

Tesis Doctoral

Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina

Petrigh, Romina Sandra

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Petrigh, Romina Sandra. (2010). Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Petrigh, Romina Sandra. "Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Babesia bigemina*

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Romina Sandra Petrigh

Director de tesis: Dra. Marisa Diana Farber
Consejero de estudios: Dra. Beatriz Sasseti

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar

Buenos Aires, diciembre de 2010

Identificación y caracterización de antígenos de *Babesia bigemina*

Los protozoarios intraeritrocitarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son los agentes causales de la babesiosis bovina, una enfermedad transmitida por la garrapata *Rhipicephalus microplus* que provoca importantes pérdidas económicas a la ganadería en áreas enzoóticas. En tal sentido resulta de gran relevancia la identificación de genes y la caracterización de proteínas para el desarrollo de pruebas diagnósticas de elevada sensibilidad y especificidad y el diseño racional de vacunas.

En este trabajo, hemos desarrollado un método de detección molecular de *B. bigemina*, basado en la amplificación del gen *rap-1a*, útil para el estudio epidemiológico de la babesiosis bovina en áreas enzoóticas. La PCR en un solo paso, resultó altamente específica detectando 0,00002% de parasitemia.

Por otra parte, para la identificación de nuevos antígenos de *B. bigemina*, se aplicaron dos estrategias: proteómica y herramientas de genómica comparativa.

A través de la aproximación proteómica logramos extraer y separar en geles de dos dimensiones las proteínas solubles del estadio de merozoíto de *B. bigemina* que fueron reconocidas por sueros de bovinos infectados.

A partir de las secuencias disponibles del proyecto genoma de *B. bigemina* y en base a la información proveniente de los genomas anotados de otros apicomplejos, pudimos identificar, anotar y caracterizar una familia de ocho genes que codifican para proteínas del tipo perforina (PLP) con el dominio de ataque a membrana MACPF en *B. bigemina*. Además se demostró que si bien todos los genes *plp* se transcriben en el estadio intraeritrocitario, particularmente los genes *plpb* y *plpe* presentan una tasa transcripcional significativamente mas alta indicando su importancia en este estadio. Asimismo, el reconocimiento de la proteína PLPA por los sueros bovinos infectados puede ser considerado como un indicio de la participación de esta proteína en la salida del parásito del eritrocito.

Este trabajo de tesis contribuye al estudio de la babesiosis bovina a través del desarrollo de herramientas de diagnóstico y de la identificación de genes implicados en los mecanismos moleculares que median la interacción parásito-hospedador.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, detección molecular, antígeno, proteómica, genómica comparativa, perforinas.

Identification and characterization of *Babesia bigemina* antigens

The intraerythrocytic Protozoan, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, are causal agents of bovine babesiosis, a tick-borne disease transmitted by *Rhipicephalus microplus* that cause important economic losses to livestock in areas where the disease is enzootic. In this regard is important the gene identification and protein characterization in order to develop highly sensitive and specific diagnostic methods and rational vaccines.

In this work, we developed a molecular test, based on *rap-1a* gene amplification, for *B. bigemina* detection, a useful tool for epidemiological studies of babesiosis in enzootic areas. The one-step PCR assay was highly specific and sensitive detecting up to 0.00002% of parasitemia.

Moreover, to identify relevant *B. bigemina* proteins to the development of methods of diagnosis and control of babesiosis, we applied two strategies: proteomic and comparative genomic tools.

In the proteomic approach we could purify and separate *B. bigemina* merozoites proteins using two dimensional gels and detecting immunodominant proteins using bovine sera.

The bioinformatic tools applied to the available sequences of the *B. bigemina* genome project based on data from the annotated genomes of other apicomplexans, allowed us to identify, annotate and characterize a perforin-like proteins family (PLP) in *B. bigemina* containing a membrane-attack complex domain (MACPF). Transcriptional studies showed that while all *plp* genes are transcribed in the intraerythrocytic stage, particularly *plpe* and *plpb* genes have a significantly higher transcriptional rate, which may suggest its possible role in intraerythrocytic stage. Furthermore, PLPA recognition of bovine sera from animals infected can also be considered as an indication of the involvement of this protein in the exit of the parasite erythrocyte.

This thesis work, contributes to the study of bovine babesiosis through the development of diagnostic tools and the identification of genes involved in the molecular mechanisms that mediate the parasite-host cell interaction.

Keywords: *Babesia bigemina*, molecular detection, antigen, proteómica, comparative genomic, perforin.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que me abrieron las puertas y me mostraron caminos.

A la Universidad Pública y gratuita! Porque gracias a eso pude estudiar lo que me apasiona.

Al INTA y a toda la gente que lo hace posible por brindarme la oportunidad de poder realizar mi doctorado. A toda la gente del Instituto de Biotecnología que aportaron cada uno desde su lugar a este trabajo de tesis y que me hicieron sentir siempre en casa.

A mi directora Marisa Farber por permitirme hacer mi trabajo de tesis en su laboratorio y por mostrarme que a pesar de las dificultades se puede seguir adelante. Gracias por hacerme dar cuenta de cual era mi verdadero caminino. A Sil por su energía positiva y por aportarme soluciones prácticas cuando las cosas se ponían difíciles.

A las chicas de la cocina: Majo, Ro, Vilmita, La Isa (mi madre postiza), a Jorge por estar siempre dispuestos a ayudar y por darme todo su cariño. A Fabi por la buena predisposición para ir a buscar las infinitas encomiendas que venían desde Rafaela con la Babesias. A Gra por hacerme compañía después de hora. A Vale Rocha y a Laura Ramos por la infinidad de veces que me salvaron con las soluciones que me faltaban. A la gente de secuenciación, a Luis por proveerme de TODOS los papers que necesité durante la tesis.

A la gente de los laboratorios de “brucelosis” y “tuberculosis” por todo lo que me enseñaron. Especialmente a Martín, Kary, Andre, Virginia y Alicia que me bancaron desde el principio y me ayudaron con sus consejos.

A Pau Fernandez por su gran ayuda con las Real Time y por sus palabras de aliento.

A la López Bilbao por llevarme y traerme, por escucharme, por aconsejarme.

A toda la gente del laboratorio de Inmunología del INTA de Rafaela por abrirme sus puertas y recibirme siempre tan bien. Le agradezco muchísimo a Ignacio Echaide de la EEAA del INTA Rafaela por toda la ayuda que me brindó en este trabajo de tesis, no solo por todo lo que me enseñó de la babesiosis y de *Babesia bigemina* sino también por todo lo que me enseñó sobre la vida. Gracias por estar siempre al “pie del cañon” durante mis estadías en tu laboratorio y por confiar en mi. A Susana Echaide también por estar! A Trichi por enseñarme tanto, por la buena onda, por estar siempre al lado mío en mis ensayos eternos con los cultivos. Gané una amiga!!

Al grupo de Parasitología del Instituto de Patobiología por poner lo mejor para que el ensayo con garrapatas, Yoyo, a Gaby B y Mirta, Gaby y a Damián.

A Juan Mosqueda de la Universidad de Querétaro (México) por su gran ayuda para poder seguir adelante con este trabajo, por responder siempre mis dudas, por estar desde la distancia y por sus tan sabios consejos. Sos un referente para mi!

A las personas valiosas que conocí en el INTA: a mis compañeros y sobre todo amigos: a Pauli por estar siempre en los momentos buenos y malos, por todas las veces que me acompañó, por enseñarme, por sus consejos. Te admiro mucho! A Ro, por permitirme entrar en su vida y darme cuenta de la grandiosa persona que es, por hacerme bajar a la tierra, por el viaje a las cataratas. A mi panelita Gaby! A Pablito por toda la ayuda y porque a su manera siempre me hace sentir que soy su amiga. A Marianito, por la buena onda, por su ayuda incondicional, por enseñarme muchas cosas de la vida y por todo su cariño en los momentos difíciles. A Juli por estar siempre, por hacerme olvidar de todo y reirme un rato. Al Chango Miranda! (PP) porque a pesar del poco camino recorrido juntos siento que logramos una conexión increíble, por estar en estos últimos momentos, por hacerme reir mucho, por cantar conmigo y a la chiquita...Eli, por su dulzura, su cariño, su sonrisa, por escucharme, por compartir tantas cosas desde que entró. Sos una amiga muy especial para mi, gracias por todo lo que hiciste y haces por mi!

A mis amigos biólogos: Dieguito que se me fue lejos, Marce por sus palabras que tan bien me hicieron en este último tiempo, a Caro Ponti por tanto momentos y por estar siempre. A Carito por todo su cariño y estar siempre, a Gaby por recorrer tantos caminos juntas, por estar siempre.

A mis amigos del corazón: a Cary que de alguna manera siempre me acompañó, a Marce, a mi hermanito del alma Mati por estar siempre! por escucharme tantas veces! A Javi por todo lo que me enseña. A Pato por acompañarme tanto y por darme fuerzas para seguir adelante, te admiro mucho! A Her, por devolverme una de las cosas que más amo en la vida: el canto, por hacerme sentir tan bien, por ser mi amigo.

A la familia Petrih, Lazarte y la familia política por estar a mi lado en todas las etapas y confiar siempre en mi. A Moni y a Mauri, a mi suegra y a mis cuñadas, a Miri a Martinita. A mi hermano, Naty y mis sobris Male y Agus por acompañarme siempre en todos los momentos de la vida y por todo el amor que me brindan. A mis nonos que de alguna manera son parte de lo que soy y al abuelo Pochocho y la abuela Ana que ya no están físicamente pero siempre me acompañan.

Eternamente agradecida a mis padres, por acompañarme en todo, por enseñarme a hacer las cosas con humildad y por darme la posibilidad de estudiar lo que quería a pesar de las dificultades económicas. Los amo con toda mi alma y este trabajo de tesis va dedicado a ellos.

y finalmente a mi compañero de la vida: Hosse, a la persona que me hace feliz todos los días desde hace 9 años, por estar siempre, por apoyarme tanto durante toda la tesis, por ayudarme, porque sin él no podría haber llegado a ningún lado, por eso también esta tesis te la dedico a vos mi amor.

“El viaje no termina nunca. Solo los viajeros terminan. Y también ellos pueden subsistir en memoria, en recuerdo, en narración... El fin de un viaje es solo el inicio de otro viaje”

José Saramago

Índice

Introducción	1
1. La babesiosis bovina	1
2. El vector transmisor	3
2.1. Clasificación taxonómica	3
2.2. Características generales de <i>R. microplus</i>	4
2.3. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	4
3. <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina</i>	5
3.1. Clasificación taxonómica y filogenia	5
3.2. Morfología	6
3.2.1. Estructura del merozoíto	7
3.3. El ciclo de vida	9
3.4. Caracterización genómica	12
3.5. Respuesta inmune	13
3.5.1. Respuesta inmune innata	14
3.5.2. Respuesta inmune adaptativa	15
3.6. Diagnóstico de la babesiosis	16
3.6.1. Diagnóstico directo	16
3.6.1.1. Detección del parásito	16
3.6.1.2. Detección molecular de <i>B. bigemina</i>	16
3.6.2. Diagnóstico indirecto	17
3.7. Búsqueda de antígenos	18
3.7.1. Antígenos más relevantes de <i>B. bigemina</i>	19
3.8. Mecanismos de invasión en <i>Babesia</i>	21
3.8.1. Proteínas involucradas en la invasión: de <i>Plasmodium</i> a <i>Babesia</i>	23
3.8.2. Proteínas del tipo perforinas	25
3.8.3. La familia del tipo perforinas en <i>Apicomplexa</i>	28
3.8.3.1. Expresión de los genes <i>plp</i> en <i>Apicomplexa</i>	30
3.8.3.2. Rol de las PLPs en <i>Apicomplexa</i>	31

Objetivos	34
Materiales y Métodos	35
1. Parásitos	35
1.1. Cepas de referencia	35
1.2. Cultivo de <i>Babesia</i> spp. en eritrocitos bovinos	36
2. Extracción de ADN	36
2.1. Extracción a partir de muestras de sangre infectadas con <i>Babesia</i> spp.	36
2.1.1. Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo	36
2.1.2. Extracción con detergentes	37
3. Extracción de ARN	38
3.1. Extracción de ARN con trizol LS a partir de cultivos de <i>Babesia</i> spp.	38
3.2. Eliminación de contaminación con ADN	38
4. Método de detección del parásito	39
4.1. Búsqueda de secuencias del gen <i>rap-1a</i>	39
4.1.1. Diseño de oligonucleótidos	39
4.1.2. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos con el templado	39
4.1.3. Límite de detección de la PCR	41
5. Detección y cuantificación de los transcritos correspondientes a los genes <i>plp</i> de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	41
5.1. Northern Blot	41
5.1.1. Corrida electroforética	41
5.1.2. Transferencia de gel a membrana de nylon	42
5.1.3. Síntesis y marcación de sondas	42
5.1.4. Prehibridación e hibridación	43
5.2. RT-PCR de punto final	44
5.2.1. Síntesis del ADN copia (ADNc)	44
5.2.2. Diseño de los oligonucleótidos específicos	45
5.2.3. RT-PCR para verificar la anotación del gen <i>Bbip1pc</i>	46
5.3. RT-PCR cuantitativa	47
5.3.1. Determinación de la concentración óptima de los oligonucleótidos	47
5.3.2. Eficiencia de la amplificación de los genes	49
5.3.3. Transcripción de los genes <i>plp</i>	49
5.3.4. Análisis estadístico	51

6.	Expresión de la proteína recombinante PLPA de <i>B. bigemina</i>	51
6.1.	Clonado del gen <i>Bbiplpa</i>	51
6.2.	Expresión y purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes	53
6.3.	Producción de sueros de ratón	56
6.3.1.	Ratones	56
6.3.2.	Preparación del inóculo	56
6.3.3.	Inoculación de los ratones	56
6.3.4.	<i>Western Blot</i> con sueros de ratón	57
6.4.	Inmunodetección de BbiPLPA recombinante con sueros bovinos	57
6.5.	Inmunofluorescencia indirecta con sueros de ratón	57
7.	Análisis proteómico	58
7.1.	Extracción de proteínas solubles del estadio intraeritrocitario de <i>B. bigemina</i>	58
7.1.1.	Lisis de eritrocitos parasitados por <i>Babesia bigemina</i>	58
7.1.2.	Purificación de merozoítos de <i>Babesia bigemina</i>	58
7.1.3.	Preparación de muestras para isoelectroenfoque	59
7.2.	Electroforesis en dos dimensiones	61
7.2.1.	Separación de proteínas en la primera dimensión: (IEF)	61
7.2.2.	Separación de proteínas en la segunda dimensión: (SDS-PAGE)	62
7.2.3.	Tinción con Coomassie coloidal	63
7.2.4.	Transferencia a membrana de PVDF	63
7.2.5.	<i>Western Blot</i>	63
7.3.	Predicción del punto isoeléctrico y geles virtuales en dos dimensiones	64
8.	Análisis Bioinformático	64
8.1.	Búsqueda de secuencias	64
8.2.	Anotación de los genes	65
8.3.	Alineamientos de secuencias	65
8.4.	Predicción de estructura secundaria y terciaria de las proteínas	65
8.5.	Identificación y caracterización molecular de secuencias repetitivas	67
8.6.	Análisis filogenético	68

Resultados	70
Objetivo 1. Desarrollo de un método de detección molecular de <i>B. bigemina</i> sensible y reproducible a partir de la información genómica disponible	70
1.1. Identificación del gen <i>rap-1a</i> de <i>B. bigemina</i>	70
1.2. Desarrollo de PCR en un solo paso para la detección de <i>B. bigemina</i>	73
Objetivo 2. Identificación de antígenos de <i>B. bigemina</i>	79
2.1. Proteómica: separación en dos dimensiones de extractos proteicos del estadio intraeritrocitario de <i>B. bigemina</i> para la detección de antígenos inmunoreactivos utilizando sueros de bovinos infectados	79
2.1.1. Optimización de la purificación de proteínas totales de merozoítos de la cepa de referencia BbiS2P	79
2.1.2. Detección de antígenos inmunoreactivos a un suero bovino infectado con <i>B. bigemina</i>	81
2.1.3. Distribución de las proteínas de <i>Babesia</i> spp. según su punto Isoeléctrico	84
2.2. Genómica: Identificación y caracterización de genes potencialmente involucrados en los mecanismos de interacción patógeno-hospedador específicos para el phylum Apicomplexa	89
2.2.1. Identificación de la familia de genes que codifican para proteínas con dominio MACPF en <i>Babesia bovis</i>	89
2.2.2. Identificación y anotación de proteínas con dominio MACPF en <i>Babesia bigemina</i>	92
2.2.3. Estudio estructural del dominio MACPF en <i>Babesia</i> spp.	98
2.2.3.1. Predicción de la estructura secundaria	98
2.2.3.2. Predicción de la estructura tridimensional del dominio MACPF	102
2.2.3.3. Predicción de otros dominios: Repeticiones en tándem	110
2.2.4. Historia evolutiva de la familia del tipo perforina en el phylum Apicomplexa	122
2.2.4.1. El dominio MACPF en el phylum Apicomplexa	122

2.2.4.2.	Análisis filogenético del dominio MACPF en Haemosporida y Piroplasmida	128
2.2.4.3.	Reconstrucción filogenética de la familia de las PLPs en Haemosporida y Piroplasmida	137
2.2.5.	Transcripción de los genes <i>plp</i>	139
2.2.5.1.	Transcripción en el estadio intraeritrocitario de <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i>	139
2.2.5.2.	Transcripción diferencial de los genes <i>plp</i> en el estadio intraeritrocitario	141
2.2.6.	Caracterización de la proteína PLPA de <i>B. bigemina</i>	155
2.2.6.1.	Producción de BbiPLPA recombinante (BbiplpAr)	155
2.2.6.2.	Producción de sueros policlonales específicos contra BbiPLPA	156
2.2.6.3.	Expresión de la proteína BbiplpA en el estadio intraeritrocitario	157
2.2.6.4.	Reconocimiento de la proteína recombinante BbiplpAr por sueros bovinos	159
	Discusión	160
	Referencias bibliográficas	170
	Sitios de Internet utilizados	192

Introducción

1. La babesiosis bovina

La babesiosis es una enfermedad que afecta a un amplio rango de vertebrados silvestres o domésticos y ocasionalmente al humano, principalmente distribuída en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Es causada por protozoarios intraeritrocitarios del género *Babesia*, los cuales son transmitidos por garrapatas (Levine, 1988).

Esta enfermedad se caracteriza por síntomas tales como fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria y en casos severos puede causar la muerte del individuo (Ristic, 1988).

En el bovino las dos especies que se encuentran con mayor frecuencia son *B. bovis* y *B. bigemina*. La sintomatología que causa la infección por estos parásitos es similar aunque con algunas diferencias destacables: la infección por *B. bigemina* genera en el bovino una alta hemólisis provocando una anemia severa con hemoglobinuria, mientras que en la infección por *B. bovis* estos signos son más leves pero se produce el secuestro de eritrocitos parasitados en los capilares de la materia gris del cerebro (Zlotnic, 1953; Callow y Macgavin, 1963; Rogers, 1971; Patarroyo y col., 1982). Este efecto hace que los eventos químicos e inmunológicos posteriores induzcan una manifestación clínica diferente, caracterizada por signos neurológicos y conocida como babesiosis cerebral (Callow y Macgavin, 1963; Kessler y col., 1983).

Los dos patógenos responsables de la babesiosis bovina se presentan juntos en la mayoría de las áreas donde esta enfermedad es enzoótica, con una alta incidencia entre el paralelo 40°N y 32°S de latitud donde habita el vector transmisor, la garrapata del género *Rhipicephalus* (McCosker, 1981). En Argentina la zona endémica de la enfermedad se encuentra hacia el Norte del paralelo 33° y se corresponde con la distribución de su vector artrópodo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, las cuales están presentes en gran parte del Noroeste y Noreste Argentino (NOA y NEA). La distribución de *R. microplus* de acuerdo a los datos aportados por el SENASA en 1999 se muestra en la Figura 1.

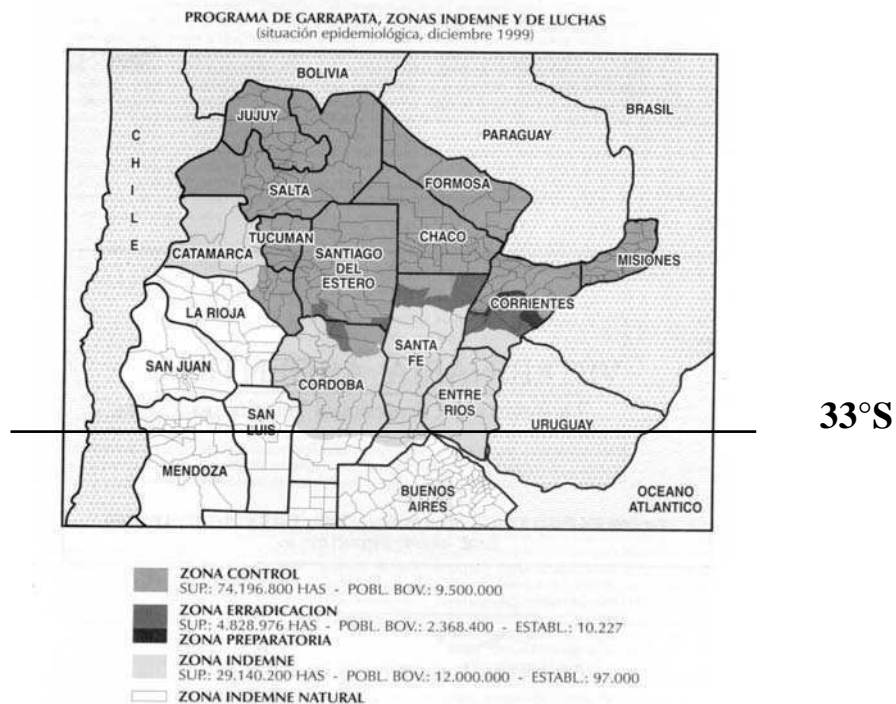


Figura 1. Distribución de *R. microplus* según datos del SENASA (1999). En distintos tonos de grises se marcan las zonas correspondientes a la situación en cuanto a los planes de lucha contra la garrapata. El paralelo 33° divide el mapa entre zona endémica para la babesiosis y zona libre de la enfermedad.

En Argentina, a pesar de que la infestación por garrapatas constituye un obstáculo para la actividad ganadera, los relevamientos epidemiológicos y económicos de la situación son escasos. Según un estudio llevado a cabo por Späth y col. (1994), la garrapata *R. microplus* y las enfermedades que transmite a los bovinos (anaplasmosis y babesiosis) representan un problema económico relevante para la producción pecuaria nacional. En nuestro país el número de bovinos infectados alcanza los 9.900.000 animales, lo que constituye aproximadamente el 19% de la población bovina total del país. Las pérdidas directas y los costos para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades se han estimado en 38,9 millones de dólares por año, considerando el efecto de los hemoparásitos (mortalidad y morbilidad) y el costo del control de los mismos a través de vacunas vivas (Späth y col., 1994).

Los métodos actuales de control de la enfermedad incluyen el tratamiento farmacológico de los animales afectados, el control de la garrapata por medio de acaricidas y la vacunación con cepas de *Babesia* atenuadas en su patogenicidad, que garantizan un estado de fuerte protección inmunológica. Sin embargo el uso de estas cepas atenuadas presenta algunas características poco deseables como el riesgo de reversión de su estado de atenuación, la posibilidad de transmitir

conjuntamente otros microorganismos patógenos, un sistema de producción laborioso y la vida media corta cuando se comercializa refrigerada (De Vos y Bock, 2002). Por esta razón existe un particular interés en la búsqueda, identificación y caracterización de antígenos que induzcan una eficiente respuesta inmune protectora, los cuales podrían ser utilizados en el desarrollo de vacunas.

Para el control estratégico de la babesiosis, es fundamental la identificación de los bovinos con infecciones agudas y crónicas. Para ello se requiere de pruebas para diagnóstico de elevada sensibilidad y especificidad.

El mejoramiento de los métodos de diagnóstico de la babesiosis bovina en países tropicales y subtropicales, ha sido motivo de estudio en el pasado. En la actualidad la importancia global de la babesiosis se incrementó sobre todo en los países desarrollados que intentan mejorar la producción de carne introduciendo razas de *Bos taurus* que resultan más susceptibles a la enfermedad. Por lo tanto, la necesidad de encontrar métodos efectivos radica en identificar las especies de hemoparásitos y las cepas que ocasionan la enfermedad, determinar la distribución de especies de parásitos y evaluar el riesgo de enfermedad de un rodeo a nivel regional o nacional, certificar el estado de sanidad de un rodeo para cumplir con los requisitos comerciales y de erradicación de la enfermedad, identificar o confirmar la causa de la enfermedad o muerte (Brotos) e identificar específicamente los artrópodos como vectores de transmisión de la enfermedad.

En tal sentido se plantea la necesidad de identificar antígenos conservados como candidatos para ser incluidos en el desarrollo de pruebas diagnósticas.

2. El vector transmisor

2.1. Clasificación taxonómica

Como se mencionó anteriormente, el vector transmisor de *B. bovis* y *B. bigemina* al ganado bovino (*Bos taurus*) es *R. microplus*. Este organismo pertenece al phylum Arthropoda, clase Arachnida, subclase Acari, orden Ixodida, familia Ixodidae, género *Rhipicephalus*, subgénero *Boophilus*, especie *microplus*.

2. 2. Características generales de *R. microplus*

Es un parásito obligado de un solo hospedador, en este caso el bovino, que requiere sangre y líquidos tisulares del hospedador para su desarrollo. Los efectos perjudiciales sobre el bovino son directos, por la succión de sangre y lesiones dérmicas, e indirectos por la transmisión de hemoparásitos. Poseen un ritmo de alimentación lento debido a su cutícula más quitinizada. (Garrapatas duras). Además cada estadio, antes de mudar, se alimenta durante días y hasta semanas.

2. 3. Ciclo de vida de *R. microplus*

Los estadios evolutivos principales son huevos, larvas, ninfas y adultos. El ciclo de vida de esta garrapata posee fases de vida libre y de vida parasitaria (Figura 2).

Luego de la oviposición de la hembra kenogina transcurren aproximadamente de 30 a 70 días durante los cuales los huevos permanecen en las pasturas. Transcurrido este tiempo los huevos eclosionan dando lugar a las larvas de vida libre que permanecerán en las pasturas de 25 a 120 días hasta endurecer su exoesqueleto de quitina y encontrar un hospedador. Una vez encontrado, la larva permanece en el bovino como tal durante 3 días hasta que comienza la muda hacia el estadio de metalarva y luego de 3 o 4 días a ninfa. Las ninfas se alimentan de la sangre del bovino durante 3 días y al día 9 se convierten en metaninfa, al día 15 en neoginas y en gonandros (machos). Hacia el día 19 aparecen las primeras teleoginas y alrededor de los 21 y 28 días completamente ingurgitadas terminan su desarrollo y se desprenden para desovar fuera del hospedador (kenogina). La transición de larvas a ninfas y de ninfas a adultos se lleva a cabo mediante metamorfosis con pérdida de cutícula (muda). Las condiciones ambientales influyen sobre la duración de las etapas del ciclo de vida libre (Nuñez y col., 1987).

