., Bork, S., Nishisaka, M., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Xuan, X., Suzuki, H., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2003. Roles of the Maltese cross form in the development of parasitemia and protection against *Babesia microti* infection in mice. *Infect. Immun.* 71, 411-417.

- Yokoyama, N., Masashi, O., Igarashi, I., 2006. 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. *Veterinary Parasitology* 138(1-2), 22-32.
- Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I., 2002. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infect Immun* 70, 5822–5826.
- Young, A. S., 1988. Epidemiology of Babesiosis. In Ristic, M. (ed.), *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 81-98
- Zamorano, P., Wigdorovitz, A., Chaher, M.T., Fernandez, F.M., Carrillo, C., Marcovecchio, F.E., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1994. Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV 01 Campos. *Virology* 201(2), 383-387.
- Zamorano, P., Wigdorovitz, A., Perez-Filgueira, M., Carrillo, C., Escribano, J.M., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1995. A 10-amino-acid linear sequence of VP1 of foot and mouth disease virus containing B- and T-cell epitopes induces protection in mice. *Virology*. 212(2), 614-621.
- Zamorano, P.I., Wigdorovitz, A., Pérez Filgueira, D.M., Escribano, J.M., Sadir, A.M., Borca, M.V., 1998. Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. *Vaccine* 16(6), 558-563.
- Zhou, Z., Todd, C.W., Wohlhueter, R.M., Price, A., Xiao, L., Schnake, P., Bonner, P.C., Martin, A.M., Goldman, I.F., De La Vega, P., Udhayakumar, V., Lal, A.A., 2006. Development, characterization and immunogenicity of a multi-stage, multi-valent *Plasmodium falciparum* Vaccine Antigen (FALVAC-1A) expressed in *Escherichia coli*. *Human Vaccines* 2(1), 14-23.
- Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E., Mulcahy, G., 2005. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunology* 2.