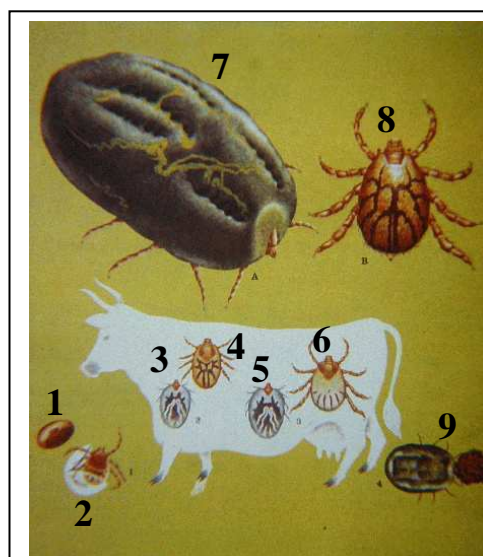


Figura 2. Ciclo de vida de *R. microplus*. 1: huevo, 2: larva (1 y 2 fase de vida libre), 3: metalarva, 4: ninfa, 5: metaninfa, 6: neogina, 7: teleogina (hembra adulta), 8: gonandro (macho), 9: kenogina. (De 3 a 8 fase parasitaria y 9: hembra ponedora de huevos)

3. *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*

3. 1. Clasificación taxonómica y filogenia

Los parásitos que infectan al ganado bovino, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, son eucariotas inferiores alveolados pertenecientes al phylum Apicomplexa, la clase Aconoidasida, orden Piroplasmida y familia Babesiidae.

El phylum Apicomplexa contiene muchos patógenos importantes (Levine, 1988). Los miembros más relevantes de este phylum son los parásitos causantes de la malaria del género *Plasmodium* y el coccidio *Toxoplasma gondii* que causa toxoplasmosis aguda en humanos inmunocomprometidos y en fetos con infección congénita (Montoya y Liesenfeld, 2004).

En un linaje importante de este phylum se encuentran los parásitos del género *Babesia* y *Theileria*, este último género es causante de la enfermedad denominada theileriosis tropical y de la fiebre de la costa oeste en el ganado bovino (Gardner y col., 2005; Pain y col. 2005). Además, se encuentran en este phylum el parásito *Cryptosporidium*, que causa criptosporidiosis en humanos y animales (Abrahamsen y col., 2004).

La disponibilidad reciente de las secuencias de los genomas anotados de muchos de estos organismos provee una gran oportunidad para comprender su filogenia. La utilización de estas secuencias en estudios filogenéticos es bastante reciente. El gran número de caracteres derivados de datos genómicos ha permitido hacer inferencias robustas en cuanto a la filogenia en apicomplejos (Delsuc y col., 2005; Philippe y col., 2005; Rokas, 2006).

Un análisis filogenético reciente ha inferido el árbol de especie de los apicomplejos generado a partir del alineamiento de 268 genes de copia simple concatenados (Kuo y col., 2008) (Figura 3).

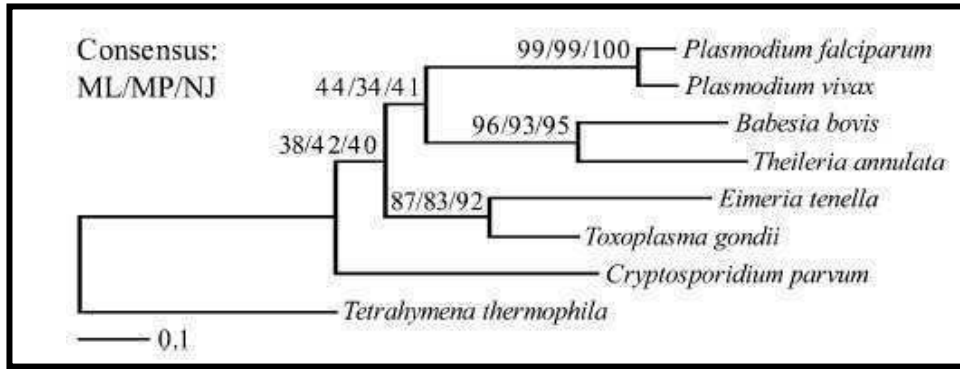


Figura 3. Árbol filogenético de las especies del phylum Apicomplexa realizado por Máxima Verosimilitud. Se incluye el ciliado de vida libre *Tetrahymena thermophila* como grupo externo. El soporte *Boostrap* basado en 100 réplicas es 100% en todas las ramas internas. Los valores por encima de las ramas indican el nivel de apoyo por consenso basado en ML (Máxima Verosimilitud), MP (Máxima Parsimonia) y NJ (Método de distancia, *Neighbor joining*) (Kuo y col., 2008).

En el árbol filogenético de especie de los apicomplejos, los parásitos del orden Piroplasmida *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria parva* y *Theileria annulata* (representado en el árbol de la figura 3 por *B. bovis* y *T. annulata*) forman un grupo hermano con el orden Haemosporida (representado por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*).

3. 2. Morfología

La presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en la sangre de los bovinos puede ser detectada por observación al microscopio óptico de extendidos finos de sangre periférica coloreados con la tinción de May Grünwald-Giemsa. En estos preparados, los eritrocitos infectados contienen distintas formas del parásito, las formas simples ovaladas (merozoítos), las formas de anillo (trofozoíto) y las formas pares (merozoítos luego de la división celular) (Figura 4). En el caso de *B. bovis* estos cuerpos ovalados miden alrededor de 2 x 1,5 µm, mientras que *B. bigemina* mide 4,5 x 2 µm. Es por esta razón que a *B. bigemina* se la incluye dentro de las babesias “grandes” y a *B. bovis* dentro del grupo de las “pequeñas”.

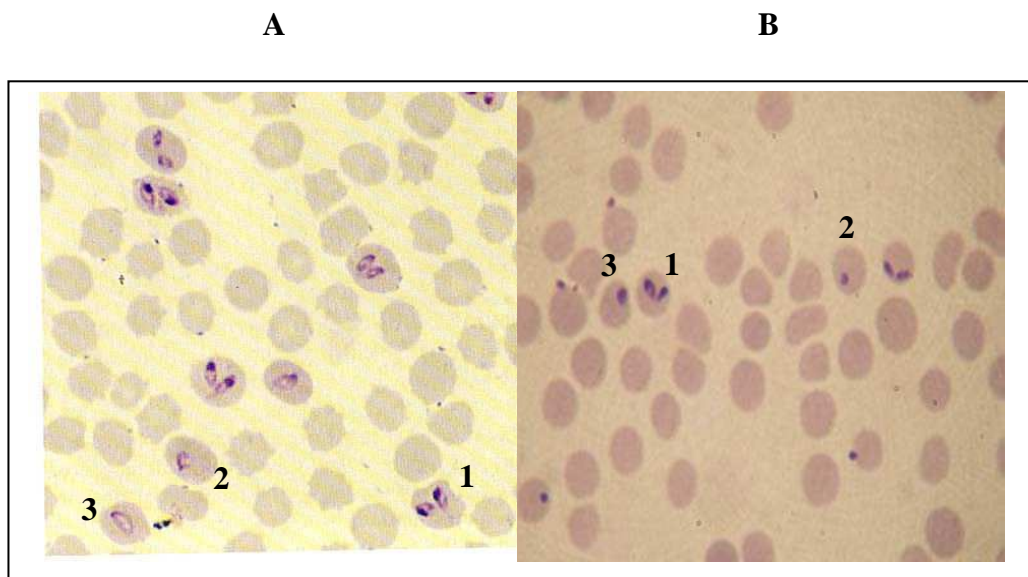


Figura 4. Frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa de **A.** *B. bigemina* y **B.** *B. bovis*. En la figura, 1: formas pares, 2: formas simples (merozoítos), 3: anillo (trofozoítos)

3. 2. 1. Estructura del merozoíto

El cuerpo del merozoíto tiene una forma ovalada de 1 a 5 μm y está cubierto por una membrana plasmática simple y una doble membrana discontinua debajo de ella. En la región anterior del merozoíto se encuentran varias organelas que componen el denominado “complejo apical” (Figura 5 y 6). Este incluye los anillos polares, cuerpos esféricos, micronemas y roptrias. El anillo polar está formado por una doble membrana debajo de la membrana plasmática del extremo anterior. Los cuerpos esféricos son organelas que fueron encontradas en *Babesia* y *Theileria*, consideradas análogas de los gránulos densos encontrados en otros apicomplejos. Las proteínas de estas organelas son secretadas en el momento de la invasión (Potgieter y col., 1979) Las roptrias son estructuras electro-densas en forma de gota ubicadas en el extremo anterior de la célula. Los micronemas son pequeñas estructuras que se presentan alrededor de las roptrias en la región anterior del merozoíto. Las roptrias y los micronemas poseen enzimas proteolíticas que juegan un rol importante en la invasión del merozoíto al eritrocito (Fitzpatrick y col., 1968). Otra El citoplasma del merozoíto contiene muchos ribosomas libres o como retículo endoplasmático y mitocondrias. El núcleo está localizado generalmente en el punto medio del merozoíto y está rodeado por dos membranas. El contenido del núcleo es homogéneo y de baja densidad (Ristic, 1988). Una de las organelas características de los integrantes del phylum Apicomplexa es apicoplasto. Esta es una característica ancestral del phylum adquirida por un proceso de

endosimbiosis. Esta organela multi-membranas es homóloga a los cloroplastos de las plantas y como tal poseen una cierta autonomía por poseer su propio genoma circular y su propia maquinaria de expresión. El rol exacto de esta organela no se conoce completamente pero se cree que está involucrada en la síntesis de lípidos e isoprenoides (Waller & McFadden, 2005).

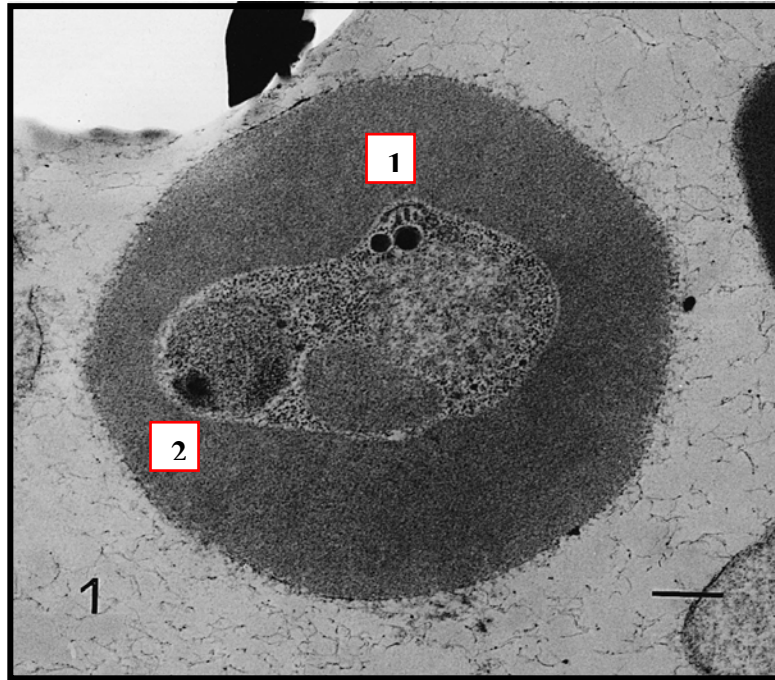


Figura 5. Eritrocito infectado con un merozoíto de *B. bigemina* luego de 24 horas de incubación. Se observa el complejo apical (1) y el núcleo (2). Barra, 0.4 μm (Ribeiro y Patarrollo, 1998). Imagen tomada de Microscopio de transmisión electrónica.

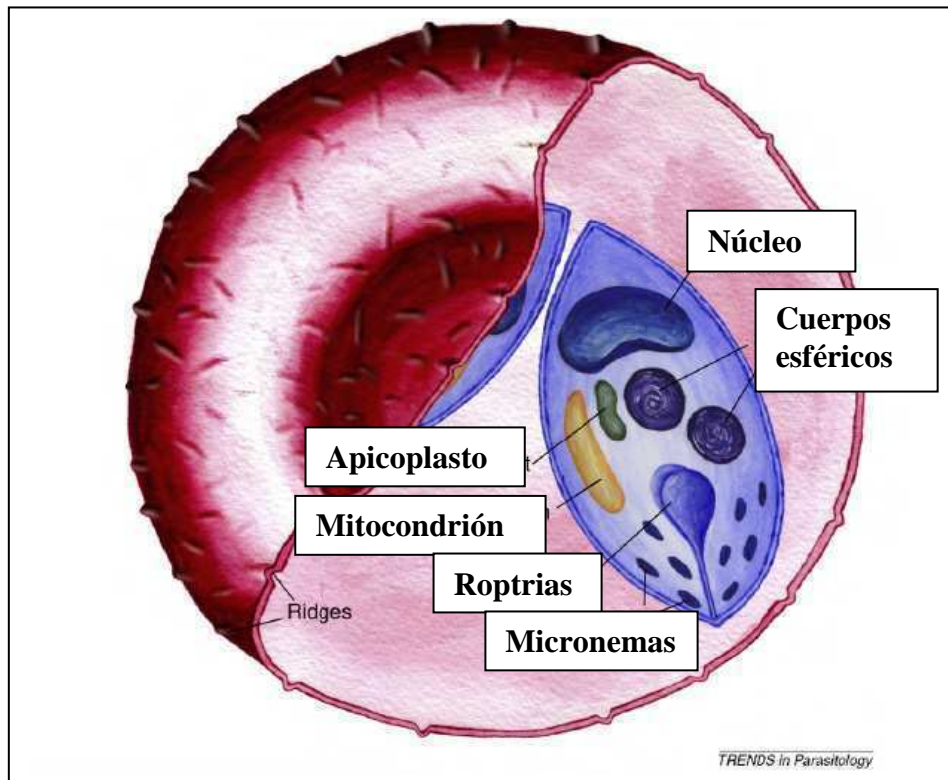


Figura 6. Esquema de un eritrocito infectado por merozoítos de *Babesia* spp. (formas pares maduras) merozoíto y sus organelas principales. (Gohil y col., 2010)

3. 3. El ciclo de vida

El desarrollo de *B. bovis* y *B. bigemina* presenta un patrón similar en los adultos de *Rhipicephalus* spp. (Potgieter & Els, 1976; Potgieter, 1977; Mehlhorn & Shein, 1984; Friedhoff, 1988). El desarrollo del ciclo de vida se esquematiza en la Figura 7 (Bock, 2004). *Babesia* spp. solo parasita los eritrocitos del hospedador vertebrado (Friedhoff, 1988). Cada esporozoíto penetra en la célula ayudado por el complejo apical, una vez adentro se transforma en trofozoíto a partir del cual se forman dos merozoítos por fisión binaria (proceso de merogonia). En *B. bigemina* se ha identificado un tipo de merozoíto de forma ovoide denominado precursor gamonte. Estos se desarrollan cuando la garrapata los absorbe durante su alimentación con la sangre del bovino. Los cambios experimentados como consecuencia del pasaje de la sangre del hospedador al intestino medio de la garrapata (vector), estimulan el desarrollo de dos poblaciones de cuerpos radiados (strahlenkörper) a partir de los gamontes (gametocitos). Estos cuerpos radiados experimentan una multiplicación dentro del eritrocito que continúa después de haber emergido. Como consecuencia se forman grandes agregados de cuerpos radiados multinucleados,

pero una vez que se completó la división celular, se forman cuerpos radiados con un solo núcleo haploide. Se asume que estas son las gametas (Mackenstedt y col. 1995). Estas emergen de los agregados y se fusionan de a pares (singamia) para formar una célula esférica (cigoto). Los cigotos infectan selectivamente a las células digestivas del intestino de la garrapata y probablemente allí, se multiplican y ocurre una nueva multiplicación en células basófilas (células que sintetizan vitelogenina) con el desarrollo de kinetos (vermiculos) que migran hacia la hemolinfa de la garrapata. En *B. bigemina* ocurre en algún momento del desarrollo un solo paso de meiosis en el intestino de la garrapata para formar el cigoto haploide. En las células intestinales ocurre fisión múltiple (esquizogonia o esporogonia) formando kinetos poliploides (vermiculos, esporokinetos). Estos se mueven a través de la hemolinfa e infectan una variedad de tipos celulares y tejidos incluyendo oocitos (de la garrapata) donde ocurren sucesivos ciclos de esquizogonia secundaria. Entonces, ocurre la transmisión transovarial y el desarrollo tiene lugar en el estadio larval de la garrapata. Este es un paso importante en la adaptación del ciclo de vida del parásito que cumple una parte del ciclo en garrapatas de un solo hospedador como es el caso de *R. microplus*. En *B. bovis* el esporozoíto se desarrolla usualmente solo cuando la larva se adhiere al bovino. En el caso de *B. bigemina*, el desarrollo se produce en la larva que se está alimentando, pero los esporozoítos se convierten en infectivos a los 9 días, por lo que esto solo ocurre en el estadio ninfal y adulto de la garrapata (Hoyte, 1961; Potgieter & Els, 1977b). Asimismo, la transmisión puede ocurrir a través de ninfas, hembras y machos adultos. En el caso de *B. bovis*, la formación de esporozoítos infectivos ocurre usualmente entre los 2 y 3 días de la adhesión de la larva al bovino (Riek, 1966).

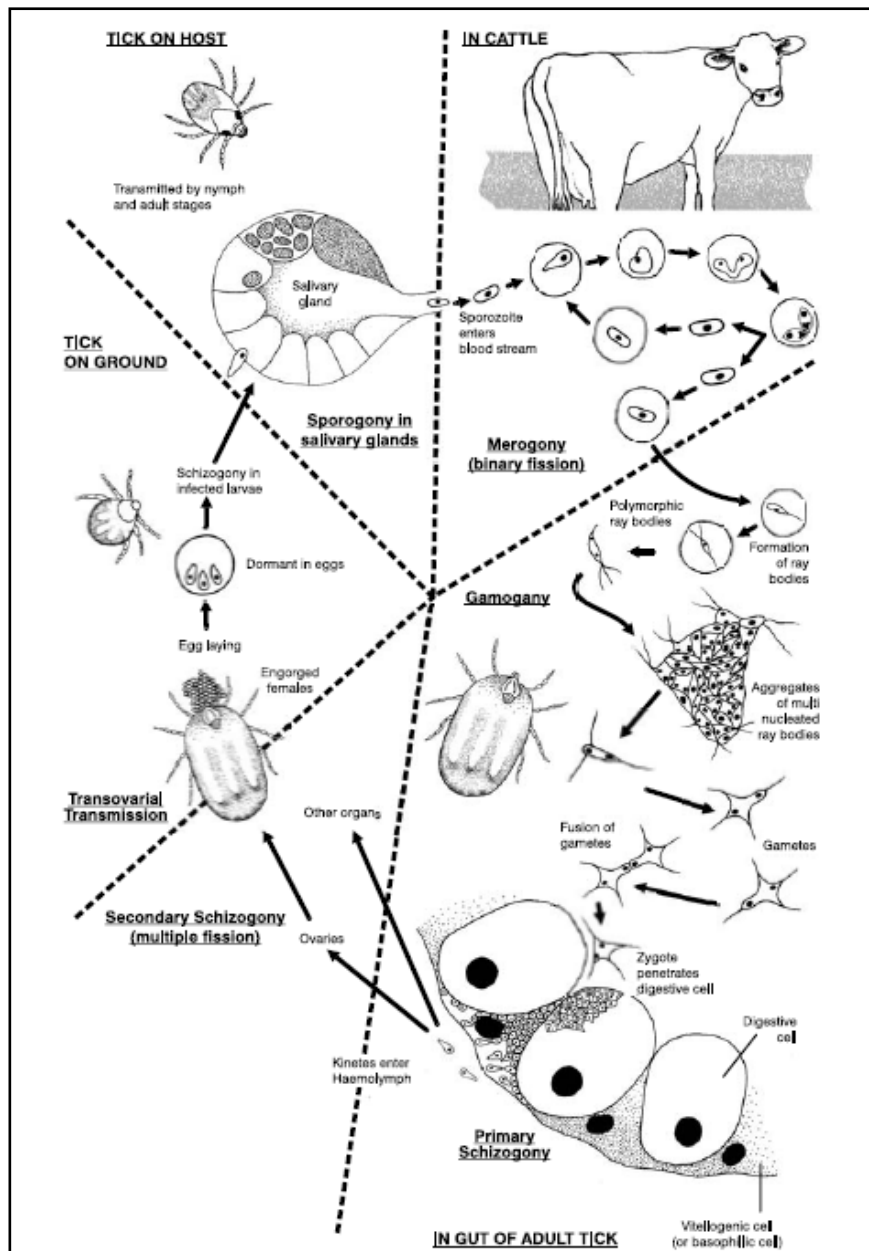


Figura 7. El desarrollo del ciclo de vida de *B. bigemina* en el bovino y en el vector *R. microplus* (Bock, 2004).

Debido a que *B. bovis* es transmitida por la larva que se está alimentando y *B. bigemina* durante los estadios de ninfa y de adulto, las garrapatas deben ser reinfectadas con *B. bovis* durante el estadio ninfal y adulto ya que éstos no mantienen la infección de las generaciones anteriores. En cambio, en *B. bigemina* la infección puede permanecer en las garrapatas por varias generaciones sin re-infección. En consecuencia se pueden obtener aislamientos puros de *B. bigemina* utilizando el antiparasitario Imidocarb para tratar a los bovinos infestados con garrapatas limpiandolas de *B. bovis*.

3. 4. Caracterización genómica

Actualmente el genoma de la cepa T2B (Texas) de *B. bovis* se encuentra anotado en la base de datos de genes de referencia (*Refseq*) del sitio de Internet del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). En este sitio se puede encontrar la colección no redundante de secuencias de ADN, ARN y proteínas con sus correspondientes anotaciones.

El genoma fue secuenciado con la técnica de *shotgun* por Brayton y colaboradores en el año 2007. El ensamblado de las secuencias del genoma ha determinado que el tamaño del genoma es de 8,2 Mpb y consiste en cuatro cromosomas nucleares y dos cromosomas pequeños extranucleares cada uno de ellos pertenecientes al apicoplasto y la mitocondria. Cada cromosoma contiene una región rica en Adenina y Timina (A+T) de un tamaño aproximado de 3 kpb que podrían corresponder al centrómero. Un estudio comparativo entre los genomas secuenciados y anotados de *T. parva* y *P. falciparum* indican que el genoma de *B. bovis* parecería ser uno de los más pequeños de los secuenciados en apicomplejos hasta el momento. Además, el porcentaje de Guanina-Citosina (GC) es de 41,8%, casi el doble en comparación con el genoma de *P. falciparum* que posee un 23,26%. En cuanto al porcentaje de GC de las regiones intergénicas, exones e intrones, resultan ser más altos en *B. bovis*. Otra característica a destacar del genoma de *B. bovis* es que las regiones intergénicas son más cortas que en *P. falciparum* (Brayton y col., 2007) (Tabla 1).

Características	<i>Pf</i>	<i>Tp</i>	<i>Bbo</i>
Tamaño del genoma (Mpb)	23,26	8,35	8,2
Número de cromosomas	14	4	4
Porcentaje G+C (%)	19,4	34,1	41,8
Número de Proteínas codificadas	5.479	4.035	3.670
Media del tamaño de los genes que codifican para proteínas (pb)	2.283	1.407	1.514
Porcentaje de genes con intrones (%)	53,9	73,6	61,5
Media del tamaño de las regiones intergénicas (pb)	1.694	405	589
Porcentaje de G+C de las regiones intergénicas (%)	13,8	26,2	37
Porcentaje de G+C de exones (%)	23,7	37,6	44
Porcentaje de G+C de intrones (%)	13,6	25,4	35,9
Porcentaje codificante (%)	52,6	68,4	70,2
Densidad de genes	4.338	2.057	2.228

Tabla 1. Comparación de las características de los genomas de *P. falciparum* (*Pf*), *T. parva* (*Tp*) y *B. bovis* (*Bbo*).

En el año 2006 De Vries y col. publicaron el análisis de los *ESTs* (*Expressed Sequence Tags*) de *B. bovis* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bovis/). Los *ESTs* fueron derivados de una biblioteca de ADN copia preparada a partir de ARN mensajero de un cultivo *in vitro* de la cepa C61411. De las 10.000 *reads* totales este proyecto solo secuenció 1.600 *reads* (16%). Se obtuvieron un total de 3.522 agrupaciones que han sido anotadas utilizando los algoritmos del BLAST. Estas agrupaciones representan un tamaño de 2,1 Mpb que corresponde a aproximadamente 2.600 genes. La comparación de los niveles de expresión de los genes de *B. bovis* con los de los genes de la fase eritrocitaria de *P. falciparum* y los taquizoítos de *T. gondii* han revelado que muchos de los genes involucrados en la vía de recuperación de purinas, la biosíntesis de isoprenoides del apicoplasto y muchos genes que codifican para proteínas mitocondriales están representados abundantemente en los *ESTs*. Son especialmente notables en este último grupo las ATPasas de tipo F - que apenas se expresan en *P. falciparum* y *T. gondii*- y dos deshidrogenasas glicerol-3-fosfato altamente expresadas que cumplen un rol en el transporte de NADH / NAD⁺, controlando posiblemente esta proporción en el citoplasma.

Por otro lado, existe escasa información acerca de los genes de *B. bigemina* y de su nivel de expresión. El genoma de este hemoparásito se encuentra ya secuenciado y actualmente está en proceso de ensamblado pero su anotación no ha sido publicada (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/). Este proyecto, financiado por la *Wellcome Trust*, tiene como objetivo secuenciar el genoma completo de un aislamiento virulento procedente de Australia. Hasta el momento, se ha estimado que el tamaño del genoma nuclear de *B. bigemina* es de 10 Mpb, distribuido en cuatro cromosomas confirmando los resultados previos obtenidos por separación de los cromosomas nucleares por electroforesis de campos pulsados (Ray y col., 1992).

3. 5. Respuesta inmune

La respuesta inmune de los bovinos a la infección con *B. bovis* o *B. bigemina* involucra tanto mecanismos de la respuesta inmune innata como de la adaptativa.

3. 5. 1. Respuesta inmune innata

Este tipo de respuesta inmune no es específica e incluye variables tales como la especificidad de la relación parásito-hospedador, factores genéticos, la edad del hospedador y la respuesta de las células del sistema inmune del hospedador.

La mayoría de los parásitos del género *Babesia* son específicos para un determinado hospedador (Mahoney, 1972). Entre los hospedadores infectados por los parásitos del género *Babesia* se encuentran el bovino de la especie *Bos Taurus* de (*B. bovis* y *B. bigemina* entre otros) equinos (*B. equi* y *B. caballi*), de caninos (*B. canis* y *B. gibsoni*) y de humanos (*B. microti* y *B. divergens*)

En cuanto a la resistencia a la infección provocada por *B. bovis* y *B. bigemina*, se ha reportado que los bovinos esplenectomizados desarrollan una parasitemia mayor que los bovinos intactos. Estas observaciones implican que el bazo juega un rol importante en la respuesta inmune contra *Babesia* spp. (Callow, 1977)

Por otro lado, hay una relación entre la edad del bovino y la inmunidad en la primera infección con *B. bovis* y *B. bigemina* (Riek, 1963). Los terneros jóvenes presentan una fuerte respuesta inmune innata comparada con la de bovinos adultos (Trueman & Blight, 1978; Goff y col., 2001). Inicialmente se creyó que esta inmunidad innata era consecuencia de la transferencia pasiva de anticuerpos del calostro de la madre inmunizada. Sin embargo, terneros con madres no inmunizadas muestran una resistencia natural a la infección por *B. bigemina* y *B. bovis* (Riek, 1963). Se ha demostrado que la respuesta de los terneros jóvenes a la infección por *B. bovis* involucra una producción temprana de interleuquina (IL)-12 e interferón (IFN)- γ y la presencia de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Goff y col., 2001). En contraste, en animales adultos la producción de IL-12 e IFN- γ aparece más tarde en la infección y la iNOS no es inducida.

La primera línea de defensa contra la infección por *Babesia* spp. la constituyen los monocitos activados, los macrófagos y los neutrófilos. Estas células emplean agentes antimicrobianos tales como los intermediarios del nitrógeno reactivos (IRN), intermediarios del oxígeno reactivo (IOR). Además, estas células secretan citoquinas que regulan la respuesta inflamatoria. Los macrófagos estimulados por *B. bovis* producen IL-1 β , IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) (Shoda y col., 2000). Se ha probado que el óxido nítrico y los IRN son producidos durante infecciones agudas. Experimentos *in vitro* sugieren que el NO reduce la viabilidad de *B. bovis* (Johnson y col., 1996).

El incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos ha sido propuesto como mecanismo de eliminación de *B. bovis* en el bovino (Mahoney, 1972; Jacobson y col., 1993). Los anticuerpos específicos jugarían un rol importante como opsoninas (Jacobson y col., 1993). Durante la infección primaria por *B. bovis* en el bovino, los monocitos muestran una supresión de su capacidad fagocítica y los neutrófilos exhiben un incremento de su habilidad fagocítica que coincide con el pico de parasitemia (Court, Jackson & Lee, 2001).

3. 5. 2. Respuesta inmune adaptativa

Durante la infección con *B. bovis* se producen anticuerpos protectivos y no protectivos contra los antígenos del parásito (Goodger, Wright & Waltisbuhl, 1985). Es probable que estos anticuerpos actúen como opsoninas incrementando la fagocitosis en lugar de tener un efecto directo sobre la viabilidad de los parásitos (Mahoney y col., 1979a). Asimismo, los anticuerpos parecerían ser importantes efectores durante una segunda infección (Mahoney, 1986). Siguiendo la infección con *B. bovis*, se forman complejos inmunes formados por antígenos del parásito, inmunoglobulinas y C3 del bovino (Goodger, Wright & Mahoney, 1981). La inmunoglobulina principal de los complejos es IgM con IgG1 e IgG2 en bajas concentraciones. Las IgG1 e IgG2 son capaces de fijar el complemento y la IgG2 además tiene una mayor capacidad como opsonina (McGuire, Musoke & Kurtti, 1979). En una infección con *B. bovis*, han sido detectados anticuerpos fijadores del complemento del tipo IgG1 e IgM, pero no IgG2. (Goff y col, 1982). La resolución de la infección por *B. bovis* en el bovino podría estar relacionada con la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Goff, Wagner & Craig, 1984).

Actualmente no se sabe el rol definitivo de las células T en la respuesta inmune contra *B. bovis* y *B. bigemina*. Sin embargo, se han realizado experimentos *in vitro* con líneas celulares de linfocitos T que demostraron su rol. Los mononucleares de sangre periférica y los clones T *helper* proliferan en respuesta a antígenos de *B. bovis* (Brown y col., 1991; Brown & Logan; 1992). La respuesta de citoquinas de estas células T *helper* CD4+ es Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) o Th0 (IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF- α). No han sido detectados clones Th2 (Brown y col., 1993). Asimismo, se han aislado clones de células T *helper* de un bovino inmunizado con la proteína asociada a las roptrias (RAP-1). Estudios *in vitro* han demostrado que estos clones producen un perfil de citoquinas Th1 con abundante IFN- γ (Rodríguez y col., 1996). Los clones Th1 promueven la producción de IgG2 por los linfocitos B en presencia del antígeno. Los sobrenadantes de cultivo de líneas de células T contienen IFN- γ y TNF- α que inducen la producción del NO por parte de los macrófagos (Stich y col., 1998).

Finalmente, el modelo de inmunidad adaptativa de *B. bovis* y *B. bigemina* se focaliza en el rol de los linfocitos T *helper* CD4+ en la respuesta inmune (Brown y col., 2001). Estos linfocitos T *helper* producen citoquinas de las cuales el IFN- γ parecería ser el de mayor importancia ya que activa las células fagocíticas y aumenta la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B.

3. 6. Diagnóstico de la babesiosis

3. 6. 1. Diagnóstico directo

3. 6. 1. 1. Detección del parásito

El diagnóstico de la babesiosis bovina involucra el reconocimiento e identificación de los estadios intraeritrocitarios del parásito y se basa en parte, en el tamaño, la morfología, y las características de tinción. El tamaño y la morfología son los principales parámetros de diagnóstico de la especie causal. Así, el método de diagnóstico relativamente más simple y que más frecuentemente se ha utilizado, es la observación directa al microscopio óptico de los parásitos intraeritrocitarios presentes en extendidos de sangre, colectada a partir de vasos periféricos y teñidas con colorante de Giemsa. Pero este método solo puede detectar el parásito en infecciones agudas y debido a su baja sensibilidad no es posible detectar parásitos en infecciones crónicas o subclínicas (Almería y col., 2001). Como consecuencia, varios estudios se abocaron a la búsqueda de genes o secuencias únicas de *Babesia* spp. para desarrollar métodos de detección molecular del parásito altamente sensibles y específicos (Bösse y col, 1995)

3. 6.1. 2. Detección molecular de *B. bigemina*

En los últimos años han sido desarrolladas distintas técnicas de detección molecular de *B. bigemina*. Figueroa y col. (1992) desarrollaron un método de detección combinando la técnica de PCR y de *Southern Blot*. A partir de una biblioteca genómica aislaron un fragmento de 300 pb que fue secuenciado y a partir del cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para su amplificación seguido del diseño de una sonda para su detección por hibridación con el producto de PCR. El método de detección molecular del parásito desarrollado por Figueroa y col., presenta una sensibilidad de la reacción de PCR del 5×10^{-4} % de eritrocitos parasitados mientras que

cuando se realiza además la hibridación con la sonda específica, el método aumenta la sensibilidad detectando parasitemias del orden de $5 \times 10^{-7} \%$. Los oligonucleótidos reportados en el trabajo anterior han sido utilizados en el desarrollo de otros métodos de detección molecular del parásito tales como la PCR y PCR-anidada reportada por Oliveira-Sequeira y col. (2005) que presenta una sensibilidad del $3 \times 10^{-5} \%$ de parasitemia de la PCR y del $3 \times 10^{-7} \%$ de la PCR-anidada.

Una de las técnicas que permite la detección simultánea de varios patógenos es la de Hibridación en Línea Reversa (RLBH). Este sistema consiste en un paso de amplificación de la región híper variable V4 del gen 18S de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (ARNr 18S) por PCR y un paso de hibridación de los productos de PCR con las sondas unidas covalentemente a una membrana de nylon correspondiente. Los cebadores específicos utilizados en la reacción de PCR se encuentran biotinilados en el extremo 5' lo cual permite la detección de la señal correspondiente a la hibridación positiva a través de la unión de estreptavidina conjugada a Peroxidasa y la reacción de detección acoplada a un sustrato quimioluminiscente lo cual aumenta la sensibilidad de este método. Se ha reportado que utilizando esta técnica es posible diferenciar en una misma muestra especies de *Theileria* y *Babesia* que infectan al ganado bovino en áreas tropicales y subtropicales (Gubbels y col., 1992)

Debido a su elevada sensibilidad, especificidad y velocidad con la cual se obtienen los resultados, la técnica de PCR ofrece importantes ventajas sobre los métodos convencionales de diagnóstico. Sin embargo, las técnicas descriptas hasta el momento resultan laboriosas y costosas lo cual dificulta su aplicación de manera rutinaria, aún en los grandes laboratorios de diagnóstico. Además, a excepción de la técnica del RLBH los métodos no están basados en genes previamente caracterizados. El desarrollo actual de herramientas de búsquedas de genes para su análisis nos permite seleccionar genes especie-específicos para detectar *B. bigemina* en muestras de distinto origen, de manera más simple y rápida conservando la sensibilidad de los métodos reportados anteriormente.

3. 6. 2. Diagnóstico indirecto

Se han desarrollado un gran número de métodos para la detección de anticuerpos contra *Babesia* spp. (Weiland y Reiter, 1988; Wright, 1990). Los métodos ampliamente utilizados en los distintos laboratorios de diagnóstico son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) indirecto. En Argentina, ambos métodos se basan en la detección de anticuerpos específicos de sueros bovinos pertenecientes a rodeos que se encuentran dentro de la

zona endémica para la babesiosis. Para ello se emplea como antígeno un lisado de parásitos intraeritrocitarios previamente purificados a través de un gradiente de percoll isosmótico. Sin embargo, este método es muy laborioso y en el caso de *B. bigemina* resulta difícil obtener preparaciones altamente enriquecidas debido a que los parásitos están fuertemente unidos a la cara interna de la membrana del eritrocito lo cual no permite obtener un buen número de parásitos libres. Como consecuencia de ello, las preparaciones suelen contener contaminantes pertenecientes al eritrocito dando lugar a falsos positivos por la presencia de anticuerpos anti-eritrocitos en los sueros bovinos (Bösse y col., 1995).

En el método de ELISA la calidad del antígeno utilizado es crucial para el desarrollo de una prueba altamente específica y sensible. Esto puede ser logrado utilizando antígenos recombinantes altamente purificados. Los antígenos recombinantes no contienen proteínas del hospedador y las variaciones de lote a lote son mínimas. Algunos antígenos de *B. bovis* y *B. bigemina* han sido clonados, expresados y evaluados a través del método de ELISA (McElwain y col., 1987, 1988; Goff y col., 1988, 1989; Hines y col., 1989; Bösse y col., 1990; Palmer y col., 1991). El requisito más importante para desarrollar pruebas de ELISA es utilizar un antígeno recombinante altamente específico cuya identificación por sueros bovinos de distintas regiones geográficas sea inequívoca para lo cual es fundamental que este antígeno despierte en el bovino infectado por *B. bovis* y *B. bigemina* una respuesta inmune fuerte y duradera.

3. 7. Búsqueda de antígenos

La necesidad de mejorar los métodos de diagnóstico de la babesiosis bovina y de desarrollar nuevas vacunas contra la babesiosis ha conducido a la búsqueda, identificación y caracterización de antígenos. En tal sentido, todas las búsquedas se han dirigido a las proteínas de membrana de merozoítos y esporozoítos (Hodgson y col., 1992), a las del complejo apical en particular a las proteínas de las roptrias (Brown y col, 1998; Brown y Palmer, 1999) y a las proteínas de la superficie de eritrocitos infectados (Shompole y col., 1993).

Los métodos de búsqueda de antígenos de *B. bigemina* y *B. bovis* que han sido explorados comenzaron por la identificación de antígenos solubles (exoantígenos) derivados del cultivo *in vitro* de estos parásitos. Montenegro-James y colaboradores en 1.983 describieron la presencia de al menos tres antígenos solubles de bajo peso molecular (37 a 50 kDa) a partir de la purificación de sobrenadante de cultivo de *B. bovis*.

En *B. bigemina* la identificación de antígenos por inmunoprecipitación de proteínas marcadas en Metionina con ³²S utilizando sueros bovinos producto de una infección experimental

ha permitido identificar exoantígenos especie-específicos de 240, 112, 50 y 29 kDa (Passos y col., 1998). Asimismo, se han detectado antígenos de merozoítos de *B. bigemina* y antígenos localizados en la superficie del eritrocito infectado por *B. bigemina* utilizando esta misma técnica (McElwain y col., 1988; Shompole y col., 1995). Adicionalmente, la búsqueda de antígenos ha involucrado la purificación de las organelas que alojan proteínas secretorias, tal es el caso de las roptrias. El aislamiento de las roptrias de los merozoítos de *B. bigemina* ha permitido identificar una de las proteínas más estudiadas de este hemoparásito: p58, la proteína asociada a las roptrias (RAP-1) (Machado y col., 1993).

Otro abordaje para la identificación de antígenos ha sido la construcción de una biblioteca de expresión con ADN copia de un determinado estadio del parásito. Figueroa y colaboradores (1992) detectaron con anticuerpos monoclonales antígenos de la superficie del merozoíto a partir de una biblioteca de expresión de este estadio.

Recientemente, se ha comenzado a combinar la detección de antígenos en bibliotecas de ADN copia con herramientas de bioinformática de búsqueda de secuencias homólogas para su identificación y posterior caracterización teniendo en cuenta la gran información disponible en las bases de datos de genomas enteros anotados de organismos pertenecientes al mismo phylum (Figueroa y col., 2006, 2004; Fisher y col., 2001).

El advenimiento de la era post-genómica generó un gran número de herramientas para la detección de nuevos antígenos. En tal sentido, el desarrollo de técnicas de proteómica nos permitirá obtener mayor información sobre las proteínas antigénicas de un determinado estadio para su posterior identificación y caracterización. Por otro lado, la información disponible de los genomas completos y el desarrollo de un gran número de herramientas bioinformáticas para el análisis de la información genómica resulta un método más rápido y amplio para la búsqueda de nuevos antígenos.

3. 7. 1. Antígenos más relevantes de *B. bigemina*

Una de las proteínas asociada a las roptrias ampliamente estudiada es RAP-1 que está constituida por una familia de seis genes polimórficos (Brown y Palmer, 1999). El locus del gen *rap-1* posee una organización compleja conteniendo al menos tres clases diferentes de genes relacionados. La organización básica del locus *rap-1* en la cepa JG-29 consiste en cinco repeticiones en tándem de los arreglos de los genes *rap-1a* y *rap-1b*, con una sola copia del gen *rap-1c* en el extremo 3' del locus (Suarez y col., 2003) (Figura 8). El gen *rap1a* posee cuatro

variantes con una región central conservada en todas: *rap-1a* $\alpha 1$ (dos copias), *rap-1a* $\beta 1$, *rap-1a* $\beta 2$ y *rap-1a* $\beta 3$ (Mishra y col., 1998; Mishra y col., 1999).

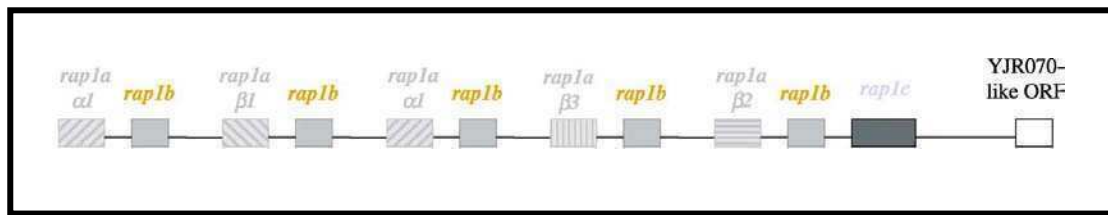


Figura 8. Estructura del locus *rap-1* en la cepa JG-29 de *B. bigemina* basada en el análisis de restricción, PCR y secuenciación (Suarez y col., 2003)

Se ha demostrado en numerosos trabajos que la proteína RAP-1 de 58 kDa (se la denomina también p58) es altamente inmunogénica para las células T y B y además, posee epitopes conservados entre diferentes cepas de *B. bigemina* (McElwain y col., 1987; McElwain y col., 1991; Rodriguez y col., 1996). Los estudios realizados con su ortóloga en *B. bovis* demostraron que anticuerpos contra RAP-1 inhiben la entrada del parásito al eritrocito (Mosqueda y col., 2002). Estas observaciones sugieren que las proteínas RAP-1 poseen un importante rol funcional en la invasión del parásito siendo blanco de la respuesta inmune protectora.

Otras proteínas menos caracterizadas son p200 y Hsp20. La proteína de 200 kDa se localiza en el citoplasma y en los cuerpos esféricos del merozoíto. Asimismo, esta proteína posee epitopes B. Por lo tanto, un fragmento correspondiente a este gen se ha expresado de manera recombinante para su utilización en el desarrollo de pruebas de diagnóstico serológico de animales infectados por *B. bigemina* utilizando la técnica de ELISA (Tebele y col., 2000; Altangerel y col., 2009). Además, se determinó que parte de la secuencia del gen que codifica para esta proteína se encuentra en el aislamiento S2P de Argentina y en otros de Kenia, Australia, Sudáfrica, Brasil, lo que sugiere su conservación entre aislamientos de distintas regiones geográficas (Tebele y col., 2000).

Otro antígeno de *B. bigemina* reportado en la literatura es la proteína de shock térmico de 20 kDa: Hsp20. Esta es homóloga a la proteína de superficie de 20 kDa de *B. bovis* y se encuentra conservada en distintas especies de apicomplejos. Se ha confirmado la presencia de epitopes B y T conservados en distintos aislamientos de estos parásitos (Brown y col., 2005).

Como se puede observar en la literatura, pocas proteínas de *B. bigemina* han sido caracterizadas. Teniendo en cuenta los datos resultantes de la anotación del genoma de *B. bovis* y

las secuencias ensambladas del genoma de *B. bigemina*, la búsqueda, anotación y caracterización de nuevas proteínas resulta inminente.

3. 8. Mecanismos de invasión en *Babesia*

La invasión a la célula hospedadora de los parásitos del phylum Apicomplexa involucra sucesivos pasos de exocitosis de tres organelas secretorias diferentes: micronemas, roptrias y gránulos densos (cuerpos esféricos en *Babesia* spp) (Figura 6) Los hallazgos obtenidos en estudios recientes han extendido la homología estructural de este grupo de organelas entre la mayoría de los miembros de este phylum, sugiriendo que en estos organismos estas organelas cumplen la misma función (Dubremetz y col., 1998).

La entrada a la célula se inicia por el contacto entre el complejo apical del parásito y la superficie de la célula hospedadora y continúa con la internalización progresiva del sitio de contacto del complejo apical. Esta entrada se produce en la dirección antero-posterior y eventualmente detrás del parásito se va formando y cerrando la vacuola parasitófora presente en algunos organismos del phylum Apicomplexa tales como *P. falciparum*. Una vez adentro de la célula, el parásito queda inmóvil. La observación por microscopio electrónico demuestra que la internalización ocurre en una vacuola que es una continuación de la membrana plasmática de la célula hospedadora, aunque se separa de ella en el sitio de entrada (Aikawa y col., 1981)

El rol de las organelas del complejo apical resulta fundamental en este proceso. La exocitosis de las roptrias ocurre durante la invasión. Se han encontrados proteínas de las roptrias en la membrana de la vacuola parasitófora temprana durante el proceso (Saffer y col., 1992). Los gránulos densos también son exocitados en la vacuola minutos después de que esta se cierra y su contenido se asocia con el contenido vacuolar y la membrana. (Cesbron-Delaw, 1994). Debido a que la invasión está impulsada exclusivamente por el parásito, depende completamente de la motilidad por deslizamiento (*gliding motility*) del parásito. Esta movilidad es dependiente de las proteínas actina y miosina, pero los mecanismos de deslizamiento dependen de otras proteínas. Numerosos datos sugieren que las proteínas contenidas en los micronemas cumplen un rol fundamental en este proceso (Figura 9).

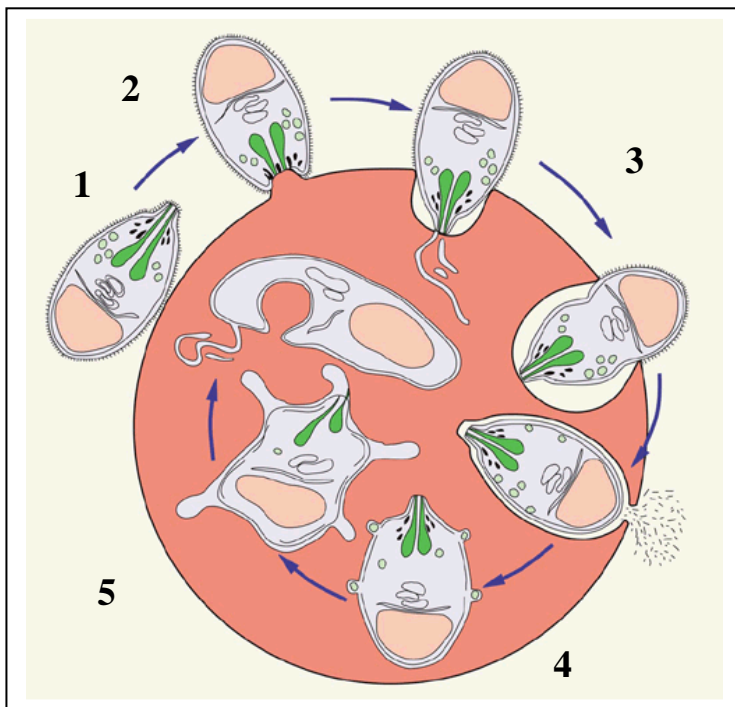
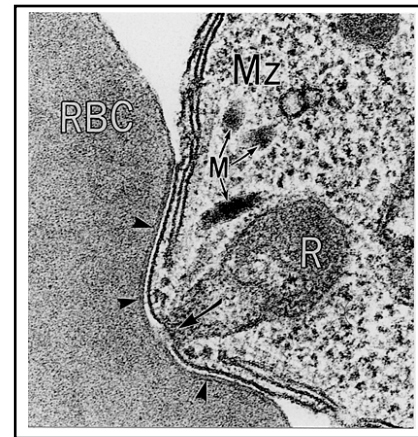
A**B**

Figura 9. A. Esquema simplificado de los sucesivos pasos de la invasión del merozoíto de *Plasmodium* al eritrocito. **1.** El proceso comienza con la adhesión del parásito a la superficie del eritrocito por deslizamiento, una señal de la superficie de la célula es transducida al complejo apical del parásito; **2.** La señal induce la reorientación del parásito, la exocitosis de los micronemas, la unión de la zona apical del parásito a la membrana de la célula y la formación de la unión entre las dos membranas; **3.** Las roptrias son excitadas mientras el parásito se desliza hacia el interior de la célula y la vacuola parasitófora comienza a expandirse, se descarga el contenido de las roptrias y los micronemas; **4.** La vacuola continúa su expansión hasta que la unión alcanza el extremo posterior y el parásito queda inmóvil dentro de la vacuola que se sella al igual que la membrana del eritrocito. Se produce la exocitosis de los gránulos densos (en *Babesia* se llaman cuerpos esféricos) al espacio vacuolar. **5.** Maduración morfológica a la forma de anillo (trofozoíto). **B.** Micrografía de transmisión electrónica de un merozoíto (MZ) de *P. falciparum* penetrando por el extremo apical en un eritrocito (RBC). M: micronemas y R: roptrias (foto de origen desconocido obtenida del sitio del National Institute of Allergy and Infectious Diseases <http://www.niaid.nih.gov/Pages/default.aspx>).

El modo de invasión de los eritrocitos utilizado por *Babesia* spp. es similar al de muchos de los parásitos del phylum incluyendo a *Plasmodium* spp. y *Toxoplasma gondii* cuyos mecanismos de invasión fueron descritos en el punto anterior. . En *Babesia* existe una diferencia notable. Una vez adentro del eritrocito, el parásito se escapa de la vacuola parasitófora que se ha

formado por invaginación de la membrana del eritrocito durante la invasión (Rudinska y col., 1976). Actualmente no se conocen los mecanismos que producen este evento, pero las imágenes obtenidas por microscopía electrónica han demostrado que durante todo su ciclo intracelular, *B. bovis* se encuentra libre en el citoplasma del eritrocito (Dowling y col., 1996).

Las interacciones moleculares entre los merozoítos de *Babesia* spp. y los eritrocitos del hospedador y su rol biológico aun no se han dilucidado. Por lo tanto, se requiere conocer profundamente los mecanismos básicos de la fase asexual del ciclo de vida, en particular el proceso que involucra la invasión del merozoíto al eritrocito, para el desarrollo de herramientas eficientes que ayuden a prevenir la babesiosis y como consecuencia las grandes pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad.

3. 8. 1. Proteínas involucradas en la invasión: de *Plasmodium* a *Babesia*.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de invasión de los parásitos del phylum Apicomplexa está mediado por la secreción de numerosas proteínas de la superficie del parásito y de las organelas secretorias del complejo apical y debido a que este proceso se ha conservado a lo largo de la evolución es probable que las proteínas que están involucradas en este proceso también se conserven. En tal sentido, Gaffar y colaboradores en el año 2004 identificaron en *B. bovis* dos proteínas que se localizan en los micronemas de merozoítos que fueron identificadas previamente en *Plasmodium*. Una de ellas es la ortóloga al Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1) y la otra es la ortóloga a la Proteína Anónima Relacionada a Trombospondina (TRAP). En *Plasmodium* AMA-1 se localiza en micronemas y es secretada hacia la superficie de los merozoítos (Howell y col., 2003). En *B. bovis* esta proteína ha sido localizada en el extremo apical del merozoíto utilizando anticuerpos específicos en una inmunofluorescencia indirecta y la pre-incubación de los merozoítos libres con sueros específicos contra AMA-1 reduce la invasión al eritrocito. (Gaffar y col., 2004a). Por otro lado, la proteína TRAP de los esporozoítos de *Plasmodium* posee varios dominios conservados en proteínas de micronemas de otros apicomplejos y funcionan como ligandos en la interacción con las células del hospedador (Sultan y col., 1997). Al igual que en *Plasmodium*, la proteína TRAP de *B. bovis* fue identificada como una proteína transmembrana de tipo 1 que contiene los dominios von Willebrand A (vWFA) y trombospondina tipo 1 (TSP-1) (Gaffar y col., 2004b). Los análisis inmunológicos con anticuerpos específicos contra esta proteína en *B. bovis* inhiben la invasión del merozoíto al eritrocito.

Además de TRAP y AMA-1, en *B. bovis* se han reportado otras proteínas exclusivas de este parásito involucradas en los mecanismos de invasión al eritrocito. Entre ellas se encuentra el Antígeno de la Superficie del Merozoíto (MSA-1) cuya función está relacionada con la unión inicial del merozoíto al eritrocito del hospedador (Goff y col., 1988; Mosqueda y col., 2002). Otra proteína relacionada es la MSA-2 que también se encuentra en la membrana del merozoíto facilitando la invasión del eritrocito (Goff y col., 1988; Jasmer y col., 1992). La Proteína Asociada a las Roptrias 1 (RAP-1) que ha sido localizada en las roptrias del complejo apical de merozoítos está involucrada en la unión al eritrocito para su posterior invasión (Dalrymple y col., 1993; Suarez y col., 1991; Yokoyama y col., 2002; Mosqueda y col., 2002). Finalmente, las proteínas de los cuerpos esféricos SBP-1, BP-2 y SBP-3 participan en la internalización del parásito dentro del eritrocito jugando un rol en la penetración del parásito y luego en el crecimiento y la viabilidad del parásito en el citoplasma del eritrocito (Hines y col., 1995; Jasmer y col. 1992; Dowling y col., 1996; Ruef y col., 2000).

El eritrocito también cumple con un rol fundamental en la invasión, se ha reportado en estudios previos que residuos de ácido siálico en la membrana funcionarían como receptores del parásito en el proceso de invasión (Kania y col., 1995; Zintl y col., 2002; Gaffar y col., 2003). Por otra parte, el heparán sulfato (una forma menos sulfatada que la heparina) localizado en la superficie del eritrocito (Trybala y col., 1993; Xiao y col., 1996) es reconocido por las proteínas de la superficie de los merozoítos.

En la Figura 10 se esquematiza el proceso de invasión de *B. bovis* con las proteínas cumplen un rol de importancia.

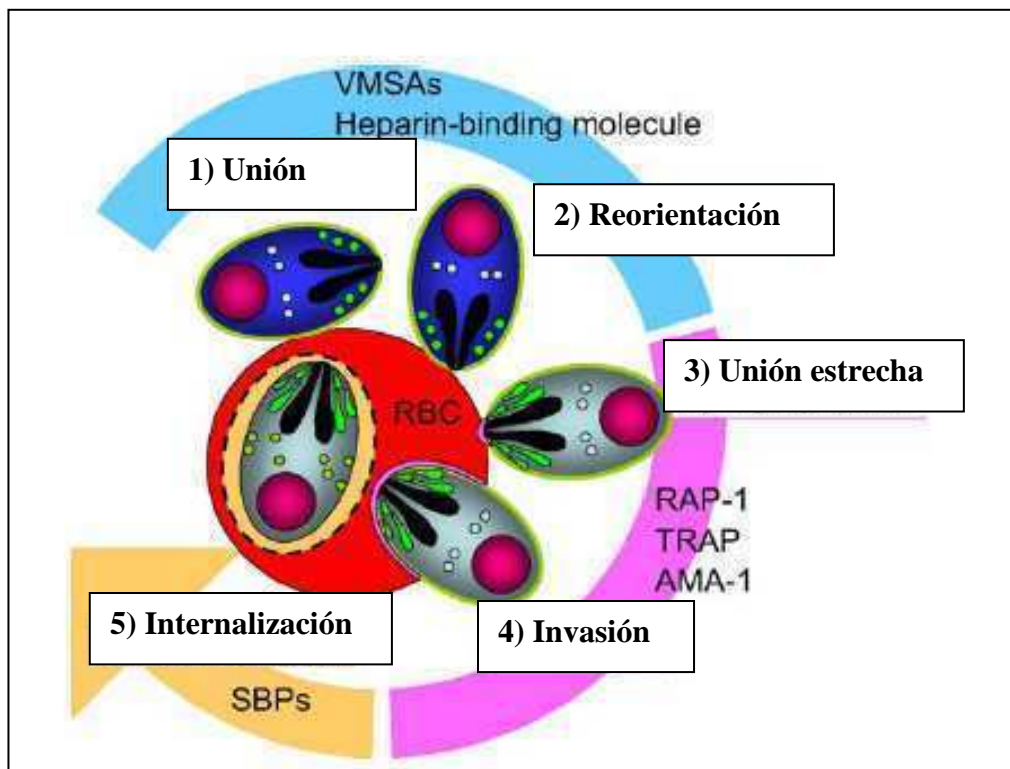


Figura 10. Esquema del proceso de invasión de *B. bovis* al eritrocito con las proteínas involucradas tanto del parásito como del eritrocito bovino (Yokoyama y col., 2006)

En *B. bigemina* no se han encontrado homólogos a las proteínas MSA así como tampoco para las SBPs. Es posible que otras proteínas aún no identificadas cumplan un rol similar en la invasión

3. 8. 2. Proteínas del tipo Perforinas

Las perforinas, son un componente ancestral del arsenal de proteínas involucradas en la íntima relación patógeno-hospedador.

Las proteínas formadoras de poro fueron inicialmente caracterizadas en mamíferos como componentes fundamentales en mecanismos involucrados en la respuesta inmune. Las proteínas del complemento C6 a C9 son homólogas y poseen un dominio central de ataque a membrana: *Membrane Attack Complex/Perforin* (MACPF) (Morgan, 1999) al igual que las perforinas de los gránulos secretadas por los linfocitos T citotóxicos y las células *natural killer* NK (Liu y col., 1995; Polekhina y col., 2005). Hadders y colaboradores (2007) han expresado y cristalizado el dominio MACPF de la subunidad alfa de la proteína del complemento humano C8 (C8 α -MACPF). La estructura tridimensional se compone de una hoja plegada de cuatro cadenas beta, rodeada por alfa hélices que forman dos segmentos estructurales (d1 y d3) (Figura 11).

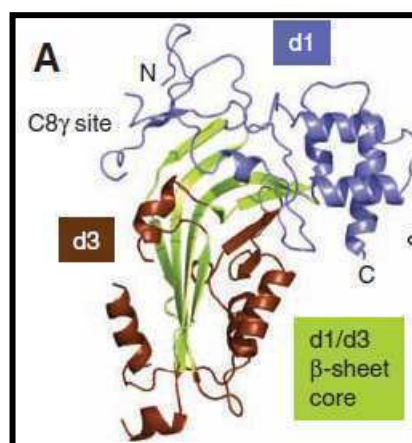


Figura 11. Estructura del C8 α -MACPF humano (Hadders y col., 2007).

El dominio MACPF se encuentra en proteínas de diversos tipos celulares y organismos. Una proteína con dominio MACPF fue identificada y caracterizada en la bacteria Gram-negativa intracelular obligada y patógena de humanos, *Chlamydia trachomatis* (Ponting, 1999; Taylor y

col., 2010). Además, este dominio se ha identificado en una proteína de la gamma-proteobacteria *Photorhabdus luminiscens* (Plu-MACPF). Esta bacteria es una enterobacteria Gram-negativa simbiote de nematodos del suelo y es altamente patógena en insectos infectados por nematodos. Posee un complejo ciclo de vida, incluyendo un estadio simbiote caracterizado por la colonización del intestino superior del nematode, y un estadio patogénico, caracterizado por la liberación de esta bacteria del nematode al hemocele de la larva del insecto que está infectando. Esto provoca la muerte del insecto a causa de las toxinas bacterianas. Rosado y col. (2007) lograron cristalizar el dominio MACPF de la proteína de esta bacteria. Al igual que en la estructura cristalizada de C8 α -MACPF, este es una molécula plana con forma de caja, que posee una hoja de cuatro láminas beta antiparalelas (Figura 12).

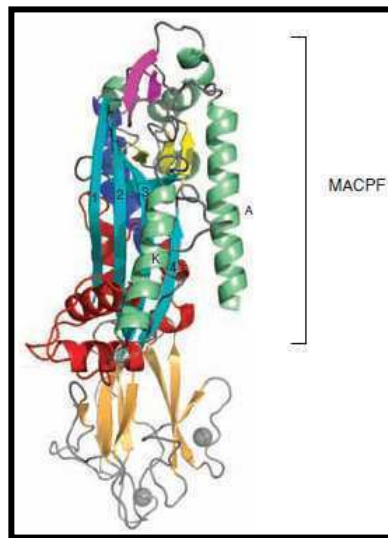


Figura 12. Estructura del Plu-MACPF (Rosado y col., 2007).

Los reportes sobre el dominio MACPF en diversos organismos demuestran que su estructura tridimensional y por lo tanto su función está conservada evolutivamente. Todas las secuencias aminoacídicas correspondientes a este dominio poseen un motivo característico (Y/W)-X₆-(F/Y)GTH(F/Y)-X₆-GG, donde X podría ser cualquier aminoácido (Ponting, 1999) (Figura 13).

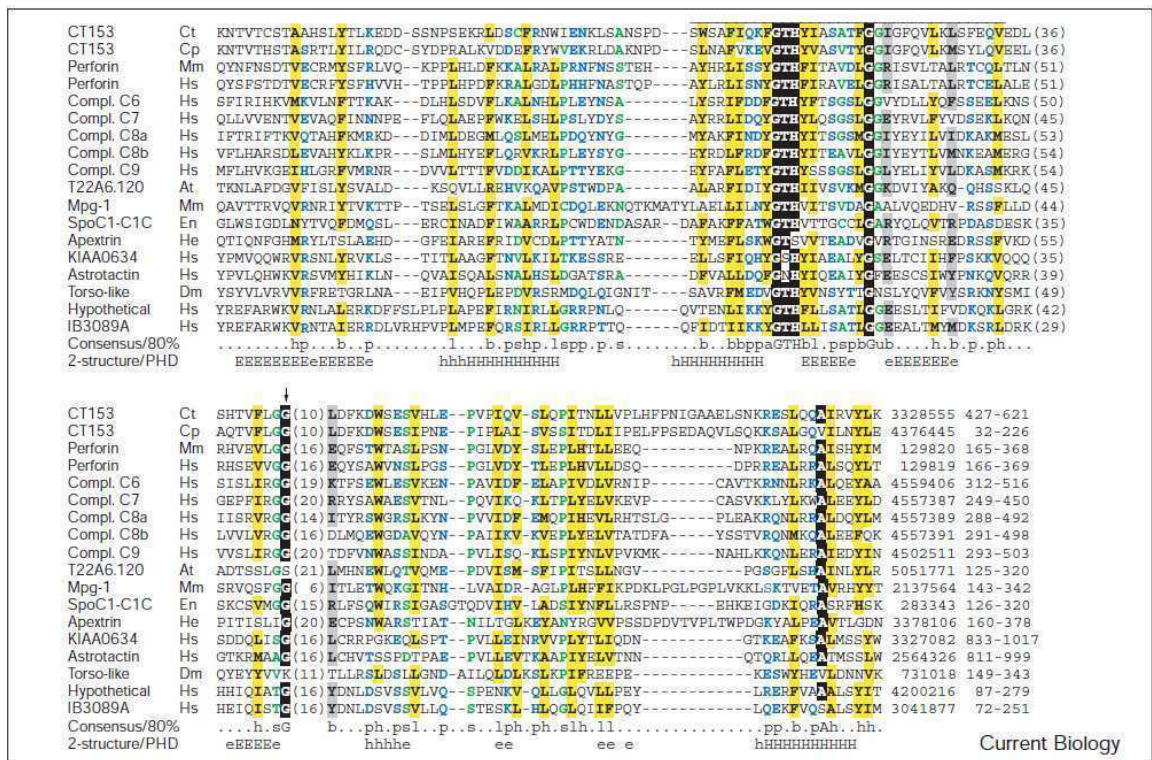


Figura 13. Alineamiento múltiple del dominio MACPF de proteínas de diversos tipos celulares y organismos. En negro se resaltan los aminoácidos del motivo característico del dominio. Debajo del alineamiento se encuentra la predicción de la estructura secundaria del dominio (e/E: hebra extendida o lámina beta, h/H: alfa hélices) (Ponting, 1999).

La formación del poro a través de proteínas con dominio MACPF es un proceso que involucra múltiples pasos que se inician con la secreción de monómeros que se unen a un receptor de la membrana blanco (Rosado y col., 2008). Subsiguientemente, se produce la oligomerización para formar un pre-poro circular por interacción lateral de los monómeros seguido por el cambio conformacional del dominio MACPF, resultando en la inserción de un gran poro en forma de barril- β (Figura 14). La funciones de estos poros incluyen: la destrucción de las células blanco por disrupción de la membrana externa (bacterias y proteínas del complemento) (Rosado y col., 2002); la liberación de otras proteínas efectoras a través de este poro (liberación de granzimas por perforinas) (Pipkin y col., 2007); o la facilitación del recorrido del patógeno a través de la membrana (Schnupf y Portnoy; 2007).

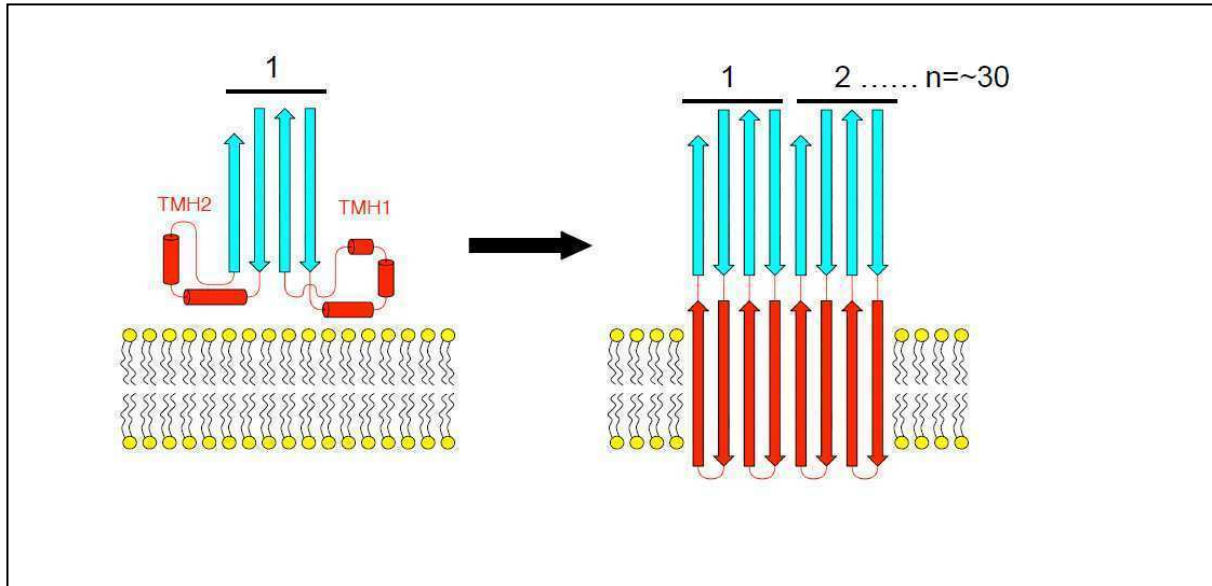


Figura 14. Mecanismo de inserción del dominio MACPF en la membrana. En rojo se observan las dos hélices alfa (TMH1 y TMH2) que se despliegan en cuatro lámina beta antipáticas que atraviesan la membrana. En celeste el grupo de láminas beta (Rosado y col., 2007)

3. 8. 3. La familia del tipo Perforina en Apicomplexa

El primer reporte de esta familia en apicomplejos fue realizado por Kaiser y col. en el año 2004. Estos autores han identificado en el genoma del parásito de roedores *Plasmodium yoelii*, una familia de cinco genes que codifican para cinco proteínas de membrana del tipo perforina con dominio MACPF (PLP) (Figura 15). Además, cada una de estas cinco proteínas se encuentra conservada en distintas especies de *Plasmodium*, manteniendo una mayor identidad entre los genes ortólogos más que entre los parálogos de cada especie (Figura 16).

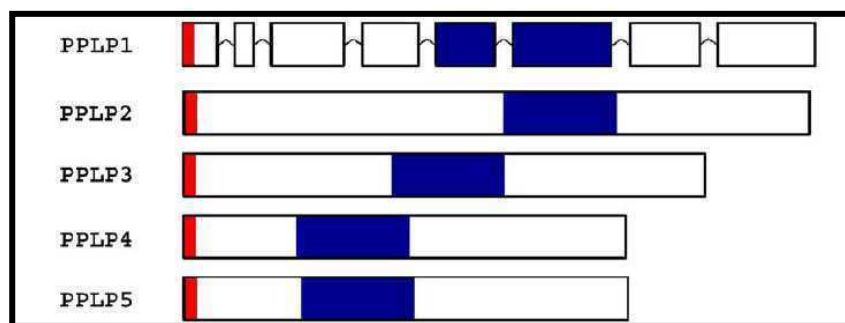


Figura 15. Estructura de los cinco genes de la familia PLP de *Plasmodium yoelii*. En rojo el péptido señal y en azul el dominio MACPF.

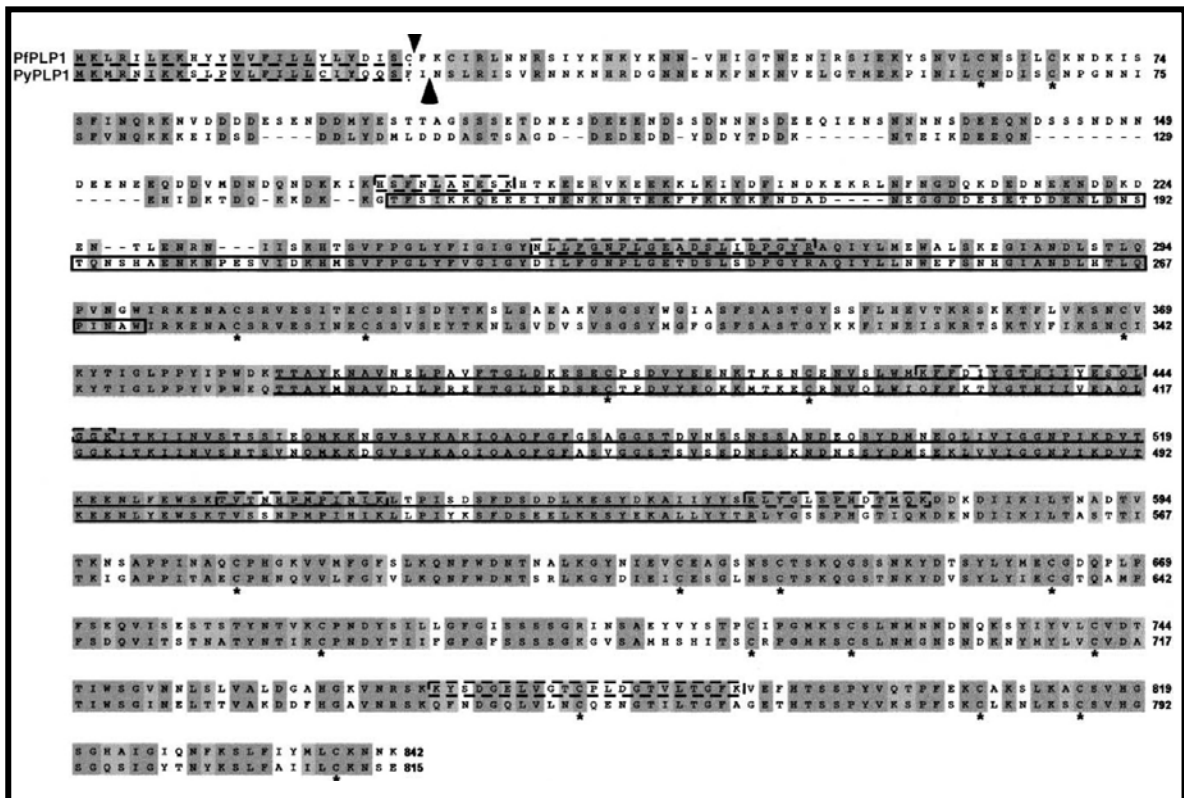


Figura 16. Alineamiento entre las proteínas PLP1 de *P. falciparum* y de *P. yoelii*. En gris oscuro están marcados los residuos altamente conservados (Kaiser y col., 2004)

Un estudio reciente, reportó la existencia de dos proteínas del tipo Perforina de *Toxoplasma gondii* (TgPLP) (Kafsack y col., 2009). El dominio MACPF de la proteína TgPLP1 posee los elementos de la secuencia núcleo importantes para la formación del poro y principalmente la conservación del motivo característico del dominio MACPF. Además, existe homología estructural con los dominios MACPF cristalizados de C8 α y de la proteína de *P. luminiscens* (Figura 17).

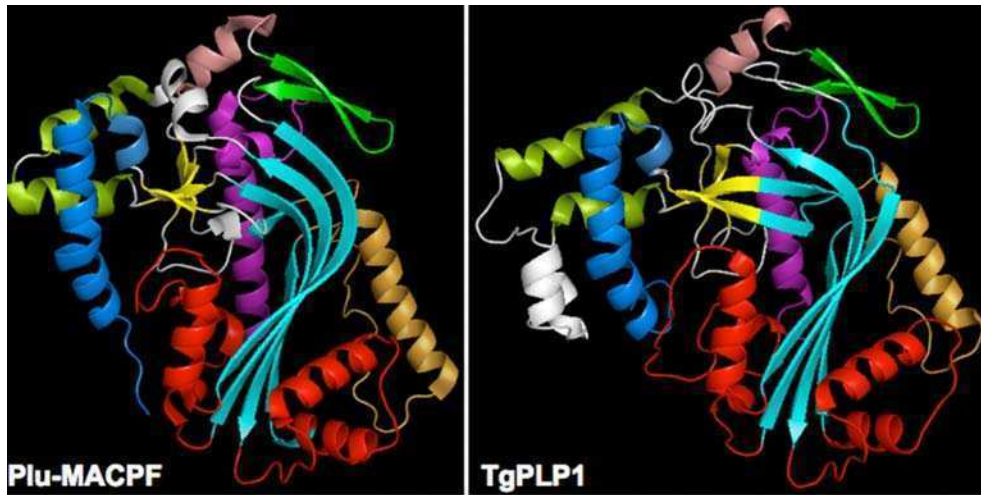


Figura 17. Modelo de estructura tridimensional de TgPLP1 por homología a Plu-MACPF. Láminas beta en celeste y dos dominios de alfa hélices en rojo CH1/CH2 (Kafsack y col., 2009).

Los grupos de hélices CH1/CH2 (TMH1/TMH2) alternan residuos hidrofóbicos e hidrofílicos, en consonancia con la capacidad de convertirse en láminas beta antipáticas que atraviesan la membrana durante la inserción del poro (Shatursky y col., 2009; Tilley y Saibil, 2006). Los dominios ricos en láminas beta del extremo C-terminal jugarían un papel crítico en la unión a la membrana (Li y col., 1991).

Recientemente, Kafsack y Carruthers (2010) realizaron una revisión de las proteínas del tipo perforinas anotadas de apicomplejos. El número de dominios MACPF varía entre ninguno en *Cryptosporidium*, de dos a tres en Coccidiae (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* y *Eimeria*), cinco en Haemosporididae (*Plasmodium*) y ocho en Piroplasmida (*B. bovis* y *T. annulata*)

3. 8. 3. 1. Expresión de los genes *plp* en Apicomplexa

Hasta el momento, existen evidencias de expresión de los genes *plp* en varios estadios de los parásitos apicomplejos. En la Tabla 2 se especifican estos datos.

Género	Gen	Estadio	Evidencia
<i>Toxoplasma</i>	TgPLP1	Taquizoítos Bradizoítos	Proteína (Kafsack y col., 2009) EST (Gajria y col., 2008)
<i>Neospora</i>	NcPLP1 NcPLP2 NcPLP3	Taquizoítos Taquizoítos Taquizoítos	EST (Gajria y col., 2008) EST (Gajria y col., 2008) EST (Gajria y col., 2008)
<i>Eimeria</i>	EtPLP1 EtPLP2	Esporozoítos Esporozoítos	EST (www.ncbi.nlm.nih.gov/est?term=(txid5802[orgn]). EST (www.ncbi.nlm.nih.gov/est?term=(txid5802[orgn]).
<i>Plasmodium</i>	PPLP1 PPLP2 PPLP3 PPLP4 PPLP5	Esporozoítos/intraeritroc. Intraeritrocitario Ookineto Ookineto Ookineto/esporozoíto/ gametocito	Protein/Proteómica (Ishino y col., 2005/Lasonder y col., 2002) Proteómica (Florens y col, 2002) Proteína (Kadota y col., 2004) Proteómica/EST (Hall y col. 2005/Raibaud y col, 2006) Proteína/Proteómica/Proteómica (Ecker y col., 2007/Lasonder y col., 2002)
<i>Theileria</i>	Tplpb TaPLPe Taplpf	Piroplasma Esquizonte Macroesquizonte	EST (Gardner y col., 2005) EST (Pain y col., 2005) EST (Pain y col., 2005)
<i>Babesia</i>	BbPLPb	Intraeritrocítico	EST (De Vries y col., 2006)

Tabla 2. Evidencias de expresión estadio-específica de los genes *plp* en Apicomplexa (Kafsack y col., 2010)

3. 8. 3. 2. Rol de las PLPs en Apicomplexa

Los estudios de microscopia de fluorescencia con anticuerpos específicos contra la PLP1 de *P. yoelii*, demostraron que al igual que la proteína TRAP, esta se localiza en los micronemas de los esporozoítos, indicando que estas proteínas están involucradas en la movilidad por deslizamiento (*gliding motility*) característica de los parásitos de este phylum. Por lo tanto, las PLPs cumplirían un rol importante en la interacción del parásito con el vector y la transmisión al hospedador (Kaiser y col., 2004) (Figura 18).

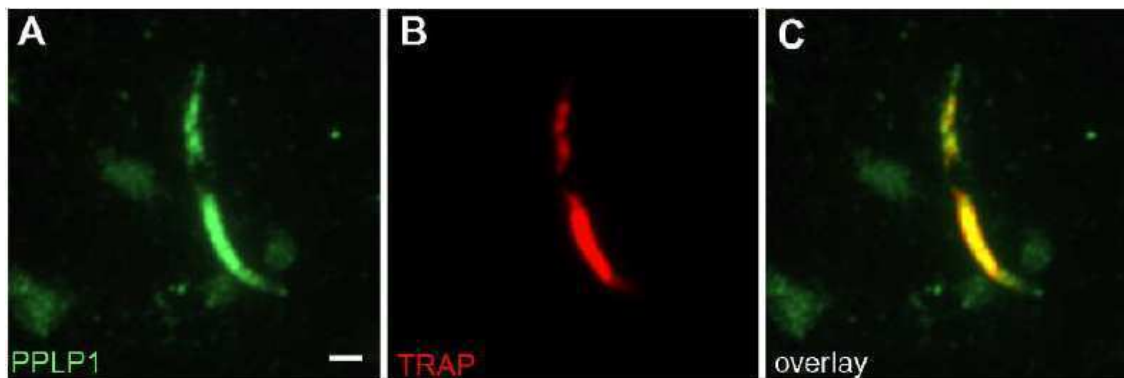


Figura 18. Localización subcelular de la PLP1 en esporozoítos de las glándulas salivales de *Plasmodium yoelii* por inmunofluorescencia indirecta. **A.** Anticuerpo específico anti-PLP1; **B.** Anticuerpo específico anti-TRAP y **C.** Superposición de ambas imágenes fluorescentes. (Kaiser y col., 2004)

El primer reporte que demostró la importancia el rol de las proteínas con dominio MACPF en la invasión de la célula del hospedador fue en la PLP1 de *Plasmodium* (SPECT1) (Ishino y col., 2005). Esta proteína juega un rol importante en la invasión del esporozoíto al hígado, por ruptura de la barrera entre el sistema circulatorio y los hepatocitos. La lámina sinusoidal del hígado es una barrera que los esporozoítos deben romper para establecer la invasión de los hepatocitos. La ruptura de la membrana de las células de Kupffer es esencial para que el esporozoíto entre a la célula. La abolición de la actividad de ruptura de la PLP1 por interrupción del gen, produce una falla en los pasos iniciales de la invasión del parásito a la célula.

Otros reportes han demostrado la importancia de estas proteínas en la invasión de *Plasmodium* por ruptura en la membrana de la célula del hospedador. La interrupción en ookinetos del gen que codifica para la PLP3 (MAOP) impide la invasión del epitelio del intestino medio del mosquito vector. El análisis detallado por microscopía electrónica ha demostrado que los ookinetos pueden adherirse a la superficie celular del epitelio pero no puede ingresar al citoplasma. Por lo tanto, esta proteína es esencial para la ruptura de las células del epitelio previa a la invasión del intestino del mosquito (Kadota y col., 2004). De la misma forma, Ecker y col. (2007) han demostrado que, la proteína de *P. berghei* PLP5 es esencial para la invasión del intestino medio del mosquito. El análisis funcional de distintas mutantes de este gen en ookinetos evita la invasión de las células del epitelio.

En estudios recientes, se ha demostrado la localización de la proteína PLP1 de *T. gondii* en micronemas (TgPLP1) (Figura 19). Estas organelas son importantes para el movimiento por deslizamiento y la invasión. Al igual que otras proteínas de micronemas, TgPLP1 se secreta de

manera calcio-dependiente. No ha sido demostrada la expresión y localización de la TgPLP2 (Kafsack y col., 2009).

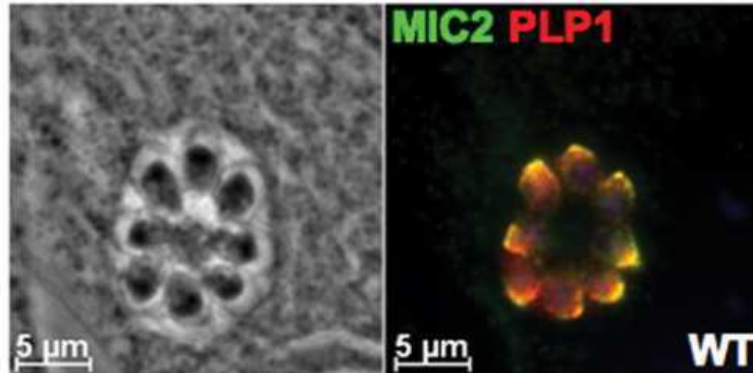


Figura 19. Expresión de TgPLP1 en micronemas (fluorescencia roja) y el marcador de micronemas MIC2 (Verde). Imágenes superpuestas por colocalización de ambas proteínas, en amarillo.

Como se detalló anteriormente, el recorrido celular por los esporozoítos tiene como característica lesionar la membrana plasmática. En contraste, no se han observado lesiones por taquizoítos de *Toxoplasma* por lo que se estima que TgPLP1 cumple un rol diferente al de las PLPs caracterizadas en *Plasmodium*.

La supresión del gen *plp1* de *T. gondii* por recombinación homóloga, que resulta en la pérdida de expresión de este gen, provoca un defecto en el egreso del parásito de la célula infectada. Los parásitos quedan secuestrados entre la vacuola parasitófora y la membrana plasmática de la célula. Se propone que la formación de poros en la membrana de la vacuola parasitófora permite escapar a los parásitos y/o actúa como conducto para secretar las proteínas efectoras que ayudan a la salida del parásito de la célula huésped.

En Piroplasmida poco se sabe de esta familia de proteínas. En *T. parva*, *T. annulata* y *B. bovis* algunas de ellas están anotadas en el banco de genes mientras que, en *B. bigemina* no hay reporte alguno. Asimismo, los mecanismos de invasión y egreso de *Babesia* no han sido dilucidados. En consecuencia, la identificación y caracterización de esta familia del tipo perforinas aportará herramientas útiles para el posible control de estos parásitos.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al estudio de la babesiosis bovina a través de la aplicación de herramientas de genómica y proteómica para la identificación de genes candidatos para el desarrollo racional de vacunas y el mejoramiento del diagnóstico de la enfermedad.

Objetivos específicos

1. Desarrollo de un método de detección molecular de *B. bigemina* sensible y reproducible a partir de la información genómica disponible.

2. Identificación de antígenos de *B. bigemina*

2. 1. Proteómica: separación en dos dimensiones de extractos proteicos del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* para la detección de antígenos inmunoreactivos utilizando sueros de bovinos infectados.

2. 2. Genómica: Identificación y caracterización de genes potencialmente involucrados en los mecanismos de interacción patógeno-hospedador específicos para el phylum Apicomplexa.

Materiales y métodos

1. Parásitos

1. 1. Cepas de referencia

En este trabajo, contamos con las siguientes cepas de referencia (Tabla 1).

Especie	Nombre	Fenotipo 1	Origen	Alias	País	In vitro
<i>Babesia Bovis</i>	BboS2P	patógena	Salta	178	Argentina	si
	BboS1P	patógena	Salta		Argentina	no
	BboS1A	ND	Salta		Argentina	si
	BboR1A	atenuada	Rafaela	44	Argentina	si
	BboM1A	atenuada	Salta		Argentina	no
	BboM2P	patógena	Mercedes	Cinquini	Argentina	si
	BboM3P	patógena	Mercedes	Virasoro	Argentina	si
	BboUy1A	atenuada	ND	167	Uruguay	no
	BboUy2P	ND	ND	24-41	Uruguay	no
	BboUy1P	patógena	ND	41(3758)	Uruguay	si
	BboBr1P	patógena	ND		Brasil	no
	BboBr1A	atenuada	ND	3757	Brasil	si
	BboMx1P	patógena	ND		Méjico	si
	BboMx1c	ND	ND	Mo7	Méjico	si
<i>Babesia bigemina</i>	BbiS1A	atenuada	Salta	209	Argentina	si
	BbiS2P	patógena	Salta	233	Argentina	si
	BbiS2A	atenuada	Salta	187	Argentina	si
	BbiS3P	patógena	Salta	386	Argentina	si
	BbiM1A	atenuada	Mercedes	AlenCué	Argentina	no
	BbiM1P	patógena	Mercedes	AlenCué	Argentina	no
	BbiM2P	patógena	Mercedes	Chavarría	Argentina	no
	BbiM3P	patógena	Mercedes	Iberá	Argentina	no
	BbiUy1A	atenuada	ND	148	Uruguay	no
	BbiUy1P	patógena	ND	70	Uruguay	no
	BbiUy2P	ND	ND	103-70	Uruguay	no
	BbiBr1P	patógena	ND		Brasil	no
	BbiBrA	atenuada	ND	3808	Brasil	no
	BbiMx1P	patógena	ND		Méjico	si
BbiMx1c	ND	ND	JG29	Méjico	si	

Tabla 1. Cepas de referencia disponibles para este trabajo de tesis. ND= no determinado

Las cepas BbiS1A, BbiS2P, BboS2P y BboR1A fueron amplificadas a través del cultivo de eritrocitos bovinos infectados. Por otro lado, las cepas BbiM1A, BbiM2P, BbiBr1P, BboM2P, BboCorrientes y AmVirasoro y Ac (cepa vacunal) fueron amplificadas en terneros esplenectomizados en el INTA Castelar y la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Mercedes (Corrientes).

1. 2. Cultivo de *Babesia* spp. en eritrocitos bovinos

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron multiplicadas en cultivo *in vitro* de eritrocitos bovinos utilizando un método de fase estacionaria microaerófilo (Vega y col. 1985). Este trabajo fue realizado por el Dr. Ignacio Echaide y la Med. Vet. Beatriz Valentini del laboratorio de Inmunología de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela (Santa Fe).

Los eritrocitos bovinos infectados con los parásitos fueron cultivados en medio de cultivo base M199 (Gibco) utilizando 5 mM de HEPES (Sigma) como tampón, 0,5 mM de bicarbonato de sodio (Sigma) y enriquecido con 40% de suero bovino. El medio completo fue logrado después de la adición de 5-10% (V/V) de eritrocitos de un bovino normal. Los cultivos fueron incubados en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. El medio base M199 fue reemplazado cada 24 h y una proporción variable del cultivo completo fue reemplazada por medio completo nuevo luego de 48-72 h (subcultivo) para evitar el estrés de los parásitos.

2. Extracción de ADN

2. 1. Extracción a partir de muestras de sangre infectada con *Babesia* spp.

2. 1. 1. Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico a partir de sangre infectada con distintas cepas de *Babesia bigemina* (Bbi), *Babesia bovis* (Bbo), *Anaplasma marginale* (Am) y *Anaplasma centrale* (Ac).

La sangre entera anticoagulada fue lavada siete veces con PBS 1X centrifugando a 27000 xg durante 30 min a 4°C eliminando en cada paso la capa de glóbulos blancos (*buffy coat*). Al finalizar los lavados, el sedimento fue resuspendido en 20 ml de solución de lisis (TrisHCl 100 mM, 1% SDS, 300 mM NaCl, 25 mM EDTA) y se incubó a 37°C durante 1 h. Se agregó proteinasa K a una concentración final de 200 µg/ml al lisado, e incubó a TA durante 16 horas.

Luego de dicha incubación se volvió a agregar proteinasa K y se incubó 1 hora a 65°C. Se realizaron tres extracciones con fenol-cloroformo centrifugando cada vez a 9.000 xg durante 1 minuto. Se llevó a cabo la extracción de la fase acuosa con cloroformo y luego con éter etílico. La fase acuosa obtenida al finalizar la secuencia de extracciones fue incubada a TA a fin de evaporar el remanente de éter etílico. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de medio volumen de Acetato de Amonio 4 M y 2 volúmenes de etanol 100% recuperando dicho precipitado en forma de ovillo utilizando una varilla de vidrio. Se realizó un lavado final con etanol 70% y se resuspendió en agua libre de nucleasas incubando a 65°C durante una hora para hidratar y solubilizar el ADN. El ADN obtenido se mantuvo a -20°C hasta su utilización en los ensayos de PCR.

2. 1. 2. Extracción con Detergentes

Este método se aplicó en muestras de sangre de bovinos procedentes del muestreo de rodeos del NOA y NEA enmarcado en un proyecto de la Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica e INTA (PICTO 08-12920). De este muestro se seleccionaron muestras de sangre de animales cuyo frotis fue positivo para *B. bigemina*. La sangre obtenida del muestreo, fue procesada según la metodología descrita por Higuchi (1989). Brevemente, 400 µl de sangre entera fueron homogenizados con 800 µl de buffer de lisis (Sacarosa 0,32 M, TrisHCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM, Triton X-100 1% v/v). Se obtuvo la fracción conteniendo el ADN (sedimento) por centrifugación a 15.000xg por 30 s. A dicha fracción se le realizaron dos a tres lavados con buffer lisis hasta obtener un sobrenadante translúcido para minimizar la contaminación con hemoglobina. El sedimento obtenido luego de la última centrifugación fue resuspendido en 100 µl de buffer PBNB (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH: 8,3, MgCl₂ 2,5 mM, gelatina 0,1 mg/ml, Nonidet P40 0,45% v/v, Tween 20 0,45% v/v) e incubado por 16 horas con 200 µg/ml de Proteinasa K. Finalmente, las muestras fueron hervidas durante 10 min y conservadas a -20°C hasta su posterior utilización.

3. Extracción de ARN

3. 1. Extracción de ARN con Trizol LS a partir de cultivo de *Babesia* spp.

Cuando el cultivo alcanzó una parasitemia mayor al 8% de EP se centrifugó a 3000xg durante 20 min a 4°C. Se descartó el medio para seguir trabajando con el paquete de glóbulos rojos infectados con *Babesia* spp. El paquete se resuspendió en Trizol LS (Invitrogen) siguiendo la relación 0,75 ml de Trizol LS por cada 0,25 ml de paquete de glóbulos rojos. La mezcla se homogeneizó y se incubó 5 min a TA para lisar las células. Luego, se le agregó 0,2 ml de cloroformo por cada 0,75 ml de de Trizol LS, se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó durante 10 min a TA. A continuación se centrifugó a 12000xg durante 15 min a 4°C. Se formaron 3 fases, la fase de arriba (fase acuosa) que contenía el ARN fue transferida a un tubo Corex de vidrio y precipitada con 0.5 ml de isopropanol por cada 0,75 ml de Trizol LS y se incubó durante 10 min a TA (TA). Se centrifugó en centrífuga Sorvall RC5C (Dupont) a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. Se obtuvo un sedimento transparente correspondiente al ARN que fue lavado con Etanol 75% (1 ml de Etanol por cada 0,75ml de Trizol LS). Se mezcló en vortex y centrifugó a 7500 xg durante 5 min a 4°C. Fue descartado en sobrenadante y se dejó evaporar el resto del Etanol durante 10 min a TA. Luego se resuspendió el sedimento de ARN en 50 o 100 µl de agua libre de ARNasas y finalmente se incubó la solución a 55°C para disolver el ARN. La calidad del ARN fue observada en un gel de agarosa al 1% y la cantidad fue medida en el Nanodrop. Las soluciones con ARN fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

3. 2. Eliminación de contaminación con ADN

La calidad de los ARNs purificados en este trabajo fue optimizada eliminando el ADN presente como contaminante en algunas de las muestras utilizadas. Para eliminar esta contaminación se procedió a precipitar el ARN con Cloruro de Litio (Ambion) con la mitad del volumen total de la muestra. Luego, fue incubado a -20°C durante 30 min y centrifugado a 12000 xg durante 20 min a 4°C. El precipitado resultante fue lavado 2 veces con Etanol 75% y centrifugado a 7500xg durante 5 min a 4°C. Se dejó evaporar el Etanol remanente 10 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió el ARN en 30 µl de agua libre de ARNasas. Para disolver mejor el ARN se incubó 10 min a 55°C. Se verificó la calidad y la cantidad de ARN en la muestra y se guardó a -80°C hasta su posterior uso.

4. Método de detección del parásito

4. 1. Búsqueda de secuencias del gen *rap-1a*

Las secuencias correspondientes a tres de las cuatro variantes del gen *rap1a* reportado en la literatura por Suarez y colaboradores en el año 2003 fueron extraídas de la base de proteínas no curadas del National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4. 1. 1. Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias obtenidas de los genes parálogos fueron alineadas utilizando la herramienta de alineamiento múltiple Clustal W2.0.9 (Larkin y col., 2007) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) del servidor ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>). A partir de la región conservada entre estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron analizados con la herramienta Oligo Analyzer 3.1 de IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT)

4. 1. 2. Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos con el templado

Se realizó la amplificación de *rap-1a* con los oligonucleótidos específicos a distintas temperaturas de hibridación por medio de una PCR de gradiente de temperaturas. Las temperaturas analizadas fueron 55°C, 57°C, 58°C y 60°C. Los templados utilizados en esta optimización fueron BbiM1P y BboM2P como control de especificidad.

La reacción de PCR para amplificar los 412 pb del gen *rap-1a* se llevó a cabo en una cabina especial para preparar las mezclas de reacción libres de contaminantes por la aplicación de luz UV luego de cada uso (UV PCR Workstation, UVP). Los templados correspondientes a ADN genómico extraídos de las muestras de sangre de los distintos aislamientos, fueron incorporados a la mezcla de PCR en una mesada aislada. Los componentes de la mezcla de reacción se detallan en la tabla 2.

Componentes	Concentración Final
10X Buffer DNA Pol (Invitrogen)	1X
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	1,5 mM
dNTPs 2,5 mM c/u (Promega)	200 μM c/u
Taq 5U/ul (Invitrogen)	0,025 U/μl
Oligonucleótidos 100 ng/ul (IDT)	2 ng/ μl
ADN templado	2 ng/μl
Volumen final de reacción: 50 μl	

Tabla 2. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Además, se realizó un control negativo reemplazando el ADN por agua, para descartar posibles contaminaciones en los reactivos. La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo en un termociclador Mastecycler egradient S (Eppendorf) utilizando el programa que se detalla en la tabla 3.

Temperatura	Tiempo
94°C	3 min
94°C	30 s
58°C	30 s
72°C	40 s
30 ciclos	
72°C	10 min

Tabla 3. Programa de ciclos para amplificar el gen *rap-1a*.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta en transiluminador. Se obtuvieron fotografías de los geles con el Gel Doc XR (BIO- RAD).

4. 1. 3. Límite de detección de la PCR

Para calcular el límite de detección de los oligonucleótidos específicos que amplifican el gen *rap1-a*, se realizaron diluciones seriadas al décimo de una muestra de sangre infectada con la cepa BbiS3P cuya parasitemia fue del 2% de eritrocitos parasitados (EP). Se utilizó como diluyente sangre de un ternero negativo para los hemoparásitos bovinos. El hematocrito de la sangre del ternero negativo fue llevado con PBS 1X al hematocrito de la sangre del bovino. De esta manera las diluciones seriadas al décimo diluyeron el paquete de eritrocitos y en consecuencia la parasitemia en cada caso. Las diluciones resultantes en el rango de 2% a 2×10^{-9} % de EP fueron procesadas para su posterior extracción de ADN genómico por el método de detergentes descrito anteriormente (Higuchi, 1989).

5. Detección y cuantificación de los transcritos correspondientes a los genes *plp* de *B. bovis* y *B. bigemina*

5. 1. Northern Blot

5. 1. 1. Corrida electroforética

En primer lugar se preparó un gel de 1,2% de agarosa libre de ARNasas en 100 ml de Buffer ME 1X (Tabla 4) preparado con agua DEPC. Una vez que el gel solidificó se procedió a preparar el buffer de siembra (Tabla 5).

Componente	Cantidad para 1L	Concentración final 10X
MOPS 20g/mol	83,6 g	400 mM
Acetato de Sodio 82.03 g/mol	8,2 g	100 mM
EDTA 0.5M pH 8	20 ml	10 mM

Tabla 4. Componentes del Buffer ME 10X (MOPS-EDTA)

Componente	Cantidad	Concentración final
Formamida desionizada 100%	200 μ l	60,6%
ME 10X	40 μ l	1,2X
37% Formamida	76 μ l	8,5%
0,25% azul bromofenol/0,25% xylene cyanol	7 μ l /7 μ l	0,011%

Tabla 5. Componentes del buffer de siembra.

Se tomaron 3 μ g de ARN extraído de cultivo de eritrocitos infectados con BbiS2P y BboS2P (el volumen sembrado se encontraba en el rango 1,5-5 μ l) y se mezclaron con 15 μ l de colocaron en hielo. Al marcador de peso molecular *RNA ladder* (Promega) se le aplicó el mismo tratamiento. Se procedió a la siembra del gel con las muestras y se realizó la corrida electroforética a 70 V durante 4-5 h aproximadamente en frío. La presencia e integridad el ARN luego de la electroforesis se examinó y se fotografió con el Gel Doc.

5. 1. 2. Transferencia de gel a membrana de nylon

Inmediatamente, se procedió a transferir el ARN del gel a una membrana de nylon Hybond N (GE) por capilaridad. Se utilizó como Buffer de transferencia el SSC10X y se dejó transfiriendo toda la noche a TA. Luego, el ARN se fijó a la membrana mediante la técnica *gene-linker* con 0,012 j/cm² de luz Ultravioleta (BioRad G.S. Gene Linker UV Chamber).

5. 1. 3. Síntesis y marcación de sondas

Las sondas utilizadas en el *Northern Blot* fueron obtenidas a partir del producto de la amplificación de un fragmento de entre 100 y 200 pb con los oligonucleótidos específicos para cada gen *plp* diseñados para RT-PCR utilizando como templado ADN genómico de la cepa BbiS2P. Los productos de PCR fueron purificados de la mezcla de reacción utilizando el *kit* de purificación de productos de PCR (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN). El fragmento de ADN fue eluído con 30 μ l de agua libre de nucleasas. Se midió la concentración de cada producto con el Nanodrop.

La marcación de las sondas se realizó 1 hora antes de finalizada la prehibridación de la membrana con el *kit* Prime-a-Gene® Labeling System (Promega). En primer lugar se desnaturalizaron los fragmentos de ADN a 100°C por 2 min e inmediatamente se colocaron los templados en hielo. Luego, se realizó la mezcla de reacción detallada en la tabla 6. Y se incubó 1 h a 37°C en recipiente de acrílico que actúa como pantalla para la radioactividad.

Componente	Cantidad	Concentración final
H ₂ O libre de Nucleasas hasta alcanzar el Volumen final de 50 µl	_ µl	
5X Buffer de marcación	10 µl	1X
Mezcla de nucleótidos sin marcar (A, T y G)	2 µl	20 µM cada uno
ADN desnaturalizado (templado)	25 ng	500 ng/µl
BSA libre de Nucleasas	2 µl	400 µg/ml
[α- ³² P] dCTP, 50µCi, 3000Ci/mmol	2	133,2nM
ADN Polimerasa I fragmento grande (Klenow)	5 U	100U/ml
Volumen Final	50µl	

Tabla 6. Componentes de la reacción de marcación de las sondas.

Luego de la incubación las sondas fueron purificadas con el *kit* de remoción de nucleótidos QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las sondas marcadas fueron eluidas con 30 µl de buffer de elución (EB). A esta solución se le agregó 18 µl de NaOH 0,5M.

5. 1. 4. Prehibridación e hibridación

La membrana se prehibridó con 10 ml del Buffer ULTRAhyb® Ultrasensitive Hybridization (Ambion) a 42°C durante 4 horas como mínimo en tubos de vidrio en rotor de agitación. Luego de la prehibridación y sin cambiar el buffer, se le agregó los 48 µl de la sonda marcada y purificada y se incubó toda la noche en horno con agitación a 42°C.

La sonda fue guardada en un tubo de 50 ml adentro de un frasco de acrílico a -20°C para continuar con su uso.

Las membranas se lavaron en un recipiente de plástico con distintas condiciones de astringencia de acuerdo a la intensidad de la marca inespecífica medida por el contador de radioactividad (Geiger). Se partió de una solución SSC2X/0,1% SDS a TA y luego se elevó la temperatura a 42°C. Cuando el contador indicó mucha radioactividad se disminuyó la concentración de SSC a 0,2X y se fue elevando la temperatura hasta 52°C. Las membranas fueron expuestas a una pantalla radiográfica en un casete protector. Se expusieron de 4 h a 3 días de acuerdo a la intensidad de la marca radioactiva. Las pantallas se revelaron en el Thyphoon Trio Scanner (GE).

Las membranas con las sondas marcadas hibridadas fueron lavadas para su eliminación con 0,1 % de SDS a 100 °C. De esta manera las membranas pudieron utilizarse con otras sondas.

5. 2. RT-PCR de punto final

5. 2. 1. Síntesis de ADN copia (ADNc)

En primer lugar las muestras con ARN fueron tratadas con ADNasa para eliminar posibles contaminaciones con ADN. Para ello, se incubaron 2 µg de ARN a TA durante 30 min con 2 µl de DNAasa (Deoxiribonuclease I Amplification grade, Invitrogen), 2µl de DNAasa I Reaction Buffer 10 X (Invitrogen) y el volumen de agua hasta completar los 20µl. En el caso de las muestras que presentaron contaminación por ADN aún luego del tratamiento con Cloruro de Litio descrito en el punto 3. 2, se le agregó a la reacción 1 µl de ADNasa y se incubó a TA por 20 min adicionales. Luego de esta incubación, se le agregó 1 µl de EDTA 25mM (Invitrogen) por cada 1 µl de DNAasa para inactivar la enzima incubando a 65°C durante 10 min. Ulteriormente, se procedió a realizar la retrotranscripción para la síntesis de ADNc a partir del ARN. Consecuentemente, a la solución con la *DNAasa* inactivada se le adicionó 2 µl de Random primers (Invitrogen) y 2 µl de DNTPs 10mM (Promega). Esta se incubó a 65°C durante 5 min y se mantuvo en hielo durante 5 min adicionales. Luego, Se le agregó 4 µl de First Strand Buffer 5X (Invitrogen), 1 µl de DTT 0.1M (Invitrogen) y 1 µl de la enzima Superscript III RT (Invitrogen). Se llevó a 20 µl con el agregado de agua estéril. Se realizó un control sin enzima para asegurarnos de que no hubiera contaminación con ADN.

La eficiencia de la síntesis de los ADNc obtenidos fue verificada a través de la PCR para detectar *B. bigemina* desarrollada en este trabajo de tesis que amplifica el gen *rap-1a* que está probado que se transcribe en el estadio intraeritrocitario (Suarez y col., 2004) (en el caso de los ARN de *B.*

bigemina). Por otra parte, para verificar la síntesis del ADNc de *B. bovis* utilizamos oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *hp20*.

5. 2. 2. Diseño de los oligonucleótidos específicos

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de entre 100 y 200 pb del dominio MACPF. Utilizamos el programa Primer Express® (Applied Biosystems) estableciendo como parámetros 100-200 pb de tamaño del amplicón, temperatura de hibridación (TH) entre 58°C y 60°C, 50% GC y entre 20 y 22 pb. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT)

El fragmento a amplificar en la mayoría de los genes no poseía intrones a excepción de los genes *Bboplpc*, *d* y *e*. En el caso del gen *Bboplpe* que posee tres dominios MACPF se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de cada dominio MACPF.

Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 7. Los reactivos de la mezcla y las condiciones de ciclado se muestran en las tablas 8A y B.

A

Nombre	Secuencia	TH (°C)
BbiplpaRTF	5'-TGGGTATTGATGTGAAGCCGA-3'	58,5
BbiplpaRTR	5'-TTCTTGCCGAGAAAGTTGGCGA-3'	59,5
BbiplpbRTF	5'-ACATCAAGGCAAACCTCGGGCAT-3'	59,7
BbiplpbRTR	5'-ATGGGCATCGGCTTTCGGTAAA-3'	59,4
BbiplpcRTF	5'-TTGAGGTTAGCGTGCTTGGA-3'	59,4
BbiplpcRTR	5'-ATTGTGCTGCTGAACGACCCA-3'	59,7
BbiplpdRTF	5'-TGTCGACGCCTTACAACCACTA-3'	58,1
BbiplpdRTR	5'-ATGCTCTCGGCTGACATTCAA-3'	58,9
BbiplpeRTF	5'-ACGGCAGTCAAGTTTCGGAGTT-3'	59,1
BbiplpeRTR	5'-TATGTCGATGGCATGGCGTT-3'	59,3
BbiplphRTF	5'-AAAGTGTTCGGCAGGTTTCACT-3'	59,9
BbiplphRTR	5'-TCCATCGCGTGCATATGCTT-3'	58,8
BbiplpgRTF	5'-CATTGCGCGATGACGAAGAAA-3'	58,3
Bbiplp5gRTR	5'-ATACCGCAGCGCTCCTTAAAT-3'	58,4
BbiplpfRTF	5'-ATCAGGTGGTGTCTACGGCAAT-3'	58,4
BbiplpfRTR	5'-TAGGTCGCTGGCTTAAGCTTCT-3'	58,1

B

Nombre	Secuencia	TH (°C)
BboplpaRTF	5' AAGCCGATTGAAAGTTTG 3'	54,5
BboplpaRTR	5' TTTGACGCGCTGAGAACGT 3'	57,7
BboplpbRTF	5' GTTGACCCAGGATACAGGCATC3'	57,6
BboplpbRTR	5' GATCCATCCACCCTTAGGCTCT 3'	58,2

BboplpcRTF	5' GTTCGCAATGTCATCAGGTT 3'	53,5
BboplpcRTR	5' GCAGCTCATTCAACGCAATATC 3'	54,8
BboplpdRTF	5' TGGAGAAAATCTGCCGAAGG3' '	55
BboplpdRTR	5' GCAGACGCCGAAAATGCTA 3'	56
Bboplpedom1RTF	5'TCCTGTGGACTCCAGAAGGTTT3'	59,9
Bboplpedom1RTR	5'CAGAGCGAACCAATAGTGTCTTCT3'	56,6
Bboplpedom2RTF	5' CTAAGGTCTCCAGCGAAGGAAA 3'	56,5
Bboplpedom2RTR	5' CCAATCTTCGAACACATCAGGA 3'	54,9
Bboplpedom3RTF	5' GAGCATCTGCAGGTGTTGGTT 3'	58
Bboplpedom3RTR	5' CTACATTCCTATCGTACGCC 3'	56,8
BboplpfRTF	5' CTGCTCCAGTATGCATCAATGG 3'	50,7
BboplpfRTR	5' GGATTCACCACCGCCTAAAGT 3'	52,6

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los transcritos de los genes *plp* de *A. B. bigemina* y *B. B. bovis*.

A

Componentes	Concentración Final
5X Green Gotaq Buffer (Promega)	1X (1,5mMClMg ₂)
dNTPs 2,5 mM c/u (Promega)	200 µM c/u
Go taq ADN Pol 5U/ul (Promega)	0,025 U/µl
Oligonucleótidos 100 ng/ul (IDT)	2 ng/ µl
ADNc templado	5 µl
Volumen final de reacción: 50 µl	

B

Programa	
94°C	3 min
94°C	30 s
TH *	30 s
72°C	40 s
35 ciclos	
72°C	10 min
15°C	∞

Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR con ADNc y oligonucleótidos específicos de cada *plp*. **A.** Reactivos para la PCR, **B.** Programa de ciclado. * TH: temperatura de hibridación óptima de cada par de oligonucleótidos.

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

5. 2. 3. RT-PCR para verificar la anotación del gen *Bbiplpc*

Los oligonucleótidos utilizados en la verificación de la anotación del gen *plpc* de *B. bigemina* se detallan en la Tabla 9.

Nombre	Secuencia	TH (°C)
1	5'-TCAGCAGAATACCTCGGTAG-3'	53,4
2	5'-ACGAAGATGTAGTGACAGCTCAA-3'	59,2
3	5'-AAACCATCGACTCGGCTGCAT-3'	59,5
4	5'-TCTTGTCTGCCTCAATCACGTCCA-3'	59,9
5	5'-TGCAACAGTTACGTCTGTCTGC-3'	57,6
6	5'-TAT CCA CGC ATA CCG CCC ATA T-3'	58,2

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para verificar la anotación del gen *plp* de *B. bigemina*.

5.3. RT-PCR cuantitativa

En la PCR en tiempo real, las reacciones son analizadas en la fase inicial en lugar de en la fase exponencial como ocurre en la PCR punto final. Mediante el uso de SYBR Green (un colorante fluorescente que se intercala en las bases del ADN) en la mezcla de PCR, es posible detectar la formación de producto de PCR de doble cadena después de cada ciclo. Para cada tubo de reacción, la señal de fluorescencia del colorante reportero (SYBR) se divide por la señal de fluorescencia del colorante de referencia pasivo (ROX) para obtener una razón definida como reportero de la señal normalizada (Rn). Cuanto mayor sea la cantidad inicial del producto de PCR específico, más pronto aparecerá un aumento significativo en la fluorescencia que se observa. El parámetro de ciclo umbral (Ct) se define como el número de ciclo en el cual la fluorescencia cruza un umbral fijado por encima de la línea de base. La cantidad de producto específico en una muestra desconocida se calcula trazando el valor Ct en la curva estándar.

5.3.1. Determinación de la concentración óptima de los oligonucleótidos

Previo a la cuantificación de los transcritos *plps*, se optimizó la concentración de los oligonucleótidos descritos en la tabla 7A.

La mezcla de reacción se realizó con el sistema QuantiTect SYBR Green PCR Kit, para Real Time (QIAGEN). Las concentraciones de oligonucleótidos analizadas fueron: 200, 300 y 400 nM y los componentes de la mezcla se detallan en la tabla 10.

Reactivo	Vol/tubo200nM	Mix 200 (x3)	Vol/tubo300nM	Mix 300	Vol/tubo400nM	Mix 400
2X Quanti Tec SYBR Green PCR master mix	12,5 ul	37,5 ul	12,5 ul	37,5 ul	12,5 ul	37,5 ul
Primer F 10mM	0,5 ul	1.5 ul	0,75 ul	2,25 ul	1 ul	3 ul
Primer R 10mM	0,5 ul	1.5 ul	0,75 ul	2,25 ul	1 ul	3 ul
RNasa- free water	10,5 ul	31.5 ul	10 ul	30 ul	9,5 ul	28,5 ul
Vfinal	24 ul	72 ul	24 ul	72 ul	24 ul	72 ul
ADN	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
Vtotal	25 ul		25 ul		25 ul	

Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR Real Time con el sistema QuantiTect SYBR Green (QIAGEN)

La mezcla para cada dilución de oligonucleótidos se distribuyó en una placa de 96 pocillos PCR 96- FLT-C (Axygen) por duplicado y se agregó el templado que en este caso fue ADN de BbiS2P.. Las placas se taparon con tapas aptas para la medición del equipo de Real Time (PCR-2CP-RT-C, Axygen) y se centrifugaron brevemente. Luego, la PCR cuantitativa se llevó a cabo en el equipo de PCR- Real Time 7500 (Applied Biosystems) con el programa especificado en la tabla 11.

Programa	
Activación inicial a 95°C	10min
94°C	15 s
TH X	30 s
72°C*	40 s
40 ciclos	

Tabla 11. Programa para el ciclado. TH X= temperatura de hibridación óptima para cada par de oligonucleótidos. * En este paso se realizó la curva de disociación que detecta la fluorescencia a esta temperatura.

Se analizó para cada reacción con las distintas concentraciones de oligonucleótidos la curva normalizada con la línea de base ΔR_n versus ciclo y la Curva de disociación. Se seleccionó en cada caso la concentración a la cual no se formaron dímeros de los oligonucleótidos y en la cual el producto de PCR aparece antes en la curva.

5. 3. 2. Eficiencia de la amplificación de los genes

Se realizó una curva estándar para calcular la eficiencia de los pares de oligonucleótidos. Para ello se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo a partir de 1/10 hasta 1/10000 del ADN de concentración inicial de 182,5 ng/ μ l. Teniendo en cuenta que se utilizó 1 μ l de esta solución por pocillo para cada una de las diluciones, se calculó el número de moléculas representadas en la masa de ADN teniendo en cuenta que el tamaño del genoma de *B. bigemina* es 10^7 pb/molécula (Ray y col., 2002; Suarez y col., 2004). De acuerdo a la tabla de conversión disponible en el sitio <http://www.ambion.com/techlib/append/na.mw.tables.html>, 1g de una secuencia de ADN doble cadena es equivalente a $5,5 \times 10^{11}$ moléculas y 1 ng de ADN de *B. bigemina* debería contener aproximadamente 10^5 moléculas de ADN. Teniendo en cuenta que los genes estudiados en este trabajo son de copia única 1ng de cada fragmento contendrán 10^5 moléculas. Con estos valores del número de moléculas se construyó una curva de Ct en función del logaritmo del número de moléculas de las cuatro diluciones para cada par de oligonucleótidos que poseen una relación lineal. Se estimó la pendiente de la curva por medio de la regresión lineal de los datos obtenidos para cada producto específico amplificado y esta se utilizó para el cálculo de la eficiencia de la amplificación para cada gen analizado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

La eficiencia de 1 (100%) indica que en cada ciclo de amplificación el producto aumenta la misma cantidad obteniéndose luego del primer ciclo el doble en el segundo y así sucesivamente. Esta es la eficiencia óptima de amplificación de un gen de interés.

5. 3. 3. Transcripción de los genes *plp*

Para cuantificar la transcripción de los genes *plp* se utilizó el protocolo detallado anteriormente en las tablas 10 y 11 teniendo en cuenta la concentración óptima de cada par de oligonucleótidos. La reacción para cada oligonucleótido específico se realizó por duplicado y se utilizó como

templado 2 µl de una dilución al medio (1/2) del ADN copia sintetizado a partir de ARN purificado a partir del cultivo *in vitro* de la cepa la cepa de *B. bigemina* BbiS2P y BboS2P de *B. bovis*.

Se programó el equipo de PCR en Tiempo Real para realizar la cuantificación absoluta de la placa (Standard Curve, Absolute Quantitation) y se realizó el ciclado y la curva de disociación como se indicó anteriormente para la optimización de la concentración de los oligonucleótidos.

Los resultados arrojados por el programa se analizaron con el programa del termociclador modificando manualmente la línea de base y el umbral de fluorescencia para calcular el Ct.

Los resultados fueron guardados y exportados en formato texto y luego se abrió en Excel. Los valores de Ct fueron extrapolados en cada caso en las curvas estándar a partir de la fórmula de la recta para obtener el logaritmo del número de moléculas y luego el número de moléculas.

Los valores de Ct para cada uno de los transcritos fueron relativizados al gen de referencia fructosa 1-6 bifosfato aldolasa anotado de la base de datos de genes de referencia de *B. bovis* (RefSeq) del NCBI (locus tag BBOV_IV000790).

A partir de la secuencia extraída del NCBI se realizó la búsqueda del ortólogo en el genoma de *B. bigemina* utilizando el algoritmo TBLASTN. A partir de la secuencia obtenida se diseñaron oligonucleótidos específicos con el programa Primer Express® (Applied Biosystems) utilizando los parámetros detallados en el punto 5. 2. 2. La secuencia de los oligonucleótidos se detalla en la tabla 12.

Nombre	Secuencia	TH (°C)
BbifructaldoRTF	5'- GCTAAGGAGTTGGCGGAGAAT - 3'	59
BbifructaldoRTR	5'- CGCCTACATTGTCAAACGCT - 3'	59

Tabla 12. Oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 109 pb del gen fructosa aldolasa.

A cada valor de número de moléculas del gen de interés se lo dividió por el número de moléculas del gen de referencia:

$$\frac{\text{Número de moléculas plpx}}{\text{Número de moléculas fructo 1-6 bifosfato aldolasa}}$$

5. 3. 4. Análisis estadístico

El análisis de resultados de la transcripción de los genes *plp* se realizó con R versión 2.12. Los datos de logaritmo del número de moles y el número de moles para cada ADNc correspondiente a cada ARN se cargaron a partir de un archivo de texto preparado con los datos de la planilla Excel.

Los datos de los dos aislamientos de ARN se analizaron por separado. El primer análisis correspondió a las muestras etiquetadas “ARN1”. En primer lugar se realizó un análisis gráfico (boxplot) para observar las distribuciones de los datos sin transformar y transformados a logaritmos.

El siguiente paso fue el análisis de la varianza de los datos logarítmicos de abundancia en función del gen analizado y del lote de ADNc. Estos resultados se graficaron en boxplots separados para cada ADNc.

Para determinar los contrastes entre genes se realizó un test de Tukey (Tukey, 1953), que permite incluir la interacción del modelo (Tukey *multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level*).

Para complementar los análisis anteriores se realizaron contrastes del tipo “todos contra uno” usando el test de Dunnett (Dunnett, 1980) comparando todos los genes contra *plpe*.

Los datos para ARN2 se analizaron de la misma manera que los de ARN1.

El análisis estadístico de los datos fue realizado por el Dr. Marcelo Soria del El Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales – INBA de la Facultad de Agronomía de la UBA.

6. Expresión de la proteína recombinante PLPA de *B. bigemina*

6. 1. Clonado del gen *Bbiplpa*

Se amplificó la región un fragmento de 1140 pb que codifica para la región carboxilo terminal de la BbiPLPA que contiene el dominio MACPF (Figura 1) Los oligonucleótidos diseñados se especifican en la tabla 13. A cada oligonucleótido se le agregó el sitio de corte de la enzima de restricción BamHI para que el producto de PCR sea clonado en ese mismo sitio en el vector pRSET A (Invitrogen).

El programa de ciclado para amplificar el gen *Bbiplpa* se detalla en la tabla 14. Este se llevó a cabo en el termociclador Trio Thermoblock (BIOMETRA).

Programa	
94°C	3 min
94°C	30 s
53°C	30 s
72°C	1 min
10 ciclos	
94°C	30 s
63°C	30 s
72°C	1 min
25 ciclos	
72°C	10 min

Tabla 14. Programa de ciclado para amplificar *Bbiplpa*

El producto de PCR obtenido fue chequeado en un gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio y luego se clonó en el vector PCR TOPO 2.1 y se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5 α con el fragmento ligado a TOPO 2.1. Los plásmidos positivos fueron digeridos con la enzima BamHI (Promega) y ligados con T4 DNA Ligasa en el vector de expresión pRSET A previamente digerido con BamHI y desfosforilado sus extremos 5' fosfato. La solución de ligación fue utilizada para transformar DH5 α . Se seleccionaron clones a los cuales se les extrajo el ADN plasmídico. Se examinó la orientación del inserto en el vector digiriendo con la enzima de restricción EcoRI (Promega). Los plásmidos que liberaron un fragmento de 759 pb fueron seleccionados para transformar *E. coli* BL21pLys para proceder a la expresión de las proteínas.

6. 2. Expresión y purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes

La expresión de la proteína se llevó a cabo mediante la inducción de 250 ml de cultivo de células BL21-pLys transformadas con el plásmido *Bbiplpa*- pRSETA en medio LB (Luria Broth) a una DO₆₀₀ de 0,4 utilizando IPTG a una concentración final de 1 mM durante 3 horas. Luego de transcurrido el tiempo de inducción, se centrifugaron las células a 10000 xg por 20 min a 4°C y se

resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis nativo pH: 7.8 (K_2HPO_4 50 mM, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 0.5%, Imidazol 10 mM, PMSF 2mM) con el agregado de 1 mg/ml de Lisozima (Sigma), en presencia de imidazol 5 mM para disminuir las interacciones inespecíficas. La muestra se incubó 1 h a 4 °C en agitación y se completó la lisis de las bacterias y la disrupción de los ácidos nucleicos por sonicación, con 6 pulsos de 10 s en un sonicador Branson 250 (VWR Scientific), con intervalos de incubación de 10 s en hielo entre cada pulso. Posteriormente, luego de la lisis las bacterias se centrifugaron a 5000 xg por 25 min y se examinaron el sobrenadante y el sedimento resultante por SDS-PAGE para determinar la solubilidad de la proteína recombinante. La proteína recombinante resultó ser insoluble permaneciendo en cuerpos de inclusión del sedimento. Por lo tanto, se tomó el sedimento y se lo resuspendió en 2 ml de Buffer Urea 8M con 0,3 M de NaCl. Luego se agitó a 37 °C durante 1 hora y se sonicó una vez durante 15 s y se centrifugó a 15000xg durante 30 min a 20 °C. Luego, se purificó utilizando la resina Ni-NTA ProBond (Invitrogen). La secuencia His-Tag presente en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante une los cationes Ni inmobilizados a la resina, que emplea el ácido nitriloacético (NTA) como quelante, ya que tiene 4 sitios disponibles para la interacción con iones metálicos. Para la purificación de la proteína recombinante se utilizó 0,5 ml de resina luego de ser activada con 8 volúmenes (4 ml) del buffer de unión Urea 8M con 0,3 M de NaCl (equilibrado de la resina). A la resina ya equilibrada se le agregó al sobrenadante proveniente de la centrifugación luego de la lisis del sedimento y se incubó a TA durante 1 hora en un agitador orbital. Luego, se equilibró una columna cromatográfica de vidrio de 20 cm de longitud, se reguló el flujo óptimo de salida y posteriormente se eluyó el sobrenadante (Percolado). Inmediatamente, se procedió a realizar 2 lavados de la resina con 15 ml del buffer de lavado Urea 8M con 0,5 M de NaCl y 30 mM de Imidazol (Sigma) La elución de la proteína se realizó por desplazamiento competitivo con imidazol. Como buffer de elución se utilizó el buffer de lavado con concentraciones crecientes de imidazol (125 mM a 1M).

La proteína purificada fue sometida a una corrida electroforética en gel de poliacrilamida. El rendimiento de la purificación fue evaluado por tinción con una solución de azul de Coomassie.

Se juntaron 4 fracciones que tenían mayor cantidad de proteína (1,5 ml) y se separó por electroforesis en gel preparativo mediano de poliacrilamida al 10% con el sistema SE 600 RUBY™ (GE). La corrida se llevó a cabo 90-100V durante 1 h y luego a 200V durante 3 horas. El gel fue teñido con KCl 100mM frío y la banda correspondiente a la proteína de interés fue cortada del gel y colocada dentro de una membrana de diálisis de punto de corte 3 KDa (Pierce). Luego se la sometió a una electro-elución en Buffer Laemmli 1X con 0,05% de SDS a 200 V

durante 2 horas en frío. Luego de este tiempo se extrajo el contenido líquido y se colocó en una nueva bolsa de diálisis para concentrar la proteína en Sacarosa a 4°C durante 30 min. Finalmente, la muestra fue dializada en 1 L de PBS 1X a 4 °C en agitación durante 4 horas, luego se cambió el buffer y se lo dejó toda la noche en agitación a 4 °C. Esto se realizó para eliminar la Urea presente en la muestra.

La concentración de proteínas fue medida con el kit BCA Protein Assay (Pierce) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Electroforesis SDS-PAGE

La proteína recombinante fue separada por su peso molecular por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% de acuerdo al método descrito por Laemmli en 1970. Para un volumen de 5 ml de gel separador al 10% se utilizaron 2 ml de de solución de acrilamida al 30% (acrilamida 29,2 % y N,N'-metil bisacrilamida 0,8 %, BioRad), 1,3 ml de buffer TrisHCl 1.5 M, pH 8.8, 0.05 ml SDS 10%, 1.7 ml de agua milliQ, 0.05 ml de persulfato de amonio al 10% y 2 µl de TEMED (N, N,N`N`-tetra-metiletilendiamin.a, BioRad). Para 1 ml de gel concentrador se utilizaron 0.68 ml de agua desionizada, 0.17 ml de solución de acrilamida al 30%, 0.13 ml de buffer TrisHCl 1M pH 6.8, 0.01 ml de SDS 10%, 0.01 ml de persulfato de amonio 10% y 1 µl de TEMED. Los geles fueron armados en el sistema MiniProtean III (BioRad), y las muestras corridas en buffer Laemmli (Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 250 mM, SDS 0.1%) a un amperaje constante (35 mA) por un tiempo aproximado de 1 hora. Se utilizó el marcador de peso molecular Broad Range Molecular Marker (Fermentas).

Luego de la separación electroforética de las proteínas, se realizó la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) en buffer de transferencia (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). La transferencia se realizó aplicando un amperaje constante de 100 mA por 16 horas ó de 200 mA por 1 hora a 4°C. Se verificó la transferencia de las proteínas por medio de la tinción reversible de la membrana de nitrocelulosa con solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,1%, Sigma, ácido acético glacial 5%).

6. 3. Producción de sueros de ratón

6. 3. 1. Ratones

Se utilizaron ratones hembras de 4 meses de edad de la cepa BALB/cAnN cuyos progenitores fueron procedentes del National Institute of Health (USA). Los animales nacieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad y posteriormente, fueron mantenidos durante 4 meses en el Bioterio del CICVyA del INTA Castelar.

6. 3. 2. Preparación del inóculo

Se tomaron 500 µl de la proteína recombinante disuelta en PBS1X y se le agregó 10 µl de Tween 40 (1%). Luego, se cargaron con jeringa de tuberculina, 500 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma) y se le agregó a la mezcla anterior de a gotas y agitando con vortex para que se formara la emulsión homogénea de color blanco.

Se realizaron dos preparaciones.

6. 3. 3. Inoculación de los ratones

Previo a la inoculación se le extrajo sangre de la cola a cada ratón para obtener sueros pre-inmunes

Se inocularon dos grupos de 3 ratones. Cada ratón fue inoculado vía intraperitoneal con 200 µl de emulsión de proteína que contenía 17 µg de proteína.

Se realizaron sangrados por la cola de cada ratón a los 7 y 14 días post- inoculación. A los 21 días se tomó otra muestra de sangre y se inoculó vía intraperitoneal cada ratón (primer estímulo) con 23 µg de proteína en una emulsión de 200 µl que contenía 100 µl de solución de proteína con 1% de Tween 40 y 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Se extrajo sangre de la cola para suero a los 7 y 14 días del primer estímulo con la proteína. Luego se inoculó cada ratón vía intraperitoneal con 20 µg de proteína (segundo estímulo) de la misma manera que se aplicó el primer estímulo. Se les extrajo sangre a los ratones a los 7, 14 días y los ratones se sangraron a blanco a los 21 días del segundo estímulo.

6.3.4. Western Blot con sueros de ratón

Luego de lavar la membrana con agua destilada, se incubó por toda la noche en leche descremada al 5% en buffer TBS. Se realizaron distintas diluciones de los sueros de ratón a partir de 1/20 hasta 1/200 para su titulación. Se incubó con el suero 2 h. Se realizaron dos lavados de 10 min y se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma, dilución 1:30.000).

Todas las incubaciones fueron realizadas a TA y en agitación, empleando un agitador orbital.

Para la detección de las proteínas recombinantes, se empleó el anticuerpo anti-histidina (Amersham) diluido 1/3000 en TBS-5% leche descremada. Luego de dos lavados finales y de una incubación de 10 min en el buffer de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), se agregó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) en combinación con nitro blue tetrazolium (NBT) (Promega). Se incubó con solución de revelado (33 µl de 50 mg/ml NBT 16,5 de 50 mg/ml BCIP en 5 ml del buffer para fosfatasa alcalina).

6.4. Inmunodetección de BbiPLPA recombinante con sueros bovinos

Se utilizaron sueros de bovinos provenientes del NEA (zona donde la babesiosis es una enfermedad enzoótica) que se siguió a lo largo del tiempo. Los sueros fueron diluidos para su uso en TBS-5% Leche (dilución 1/25) y se prosiguió el protocolo de *Western Blot* como se detalló en el punto anterior.

6.5. Inmunofluorescencia indirecta con sueros de ratón

Para el estudio de la localización subcelular en el parásito de las proteínas PLPs se optimizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre frotis de eritrocitos infectados con *B. bigemina* (cultivo *in vitro* de la cepa BbiS2P) e incubados con los sueros inmunoreactivos de ratón contra la proteína BbiPLPA recombinante. Se utilizaron como controles, un anticuerpo monoclonal de ratón contra la IgM de la membrana de los eritrocitos infectados, la IgM del suero bovino se une a través de la fracción cristalizada de la inmunoglobulina (Echaide y col., 1998) (control positivo de la técnica) y el suero de ratón previo a la inmunización con la proteína recombinante (control negativo). Brevemente, se descongelaron los extendidos de sangre de un bovino infectado con *B. bigemina* a 37 °C durante 30 min. Luego, los sueros fueron diluidos con PBS 1X (dilución 1/100), se aplicaron sobre el extendido y se incubaron en cámara húmeda a

37°C durante 40 min. Luego de la incubación los extendidos fueron lavados dos veces con PBS1X durante 10 min y una vez con agua destilada. Posteriormente, se le agregó una dilución 1/100 del suero monoclonal anti-ratón conjugado a FITC (SIGMA) y se incubó a 37 °C en cámara húmeda durante 40 min. Luego, los extendidos se lavaron como se detalló anteriormente. Finalmente, se le agregó solución de montaje, se cubrió con portaobjetos y se observó inmediatamente en un microscopio de fluorescencia El Micro es un Nikon Eclipse 80i utilizando un filtro en la longitud de onda del UV con un aumento de 1000x.

Esta técnica fue realizada en el laboratorio de Inmunología de la Estación Experimental del INTA Rafaela y las fotos obtenidas fueron gentileza del Doctor Ignacio Echaide.

7. Análisis proteómico

7. 1. Extracción de proteínas solubles del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina*

7. 1. 1. Lisis de eritrocitos parasitados por *Babesia bigemina*

Se partió de sangre de un ternero Hereford infectado con la cepa de referencia BbiS2P en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela (Santa Fe). Se concentró el paquete de eritrocitos parasitados (PEP) por centrifugación a 1000xg a 4° C durante 20 min. Por cada 11 ml de PEP agregaron 350 ml de buffer Veronal (para preparar 2 ml de solución 5X: 85 g de NaCl, 3,75 g de Barbital Na, 5,75 g de Acido Barbitúrico) que incluyó 7 ml de Hemolisina (1:50). Se incubó a 37° C durante 30 min. Luego, se agregaron 11 ml de complemento de cobayo y se incubó la suspensión a 37° C durante 30 min., agitando a los 15 min, durante algunos segundos. Se homogeneizó la mezcla en agitador con movimiento suave durante 30 min. Se centrifugó a 3000xg durante 25 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se mezcló el sedimento suavemente y se mantuvo en Vym a 4°C hasta su utilización.

Se aplicó el mismo protocolo de lisis para eritrocitos sin infectar utilizados como control de contaminación de proteínas del parásito proteínas del eritrocito que podrían interferir.

7. 1. 2. Purificación de merozoítos de *Babesia bigemina*

Se preparó una solución 1:10 con PBS 10x (1 PBS: 9 Percoll GE). A continuación se diluyó la solución anterior al 50% con PBS 1X y se distribuyó en tubos de microcentrífuga (10-

12 ml). Se agregó el sedimento mencionado en el punto anterior arriba. Luego se centrifugó a 26000 xg durante 30 min a 5°C. Se formó un gradiente que nos permitió aislar la banda grumosa del tercio inferior de la columna de Percoll correspondiente a los merozoítos de *B. bigemina*. Se realizó un lavado con 100 ml PBS 1X para eliminar el Percoll. El sedimento se resuspendió en PBS 1X con inhibidores de proteasas (PMSF de Sigma, TCLK, E-64, Complete EDTA-Free Roche), Se verificó la presencia de merozoítos en la muestra mediante tinción con Giemsa y observación al Microscopio óptico (A= 100X con aceite de inmersión)

Del mismo modo se purificó el sedimento de la lisis de los eritrocitos sin infectar por un gradiente de percoll y se aisló la banda superior del gradiente correspondiente a restos de membrana y otras proteínas del eritrocito.

7. 1. 3. Preparación de muestra para Isoelectroenfoque

Partimos de merozoítos de *Babesia bigemina* previamente aislados con el gradiente de percoll.

A estas muestras les aplicamos los siguientes protocolos con algunas modificaciones para comparar entre métodos de extracción:

Protocolo 1 (Shin y col., 2005)

En primer lugar, se concentró muestra de 5 ml de merozoítos en PBS 1X con sacarosa, llevando la muestra a 2 ml. Luego, se realizó una diálisis en 1L de Tris-base 40mM a 4°C en agitación durante 2horas y luego se le agregó buffer fresco para seguir dializando por 1 hora adicional. La muestra dializada fue conservada a -80 °C.

Posteriormente se produjo la lisis de los parásitos con 2 ciclos de congelado con nitrógeno y descongelado a 30 °C. El lisado fue sonicado a 1 ciclo de 20 s. En este punto se tomó una alícuota para medir concentración de proteínas utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce).

Se le adicionó a la muestra Tiourea 2,2 M (GE) y Urea 7,7M (GE) (ambos agentes caotrópicos que eliminan las interacciones proteína- proteína), CHAPS(GE) 4% m/v (detergente iónico que contribuye a la solubilización de proteínas de membrana), Tritón X-100 0,5% v/v, 1 (detergente), DTT (GE) % m/v (agente reductor de puentes disulfuro), 0,5% v/v IPG buffer pH 3-10 (GE) (aporta los anfolitos), 0.002% m/v azul de bromofenol (Sigma). La muestra se incubó 1 h a 0°C. Se tomó una alícuota para medir concentración de proteínas. No pudimos calcular la

concentración de proteínas en esta muestra debido a la gran interferencia de los componentes de la misma.

Tomamos una alícuota para sembrar en un SDS-PAGE 12% y guardamos la muestra a -80°C para separar sus proteínas por isoelectroenfoque.

Protocolo 2 (Gelhaus y col., 2005)

Se concentraron con sacarosa 3 ml de muestra de merozoítos en PBS 1X, obteniendo un volumen final de 1 ml. Se dializó contra 1L de H₂O durante 1h luego se agregó 1L de H₂O fresca para seguir dializando por 2 horas. Se tomó una alícuota para medir concentración de proteínas. Posteriormente, la muestra fue sonicada (1 ciclo de 20s) y se le agregaron los siguientes reactivos: 2M Tiourea 8M Urea, 4% m/v CHAPS 0.5% v/v Tritón-X100, 40 mM DTT 0.5% v/v, IPG Buffer pH 3-10. Luego, se sonicó la muestra en baño (Branson Ultrasonic) a 18°C durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2000xg durante 15 min a 20°C. El Sobrenadante con proteínas solubles se guardó a -20°C.

Protocolo 3 (protocolo de extracción de proteínas de *Mycobacterium smegmatis*)

Este protocolo fue gentileza de la Microbióloga Gabriela Echeverría y la Licenciada Wendy Xolalpa (Instituto de Biotecnología del INTA Castelar y el Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias de La Universidad Nacional Autónoma de México (comunicación personal))

En este caso la fase purificada con percoll fue lavada y el sedimento fue guardado seco a -80°C. Luego, se determinó el peso húmedo del sedimento y se le agregó 3 ml de Tris Base 40mM con inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, Cocktail complete EDTA –free de Roche, TLCK 0.18 mg/ml, E64 25 µM). La lisis de los parásitos se realizó con 2 ciclos de congelado con N₂ líquido y descongelado (30°C) y luego se sonicó durante 20s (1 vez). Se tomó una alícuota para medir concentración de proteínas y luego se tomaron 10 µg para sembrar en un SDS-PAGE 10%. Se siguió con el protocolo o se conservó a -80°C.

Las proteínas fueron precipitadas de la muestra con TCA- DOC. Se tomó un volumen para 110 µg de proteínas (100 µg + 10% error) para sembrar posteriormente en tira de isoelectroenfoque de 7 cm. Se agregó al volumen de muestra DOC hasta llegar a una concentración final del 0.02% (stock 2%). Se mezcló con vortex e incubó 15 min a TA. Luego, se

agregó TCA 100% hasta llegar al 10% de concentración final. Se mezcló con vortex. E incubó 1h a TA. La muestra se centrifugó durante 10 min. a 13500rpm 4 °C y se descartó el sobrenadante por decantación absorbiendo con papel hasta secar. La muestra se lavó con 200 µl de Acetona enfriada previamente a -20 °C se mezcló con vortex y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó 10 min a 13.500rpm 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se dejó secar 5 min. Se resuspendió en 130 µl de Buffer de Rehidratación (2,2M Tiourea, 7,7M Urea, 4% m/v CHAPS, 0.5% v/v Tritón X-100, 0,002% m/v azul bromofenol). Se guardó la muestra a -80°C cuando no se usó en el momento, mientras que cuando se usó directamente se le agregó en el momento 1% m/v DTT y 0.5% v/v de IPG buffer. Las proteínas en el buffer de rehidratación fueron incubadas 10 min. a TA. La muestra se centrifugó 5 min a 13.500 rpm (o 10.000rpm) a TA. (Para precipitar los complejos insolubles).

El mismo protocolo de extracción fue utilizado para extraer proteínas de eritrocitos sin infectar.

7. 2. Electroforesis en dos dimensiones

Esta técnica separa las proteínas por su punto isoeléctrico (Isoelectroenfoque, primera dimensión) y luego de acuerdo a su peso molecular (SDS-PAGE, segunda dimensión). Como resultado se logra una mayor separación de proteínas del mismo peso molecular pero con distintas características físico-químicas.

7. 2. 1. Separación de proteínas en la primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Se utilizó el sistema de Ettan IPGphor de GE Healthcare

Se rehidrató una tira de 7 cm con 125 µl de muestra. Se colocó la muestra en el recipiente de rehidratación, luego se ubicó la tira con el gel hacia y se cubrió con 1 ml de (GE). Se incubó 16 horas a TA.

Para realizar el IEF se preparó el equipo a 20°C. El colector se recubrió de 110 ml de Immobiline™ DryStrip Cover Fluid. Luego, se humedecieron las almohadillas con 150 µl de agua desionizada.

Una vez rehidratadas las tiras se colocaron en el colector cuidando la orientación de la tira, el lado ácido (+) hacia el ánodo.

Se colocan las almohadillas hidratadas sobre cada extremo de la tira tocando aproximadamente 0.5 cm de gel.

Los electrodos se colocaron sobre las almohadillas de manera que se asurase el contacto entre ellos y con la plataforma de corriente.

El IEF se llevó a cabo con el siguiente programa:

Por pasos	100V	150v/h (para eliminar sales, se puede dejar mas tiempo a 200v/h)
Por pasos	300V	200v/h
Por gradiente	1.000V	300v/h
Por gradiente	5.000V	4.500v/h
Por pasos	5.000V	2.000v/h

La corriente entregada no superó los 50 μ A por tira. Una vez focalizadas las proteínas por diferencias en su punto isoeléctrico se guardaron las tiras a -80°C o se usaron inmediatamente en la segunda dimensión.

7. 2. 2. Separación de las proteínas en la segunda dimensión: SDS-PAGE

Las tiras del IEF fueron equilibradas en Buffer de equilibrado SDS (solución madre: 50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6M Urea; 30% v/v glicerol; 2% m/v SDS; 0,002 m/v azul de bromofenol).

Se realizó un primer equilibrado agregando a 10 ml de Buffer de equilibrado SDS con 100 mg de DTT (GE) a un tubo de 15 ml. Las tiras fueron colocadas en tubos individuales e incubadas por 15 min en agitación suave a TA.

Posteriormente, se realizó un segundo equilibrado agregando a 10 ml de Buffer de equilibrado SDS con 250 mg de Iodoacetamida (GE). Los tubos con las tiras fueron incubados por 15 min en agitación suave a TA.

Se procedió a preparar el gel 10% (MiniProteanIII de BioRad), el hacer el separador al 10% y el concentrador con un peine preparativo

Las tiras equilibradas fueron recortadas de acuerdo al tamaño del peine utilizado. Se procuró que el extremo positivo del gel quedara intacto ya que la mayor parte de las proteínas migran hacia este. Por lo tanto, el extremo negativo se recortó de acuerdo al tamaño necesario. Las tiras fueron colocadas en el pocillo del gel concentrador, ubicando el extremo positivo cercano al marcador de peso molecular de proteína Page Ruler (Fermentas). El programa de corrida fue de 10 mA/gel cuando el frente de corrida llegó al gel separador se subió la corriente a 20 mA/gel hasta el final de la corrida. . Los geles se corrieron poniendo la cuba en hielo.

7. 2. 3. Tinción con Coomassie Coloidal (Giavalisco y col., 2005)

Los geles se fijaron en 50% Etanol, 2% de ácido fosfórico y se incubaron toda la noche en agitación a TA. Luego, se lavó con agua fría 2 veces de 30 min cada una.

Se transfirieron a una solución de 34% metanol, 15% sulfato de amonio y 2% de ácido fosfórico y se incubaron durante 1 hora a TA. Se les agregó 0.250g/250 ml de powdered CBB G-250 (Sigma) y se incubaron en agitación suave a TA por 3 días. Finalmente se destiñeron con agua.

7. 2. 4. Transferencia a membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF)

La membrana fue activada previamente con Metanol durante unos pocos min y luego se colocaron la membrana y el gel en la sandwichera y se realizó la transferencia durante 45 min a 60V

Tinción de las membranas:

Luego de la transferencia, las membranas se secaron al aire y en un recipiente limpio se colocó la solución de Coomassie R-250 (Sigma) (Coomassie R-250 0.1%, Metanol 50% y Acido acético 7%), las membranas se colocaron encima de la solución. Cuando se comenzaron a observar los primeros puntos se sumergieron y se incubaron durante 2 min, en agitación esporádica. Se retiró el colorante y se procedió a desteñir la membrana con la solución decolorante de membranas (Metanol 50% y Acido acético 7%). Se cambió la solución periódicamente hasta observar claramente las proteínas.

Se dejó secar al aire entre acetatos y se escanearon en Image Scanner (GE) entre acetatos. Se marcó la zona teñida, la orientación y el marcador de peso molecular fue cortado.

Finalmente se decoloró totalmente con la solución decolorante de Background (Metanol 90% y Acido acético 10%)

La membrana fue secada al aire y almacenada entre hojas de papel *Whatman* hasta su posterior uso en *Western Blot*.

7. 2. 5. Western Blot

Se llevó a cabo el protocolo detallado anteriormente con sueros bovino positivos para la enfermedad. Uno de ellos fue el suero de la Red de Latinoamérica y el Caribe- FAO (dilución 1/600), proveniente de una infección experimental con un extracto de antígenos solubles de una

cepa venezolana y eritrocitos infectados provenientes del cultivo de una cepa mexicana de *B. bigemina* (Guglielmone y col, 1997), el segundo fue un suero de referencia proveniente de la inoculación de un ternero con antígeno soluble de *B. bigemina* + adyuvante Quil-A (Echaide y col., 1993) (dilución 1/400) y por último se utilizó un suero de un bobino naturalmente infectado en la fase crónica de la enfermedad (Elisa Indirecto positivo para *B. bigemina*) proveniente del NEA (zona donde la enfermedad es enzoótica) (dilución 1/250). Se utilizó como control negativo un suero de un bovino negativo para la babesiosis (dilución 1/100). El revelado se realizó por quimioluminiscencia con el Kit ECL (Pierce)

7. 3. Predicción del punto isoeléctrico y geles virtuales en dos dimensiones

Se predijo la distribución de las proteínas de *B. bovis* anotadas en el NCBI en un gel de dos dimensiones utilizando el programa JVirGel versión 2.0: <http://www.jvirgel.de/> (Hiller y col., 2006). Los puntos isoeléctricos se calcularon con el programa pepstats del servidor EMBOSS (<http://emboss.sourceforge.net/apps/release/5.0/emboss/apps/pepstats.html>). Los gráficos de distribución de frecuencias de proteínas según su punto isoeléctrico y los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Matlab (desarrollado por MathWorks: <http://www.mathworks.es/>)

8. Análisis Bioinformático

8. 1. Búsqueda de secuencias

Se identificaron los genes anotados de *B. bovis* con dominio MACPF anotados con dominio MACPF en la base de datos de genes de referencia (*Refseq*) del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las proteínas anotadas de *B. bovis* se utilizaron para seleccionar aquellos *contigs* del proyecto genoma de *B. bigemina* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/) que presentaban similitud de secuencia con el dominio MACPF, para lo cual se utilizó el algoritmo de búsqueda de secuencias homólogas TBLASTN (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina) seleccionando en opciones avanzadas la matriz Blosum 62 y un valor de E esperado de 0.0001

8. 2. Anotación de los genes

Las secuencias homólogas de los contigs de *B. bigemina* fueron extraídas del archivo “contig260608.fasta” ubicado en el sitio <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Babesia/bigemina/>. Sobre los *contigs* de *B. bigemina* fueron predichos modelos génicos (intrones, exones, señal de TATA, señal de Poly A) y sus secuencias codificantes con dos herramientas que utilizan modelos ocultos de Markov: fgenesh (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) entrenado con *P. falciparum* y Glimmer HMM (Shmatkov y col., 1999) entrenado con los genes anotados manualmente de *B. bovis*. Además, sobre las secuencias codificantes, se predijo el péptido señal utilizando el algoritmo SignalP 3.0:<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (Bendtsen y col., 2004). Asimismo se buscó el dominio MACPF a través de SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/> (Shultz y col., 1998 y Letunic y col., 2009)

A partir de la predicción arrojada por fgenesh y Glimmer HMM, teniendo en cuenta la presencia del péptido señal predicho por Signal P y de la secuencia del dominio MACPF entera, se realizó un consenso de la estructura de cada gen y se lo anotó utilizando la herramienta Artemis (Rutherford y col., 2000).

Asimismo, la herramienta de genómica comparativa Artemis Comparisson Tools (ACT) (Carver y col., 2008), fue utilizada para incorporar y refinar los modelos génicos en *B. bigemina*, según sus homólogos anotados en el genoma de *B bovis*.

El trabajo de anotación fue realizado en colaboración con la Lic. Natalia Rego y el Dr. Hugo Naya de la Unidad de Bioinformática del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

8. 3. Alineamientos de secuencias

Los alineamientos utilizados para demostrar homología entre los dominios MACPF se realizaron con la herramienta de alineamiento múltiple Clustal W2.0.9 (Larkin y col., 2007) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) del servidor ExpASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>).

8. 4. Predicción de estructura secundaria y terciaria de las proteínas

La estructura secundaria de las secuencias de las proteínas con dominio MACPF fue predicha con el programa Jpred 3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) desarrollado por Cole y colaboradores (2008).

Los residuos aminoacídicos conservados por sus propiedades fisicoquímicas fueron extraídos del resultado del alineamiento por ClustaW2.0.9 observado en el modo Jalview.

Para modelar la estructura terciaria de la BbiPLPA y BbiPLPB por homología a una estructura cristalizada se realizó una búsqueda del dominio MACPF con el servidor ProDom: <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php> (Bru y col., 2005).

Para la identificación de los posibles templados de estructura conocida se realizó una búsqueda utilizando el algoritmo Psi- BLAST (**P**osition-**S**pecific **I**terated **B**LAST) utilizando como entrada la secuencia de los dominios MACPF identificados por ProDom con un valor esperado umbral E de 0,0001. Por otro lado, se realizó una búsqueda de posibles templados servidor FFAS03: <http://ffas.ljcrf.edu/ffas-cgi/cgi/ffas.pl> (Jaroszewski y col., 2005) estableciendo como valor significativo de la predicción aquellos valores menores – 9.5).

Se le asignó un plegamiento a los dominios MACPF de *B. bigemina* utilizando el servidor PHYRE (**P**rotein **H**omology/analog**Y** **R**ecognition **E**ngine): <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/> (Kelley y col., 2.009).

Utilizando el templado hallado en el punto anterior (Código de acceso de PDB: 2QQH) se extrajo la estructura tridimensional y secuencia depositada en la RCSB PDB (**P**rotein **D**ata **B**ank) Con el archivo correspondiente a la estructura tridimensional y el alineamiento secuencial entre el templados y los dominios MACPF de *B. bigemina* realizamos el modelado por homología de la estructura tridimensional de los dominios MACPF de BbiPLPA y BbiPLPB utilizando el servidor TITO: http://bioserv.cbs.cnrs.fr/HTML_BIO/frame_tito.htm y el programa MODELLER (copyright © 1989-2010 Andrej Sali, UCSF). La visualización de las estructuras terciarias predichas fue realizada con el programa PyMOL (Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC).

La validación de los modelos de estructura tridimensional obtenidos se realizó por medio de un análisis de superposición espacial de residuos entre estos y el templado. El programa utilizado con tal fin fue el 3d-SS (**3**- **D**imensional **S**tructural **S**uperposition): <http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/options.html> (Sumathi y col., 2006). Para medir la similitud entre las dos estructuras rígidas superpuestas se utilizó la función residual RMSD (raíz cuadrada de la media de la desviación al cuadrado) (Figura 2).

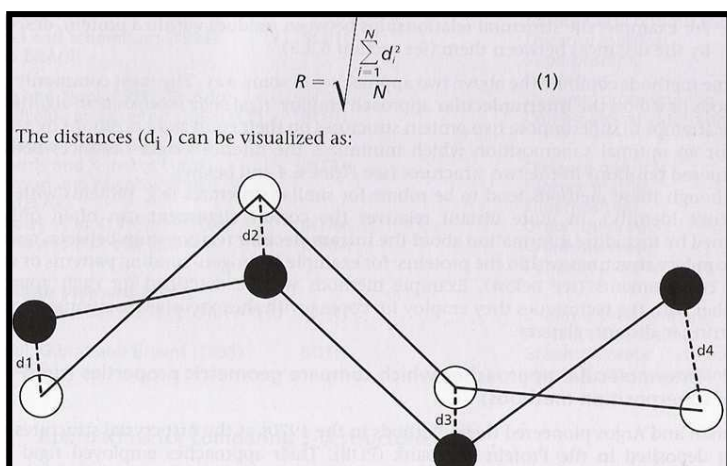


Figura 2. Ecuación para el cálculo del RMSD y esquematización de la distancia entre átomos iguales de las estructuras tridimensionales superpuestas.

8. 5. Identificación y caracterización molecular de secuencias repetitivas

Las repeticiones en las secuencias de los genes de *plps* de *B. bigemina* y *B. bovis* fueron halladas utilizando el programa Tandem repeat Finder: <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html> (Benson, 1999) y XSTREAM: <http://jimcooperlab.mcdb.ucsb.edu/xstream/> (Newman y col., 2007)

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones repetitivas de cada uno de los genes: *Bbiplpa* y *Bboplpa* (Tabla 15).

Nombre	Secuencia	Tamaño	TM (°C)	%G C	Horquilla (Hairpin)	Tamaño de producto esperado
PerfBig_for	5'-GGGCTAGAGAATAACGGCGC-3'	20 pb	58,2	60 %	TM= 18,6°C	1012pb
PerfBig_Rev	5'-CGGTAGGACTACTGCTTTCAGC-3'	22pb	57,3	54.5 %	TM= 38,1°C	
Bbopl1rpt_Fnew	5'-AGAAAGGTCACACTCCGATGCT-3'	22pb	58,3	50 %	TM= 22,1°C	1167pb
Bbopl2rpt_Rnew	5'-CGACACTTGCTCTATAACCCGG-3'	22pb	57.4	50 %	TM= 5,4°C	

Tabla 15. Secuencia y características de los oligonucleótidos para amplificar las regiones repetitivas de *Bbiplpa* y *Bboplpa*.

La reacción se llevó a cabo según fue descrito anteriormente. Los templados utilizados fueron ADN genómico las cepas BbiS2P, BbiS1A, BbiM1P, BbiM1A, BbiM2P, BbiMx, BbiBr1P, BboM1A, BboM2P, BboBr1P, BboUy1P, BboR1A. Asimismo se utilizó DNA genómico de muestras de sangre de bovinos de campo del NOA y NEA para analizar la secuencia

repetitiva en *B. bigemina*. Los controles negativos de cada PCR fueron realizados agregando agua a la mezcla de reacción. Las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 16.

Temperatura	Tiempo
94°C	3 min
94°C	30 s
57°C/59°C <i>Bbiplpa/Bboplpa</i>	30 s
72°C	1 min
40 ciclos	
72°C	10 min

Tabla 16. Programa de ciclos para amplificar las regiones repetitivas de los genes *Bbiplpa* y *Bboplpa*.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1,5 % y teñidos con Bromuro de Etidio para su visualización. Además, cada producto fue purificado de la reacción de PCR utilizando el kit de extracción QIAquick (QIAGEN) y eluidos de las columnas con 30 ul de agua libre de enzimas que degradan el ADN. Los eluatos fueron sembrados en gel de agarosa para verificar su calidad y se midieron las muestras en el NanoDrop® (ND- 1000 Spectrophotometer) para determinar la concentración de los fragmentos.

Los fragmentos fueron secuenciados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

Las secuencias resultantes y los cromatogramas fueron analizados utilizando el programa BioEdit (copyright © 1997- 2005, Tomm Hall). Las secuencias de nucleótidos fueron traducidas a aminoácidos mediante la herramienta de traducción del Expasy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>).

8. 6. Análisis filogenético

Para realizar el análisis evolutivo de la familia de las perforinas en Apicomplexa, las secuencias de aminoácidos de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium yoelii* fueron buscadas en la base de datos de genomas anotados de patógenos eucariotas: Eupath DB (<http://eupathdb.org/eupathdb/>) teniendo en cuenta los números de acceso publicados en el

trabajo de Kaiser y colaboradores en el 2004. Por otro lado, en el caso de las secuencias de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* fueron extraídas del banco de genes del NCBI.

Asimismo, las secuencias con dominio MACPF de *Theileria annulata* y *T. parva* fueron identificadas por medio de una búsqueda de homólogos a las PLPs de *B. bovis* y *B. bigemina* utilizando el algoritmo BLASTP del NCBI.

Se identificaron 42 proteínas del tipo perforina en los apicomplejos estudiados y cuatro en *T. gondii* y *N. caninum*, que fueron usadas como grupo externo. Dado el nivel de divergencia en estas secuencias proteicas, solo los dominios MACPF fueron alineados. En extremo divergente fue la perforina Ncplp3 de *N. caninum*, por lo que fue eliminada del grupo externo

Estas secuencias fueron alineadas con el programa DIALING: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/> (Subramanian y col., 2008) utilizando los parámetros por defecto, resultando en un alineamiento de 429 posiciones. Para filtrar los *gaps* se utilizó el TrimAl: <http://trimal.cgenomics.org> (Capella-Gutierrez y col., 2009) con la opción *automated1*, que resulto en un alineamiento final de 184 posiciones por cada una de las 46 secuencias.

Utilizando el programa Modelgenerator: <http://bioinf.may.ie/software/modelgenerator/> (Keane y col., 2006) se ajusto un modelo de evolución según el criterio de AIC2: WAG+I+G (con 4 categorías en la distribución gamma) y el árbol se construyó con PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003) utilizando el modelo de evolución WAG+I+G con una búsqueda exhaustiva: lo mejor de SPR y NNI, partiendo de 5 árboles aleatorios. Durante la búsqueda se optimizó la topología y el largo de las ramas. Como medida de apoyo a los nodos se utilizo el método SH-LRT.

El análisis filogenético fue realizado en colaboración con la Lic. Natalia Rego y el Dr. Héctor Romero (Sección de Biomatemática, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay)

Resultados

Objetivo 1. Desarrollo de un método de detección molecular de *B. bigemina* sensible y reproducible a partir de la información genómica disponible.

1. 1. Identificación del gen *rap-1a* de *B. bigemina*

La familia de genes *rap-1* codifica para proteínas que se localizan en las roptrias de *Babesia bigemina*. Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas principalmente como candidatas para el desarrollo de vacunas contra la babesiosis bovina (Brown y col., 1998; Brown y col., 1999). La organización de los genes *rap-1a* ha sido reportada previamente en la cepa clonada JG-29 de *B. bigemina* (Hötzel y col., 1997). Existen cuatro variantes de genes *rap-1a* distribuidas en cinco copias en tándem en el locus *rap-1*. Las cuatro variantes del gen: *rap-1a- α 1*, *rap-1a- β 1*, *rap-1a- β 2* y *rap-1a- β 3* poseen una región central conservada (Suarez y col., 2004). Con el objetivo de establecer la localización de la región conservada en el gen *rap-1a* fueron analizadas todas las secuencias anotadas de las variantes del mismo en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Esta base de datos es redundante y no está curada debido a que la anotación del genoma aún no se ha finalizado. En consecuencia, se hallaron 28 secuencias de las variantes de *rap-1a* correspondientes a *rap-1a- α 1*, *rap-1a- β 2* y *rap-1a- β 3* pero no a *rap-1a- β 1* y se seleccionaron secuencias teniendo en cuenta aquellas que poseían un mayor tamaño pertenecientes a la misma cepa de referencia de *B. bigemina* (Tabla 1).

Número de acceso al NCBI	Descripción	Tamaño (pb)
AF017295.1	<i>Babesia bigemina</i> strain CGA RAP1 beta-3 (RAP-1 beta-3) gene, partial cds	1016
AF017293.1	<i>Babesia bigemina</i> strain CGA RAP1 beta-2 (RAP-1 beta-2) gene, partial cds.	1085
AF017284.1	<i>Babesia bigemina</i> strain CGA RAP-1 alpha-1 (RAP-1 alpha-1) gene, partial cds.	1051

Tabla 1. Secuencias de nucleótidos correspondientes a tres de las tres variantes del gen *rap-1a*: *rap-1a- α 1*, *rap-1a- β 2* y *rap-1a- β 3* seleccionadas para su análisis.

Las secuencias correspondientes a tres de las variantes del gen fueron alineadas con el algoritmo ClustalW (EMBL-EBI, Exspasy proteomics Server). El alineamiento múltiple permitió identificar la presencia de una región conservada en su totalidad que se extiende desde el inicio del marco abierto de lectura hasta la posición 618 (Figura 1A).

A

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	TTGCGATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTTACTACAAGACTTACCT	50
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	TTGCGATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTTACTACAAGACTTACCT	50
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	TTGCGATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTTACTACAAGACTTACCT	50

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	GACCGTTGACTTTACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTACAA	100
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	GACCGTTGACTTTACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTACAA	100
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	GACCGTTGACTTTACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTACAA	100

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	CTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAAGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGG	150
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	CTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAAGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGG	150
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	CTCGCCTGTTTCGGTTTCGGTATCCAGAAAGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGG	150

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	AGCAACCTTCCCGTTGACCTTGAACCCACCCTGAGGCCACCAATCCGCGA	200
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	AGCAACCTTCCCGTTGACCTTGAACCCACCCTGAGGCCACCAATCCGCGA	200
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	AGCAACCTTCCCGTTGACCTTGAACCCACCCTGAGGCCACCAATCCGCGA	200

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	AATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCGATGA	250
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	AATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCGATGA	250
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	AATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCTGCGATGA	250

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	CCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTT	300
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	CCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTT	300
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	CCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTT	300

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	ACCGTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA	350
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	ACCGTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA	350
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	ACCGTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAA	350

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	GTTCAAGGAGTTCAATTTGTAAGTCTTTACTGACCCCTGCCAAGTTGATTA	400
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	GTTCAAGGAGTTCAATTTGTAAGTCTTTACTGACCCCTGCCAAGTTGATTA	400
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	GTTCAAGGAGTTCAATTTGTAAGTCTTTACTGACCCCTGCCAAGTTGATTA	400

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	TGAAGCAGCTCTCTCAGCCTGTAAAGACTGCCTACACAAGCTGGTCCCT	450
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	TGAAGCAGCTCTCTCAGCCTGTAAAGACTGCCTACACAAGCTGGTCCCT	450
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	TGAAGCAGCTCTCTCAGCCTGTAAAGACTGCCTACACAAGCTGGTCCCT	450

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	GAAAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTCGGTCAAAGCACAAGCA	500
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	GAAAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTCGGTCAAAGCACAAGCA	500
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	GAAAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTCGGTCAAAGCACAAGCA	500

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	TATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAAGGAGCCTAGCC	550
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	TATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAAGGAGCCTAGCC	550
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	TATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAAGGAGCCTAGCC	550

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	AACAAATAATTTCGTGAGAAAGCTGCCTCCTACTACCTTTCTAAGGCAAGGGA	600
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	AACAAATAATTTCGTGAGAAAGCTGCCTCCTACTACCTTTCTAAGGCAAGGGA	600
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	AACAAATAATTTCGTGAGAAAGCTGCCTCCTACTACCTTTCTAAGGCAAGGGA	600

gi		10197519		gb		AF017295.1		AF01	GCCGTTGAGCAGTGTGTTGACAAAGGTTAAATCAAAAATTTAAAGAAGCG	650
gi		10197515		gb		AF017293.1		AF01	GCCGTTGAGCAGTGTGTTGACAAAGGTTAAATCAAAAATTTAAAGAAGCG	650
gi		10197497		gb		AF017284.1		AF01	GCCGTTGAGCAGTGTGTTAAGAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCA	650

gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	TGCTGGTGAATCATCGGAAGAAATCATACAGCGATTCCGAAAGAAATTC	700
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	TGCTGGTGAATCATCGGAAGAAATCATACAGCGATTCCGAAAGAAATTC	700
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	AAAGGGCGACCAACCATCCGAA-----GCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCCG	696
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	TCAAGGAATCACAATACAATTTCAGATCGCGAAAAATGATGAGGACTCATCC	750
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	TCAAGGAATCACAATACAATCCAGCA---AAGAGTGTTCGGGATCAGCT	747
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	TCTGGCGATTCCCGGAAACTGAATT--TGAGGTCCTGAAGAACAAATAC	744
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	GACGAGTCAGCATATGAACTGCTCCGGAACTACTAGACTAATCGGTTAA	800
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	GATAAGGATGAATAT----CTG-----TACGCAGATTGG----	777
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	GTCGATGCTGTTACT---ACTG-----AGGGGGTTAACAGC--GA	779
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	AAAAGGCCATGCGATGATCGCATTTGTATGCAATTGAATGTTAAGCAAAAG	850
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	-AAAG---ATGCA-----GCTCTTTAT-----AAAAAG	801
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	GAAAGTTGATGCC---GACGATGCGGGTA-----ATGCCG	811
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	TATTACAACAGTTTACATAAECTCTACCGATATAATGAACAATAAGACTAA	900
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	TAT--AACTGGGTAGATGGTGTGGGCTACGAAATAAAGGAC--GACGAA	846
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	AAACCCAGCAGCTTCCA-GATGCAGAAAATGAAGTGCGCGCT--GATGAC	858
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	TGCTGACAAAATAACACGTTGATACAACAACATTTTGTACGTAAATAGTTA	950
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	TA-----AAATAACAAAGCATCGCATCATTATGCTGAAAAATTGTAGTT-	890
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	CCC--AAAATGAAGATTTCTTCAAGTTCTTCAGATGATTAGATGCGTAA	906
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	CGACTGCATCA-TACAAAATTCACGCTGCTACTGTGAAATAATCGCCAT	999
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	---CTACTTAA-TCAAAAATGCACCAATGCCTTCTTTATA---TCGCAAG	933
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	CAGCAATTTAGCTGTACATTTTCGATAGTGTGTGCTGCAATAATCGCCAT	956
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	ATAACAATTTTGAATGCCTAATCCCATCGTTTTTTTACTTTTATGTTGGT	1049
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	TTCGCA---TTATATATCTAATCTCCATCGTTTTTTTACTTTTATGTTGGT	980
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	ATAACAATTTCGAATGCCTAATCTCCATCGTTTTTTTACTTTTATGTTGGT	1006
					* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi	10197519	gb	AF017295.1	AF01	CAGGTGTTTCATATTTGCCAAGGCAC-----	1074
gi	10197515	gb	AF017293.1	AF01	CAGGTGTTTCATATTTGCCAAGGCACCGTGGTGAGAT	1016
gi	10197497	gb	AF017284.1	AF01	CAGGTGTTTCATATTTGCCAAGGCACCGTGGTGAGAT	1042
					* * * * * * * * * * * * * * * *	

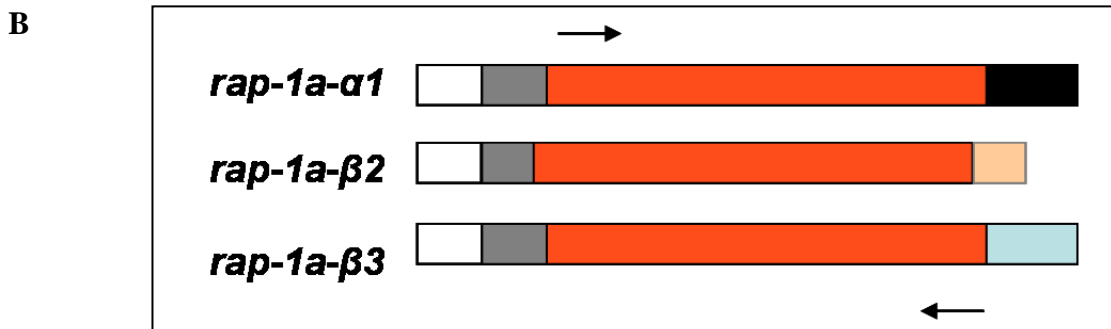


Figura 1.A. Alineamiento múltiple de las tres variantes del gen *rap1-a* (*rap-1a- α1*; *rap-1a- β2* y *rap-1a- β3*). Se indica la posición de los oligonucleótidos específicos Bbi400F (flecha hacia la derecha) y Bbi400R (flecha hacia la izquierda); **B.** Esquema de las tres variantes del gen *rap-1a* utilizadas en este trabajo: *α1*, *β1*, *β2* y *β3*. En rojo: región conservada en las tres variantes del gen. Las flechas representan los oligonucleótidos específicos para la amplificación de un producto de PCR idéntico de 412 pb de la región conservada.

1. 2. Desarrollo de PCR en un solo paso para la detección de *B. bigemina*

Utilizando la secuencia conservada en los tres genes mencionados en el punto anterior se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 412 pb. El análisis con la herramienta *Oligo Analyzer 3.1* del servidor IDT (*Integrated DNA Technologies*) demostraron la baja capacidad de los oligonucleótidos de formar horquillas, lo cual dificultaría la disponibilidad para la reacción deseada (Tabla 2).

Nombre	Secuencia	Tamaño	TM	%GC	Hairpin
Bbig400f	5- AGCTTGCTTTCACAACCTGCCT- 3'	22 pb	59.7 °C	50 %	$\Delta G = 0.28 \text{ Kcal. mole}^{-1}$ $TM = 19.5^\circ\text{C}$ $\Delta H = -15.9 \text{ Kcal. mole}^{-1}$ $\Delta S = -54.3 \text{ cal. K}^{-1} \text{ mole}^{-1}$
Bbig400r	5'- TTGGTGCTTTGACCGACGACAT- 3'	22pb	59.4°C	50 %	$\Delta G = -0.33 \text{ Kcal. mole}^{-1}$ $TM = 28.5^\circ\text{C}$ $\Delta H = -26 \text{ Kcal. mole}^{-1}$ $\Delta S = -86.2 \text{ cal. K}^{-1} \text{ mole}^{-1}$

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la zona conservada de las cuatro variantes del gen *rap-1a*.

A continuación, se optimizó la temperatura de hibridación (TA) de los oligonucleótidos realizando la amplificación del fragmento específico en un rango de temperatura de hibridación entre 55 °C y 60°C. La temperatura para la cual se observó un producto específico del tamaño esperado y con mayor cantidad de producto fue 58°C (Figura 2). En consecuencia, esta temperatura se seleccionó como temperatura óptima de hibridación.

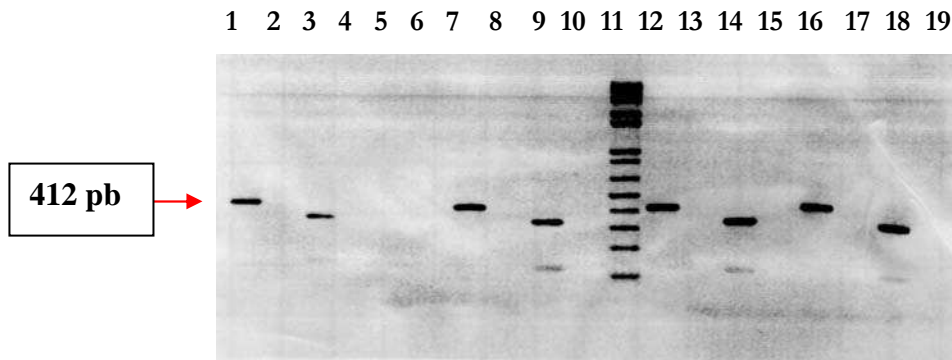


Figura 2. Optimización de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. TA 55°C= 1: BbiM1P; 2: BboM2P (oligonucleótidos *rap1a*); 3: BboM2P (oligonucleótidos control Bbo); 4: BbiM1P (oligonucleótidos control Bbo); 5: control negativo (oligonucleótidos *rap1a*); 6: control negativo (oligonucleótidos control Bbo). TA 57°C= 7: BbiM1P; 8: BboM2P (oligonucleótidos *rap1a*); 9: BboM2P (oligonucleótidos control Bbo); 10: BboM2P BbiM1P (oligonucleótidos control Bbo); 11: Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). TA 58°C= 12: BbiM1P; 13: BboM2P (oligonucleótidos *rap1a*); 14: BboM2P (oligonucleótidos control Bbo); 15: BbiM1P (oligonucleótidos control Bbo). TA 60°C= 16: BbiM1P; 17: BboM2P (oligonucleótidos *rap1a*); 18: BboM2P (oligonucleótidos control Bbo); 19: BbiM1P (oligonucleótidos control Bbo).

Con el fin de demostrar la especificidad de los oligonucleótidos para la detección de *B. bigemina* se realizó un ensayo de PCR utilizando como templado ADN de seis cepas de referencia de *B. bigemina* en paralelo con ADN de muestras de *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, y de sangre periférica de bovino (*Bos taurus*). Esta última fue incluida debido a que la muestra de ADN templado incluye ADN del hospedador, en este caso el bovino. La región constante del gen *rap-1a* pudo ser amplificada en todos los aislamientos de *B. bigemina* (Figura 3A), mientras que no se observó producto en aislamientos de *B. bovis*, *A. marginale* y *A. centrale*, demostrando la especificidad de los oligonucleótidos en la detección de este gen específico de *B. bigemina*.

Por otro lado, se evaluó el límite de detección de los oligonucleótidos en la reacción de PCR a partir de ADN extraído de muestras correspondientes a una curva de diluciones seriadas al décimo de sangre infectada con *B. bigemina* de parasitemia conocida (2% de Glóbulos rojos infectados) pudiendo detectar hasta 0,00002% de eritrocitos infectados (Figura 3B). Este porcentaje de parasitemia resulta indetectable al microscopio óptico y pesar de que otros métodos de detección molecular de *B. bigemina* detectan dos órdenes menos de

eritrocitos infectados estos involucran más de un paso de amplificación y/o detección del producto específico mediante la hibridización con sondas marcadas con radioisótopos. De esta manera, el diseño de la estrategia de PCR propuesta en el presente trabajo permite la detección del parásito con una mayor sensibilidad a la detección directa mediante observación de frotis de sangre infectada en microscopio óptico (método de referencia hasta el presente). La detección del parásito utilizando una PCR en un solo paso disminuye los tiempos y costos de detección lo cual resulta conveniente para su aplicación en el diagnóstico de rutina de la babesiosis causada por *B. bigemina*.

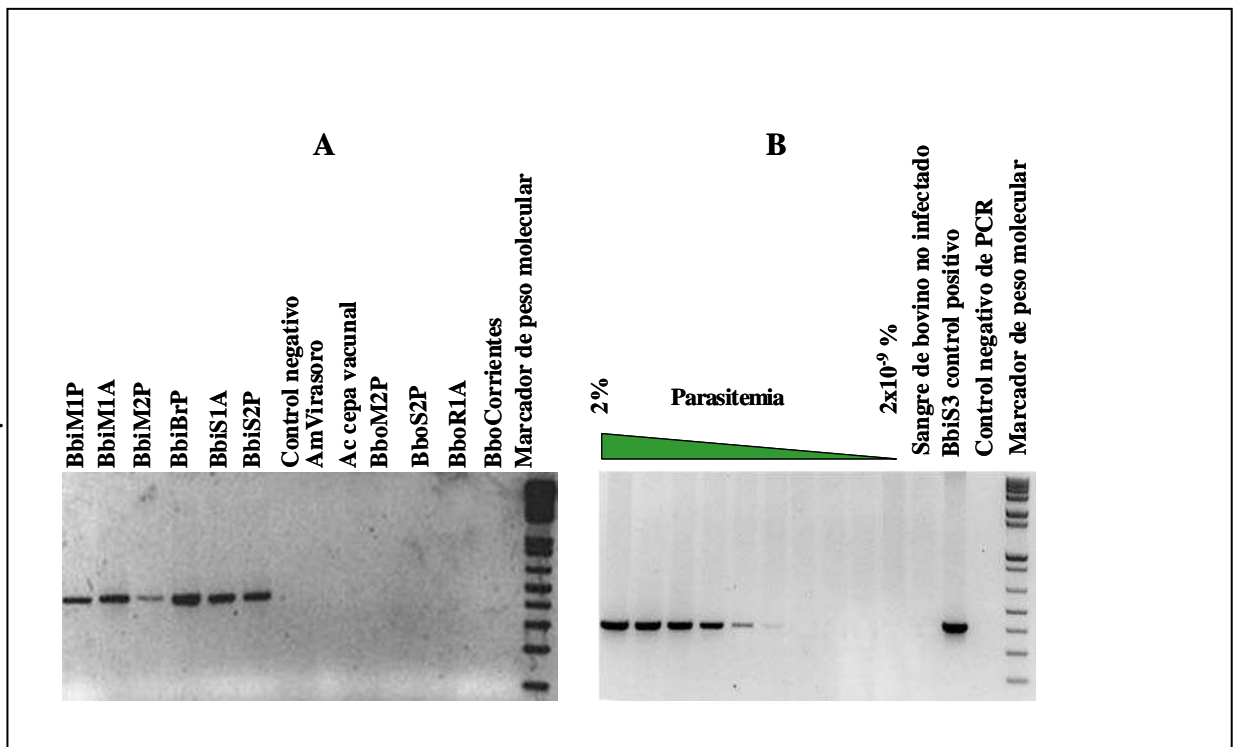


Figura 3. A. Especificidad de la PCR para distintos aislamientos de *Babesia bigemina* (Bbi), *B. bovis* (Bbo), *Anaplasma marginale* (Am) y *A. centrale* (Ac). **B.** Límite de detección de la técnica utilizando diluciones seriadas al décimo de una muestra de sangre con una parasitemia del 2%.

Esta técnica resultó ser una herramienta útil y efectiva para detectar la presencia de *B. bigemina* en muestras de distinto origen tales como sangre de bovinos infectados natural o experimentalmente y garrapatas en los diferentes estadios de su ciclo evolutivo.

Para validar y establecer la robustez de este método de detección de *B. bigemina*, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y el laboratorio

de la Estación Experimental del INTA Rafaela (Santa Fe). Con este propósito, fueron evaluadas 34 muestras de sangre de animales de rodeos del Noroeste argentino (NOA) (Figura 4). Se detectaron 19 muestras positivas para *B. bigemina* y 14 negativas. Una de de las 34 muestras de campo fue detectada solo en nuestro laboratorio obteniéndose un 97% de correlación en los resultados (Tabla 3). Asimismo, el análisis de los datos obtenidos en ambos laboratorios arrojó una “muy buena” concordancia de los resultados con un valor de índice *kappa* de 0,94 (Figura 5). El resultado de esta validación demostró que este método de detección del parásito es robusto independientemente de las variables inherentes al manejo de cada laboratorio. Esto permite plantear su potencial uso como método de diagnóstico de la presencia del parásito en una determinada muestra.

A

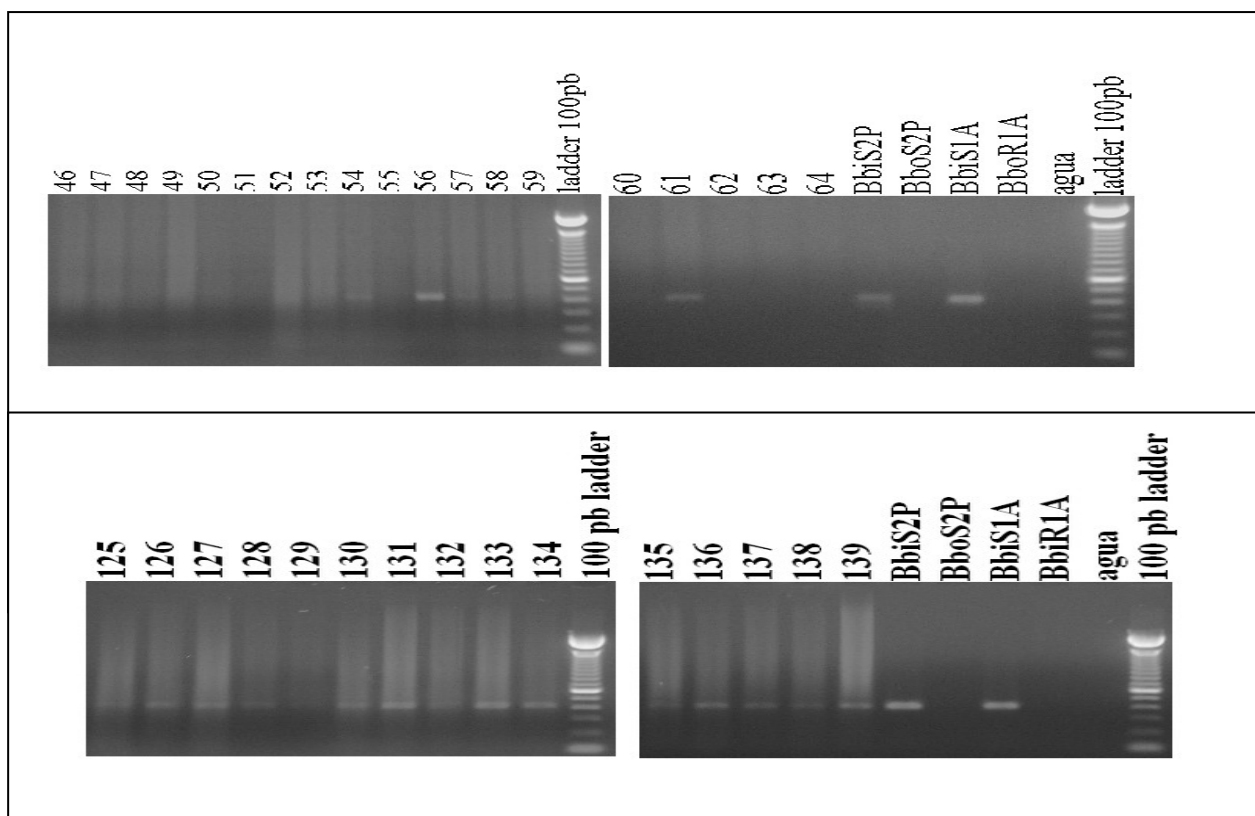


Figura 4. Resultado de la amplificación de *rap-1a* en el laboratorio de Rafaela,

Muestra NOA 05-0151	Resultados Castelar	Resultados Rafaela
46	N	N
47	N	N
48	N	N
49	N	N
50	N	N
51	N	N
52	P	N
53	N	N
54	PT	PT
55	N	N
56	P	P
57	PT	PT
58	PT	PT
59	N	N
60	N	N
61	PT	PT
62	N	N
63	N	N
64	N	N
125	PT	PT
126	P	P
127	P	P
128	PT	PT
129	PT	PT
130	P	P
131	P	P
132	P	P
133	P	P
134	P	P
135	P	P
136	P	P
137	P	P
138	P	P
139	P	P

Tabla 3. Comparación de resultados de los dos laboratorios. En rojo el único resultado discordante. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de bovinos de 18 meses de establecimientos del Noroeste Argentino (protocolo 05-0151). N: Negativo; P: Positivo.

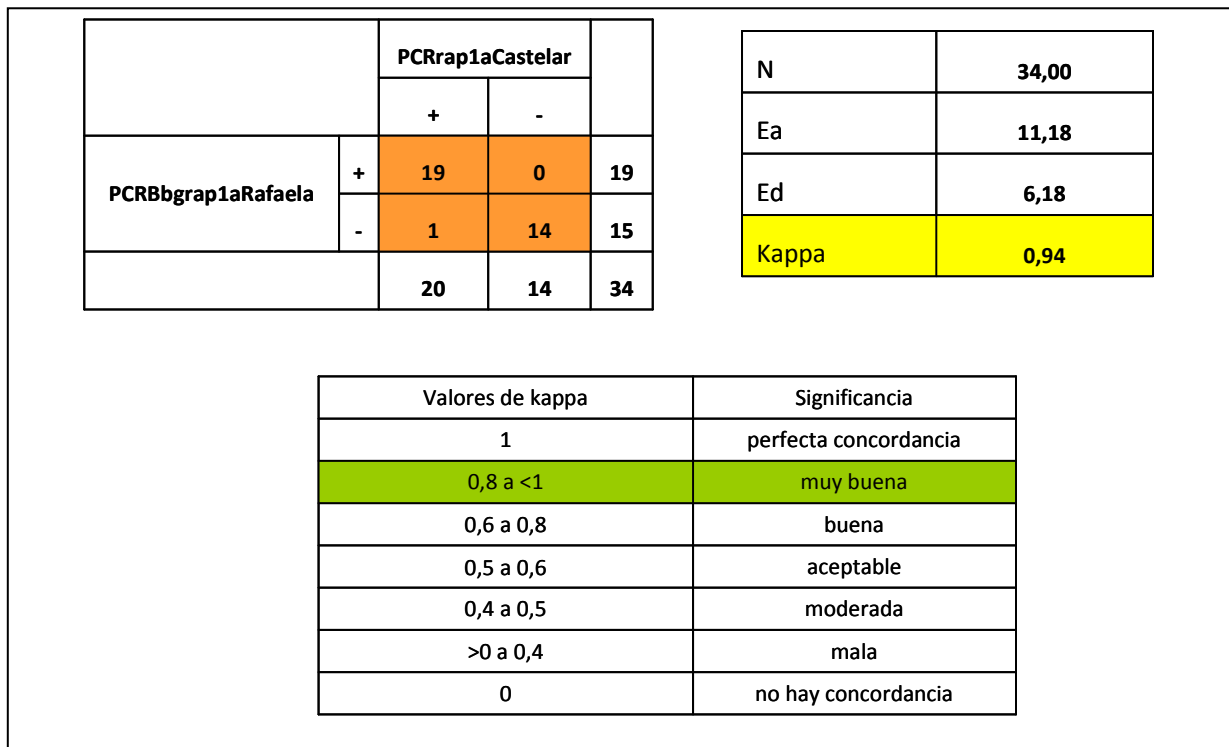


Figura 5. Análisis de concordancia (cálculo del índice *kappa*) entre los resultados de la PCR realizada en Castelar y en Rafaela.

La optimización de esta técnica y la aplicación en la detección de *B. bigemina* en muestras de animales crónicos con parasitemias indetectables al microscopio óptico, representa una valiosa herramienta para estudiar las tasas de infección por estos parásitos en áreas enzoóticas. Adicionalmente, la sencillez del método permite que este pueda ser utilizado ampliamente en laboratorios de diagnóstico veterinario. Asimismo, este método fue un complemento fundamental para detectar la presencia de *B. bigemina* en todas las muestras utilizadas en el presente trabajo de tesis.

Los resultados presentados en este objetivo fueron publicados en la revista *Annals of the New York Academy of Sciences* (Petrih y col., 2008).

Objetivo 2. Identificación de antígenos de *B. bigemina*

2. 1. Proteómica: separación en dos dimensiones de extractos proteicos del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* para la detección de antígenos inmunoreactivos utilizando sueros de bovinos infectados.

Hasta el momento no existen antecedentes reportados de identificación de antígenos de *Babesia spp* a través de un abordaje proteómico. Si bien la búsqueda de antígenos a través de este análisis resulta más laboriosa debido a que implica la optimización de la extracción de proteínas del parásito, la separación de las mismas en geles de dos dimensiones y la inmunodetección de antígenos utilizando sueros bovinos reactivos a las proteínas del parásito, nos permite disponer del proteoma completo del estadio del parásito en estudio y seleccionar al mismo tiempo varios antígenos candidatos que en estudios futuros podrán ser evaluados como candidatos vacunales o para su uso en métodos de diagnóstico de la babesiosis bovina.

2. 1. 1. Optimización de la purificación de proteínas totales de merozoítos de la cepa de referencia BbiS2P

La purificación de los parásitos a partir de sangre de un bovino infectado por medio de la lisis del eritrocito resulta dificultosa debido a que los merozoítos están fuertemente unidos a la membrana del eritrocito, disminuyendo notablemente el rendimiento de las fracciones puras del parásito (Bösse y col., 1995). En consecuencia, teniendo en cuenta esta dificultad fue necesaria la implementación de protocolos de extracción de proteínas totales de alto rendimiento.

En este trabajo se compararon tres protocolos de extracción de proteínas solubles que se diferenciaron en cuanto al rendimiento luego de la purificación y a la calidad de la separación de las proteínas en dos dimensiones.

Los protocolos aplicados en este estudio fueron descritos previamente para la extracción de proteínas de otros parásitos del phylum Apicomplexa: *Neospora caninum* (Shin y col., 2005) (Protocolo 1) y *Plasmodium falciparum* (Gelhaus y col., 2005) (Protocolo 2). El tercer protocolo fue adaptado a partir del procedimiento puesto a punto para la extracción de proteínas de *Mycobacterium smegmatis*, desarrollado por Gabriela Echeverría y Wendy Xolalpa del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar y el Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias de La Universidad Nacional Autónoma de México (comunicación personal)

Según lo observado en la figura 6, se verificó que el rendimiento del protocolo correspondiente a *Neospora caninum* fue superior en comparación con el de *Plasmodium falciparum* (4 mg/ml de proteínas totales versus 2,7 mg/ml respectivamente)

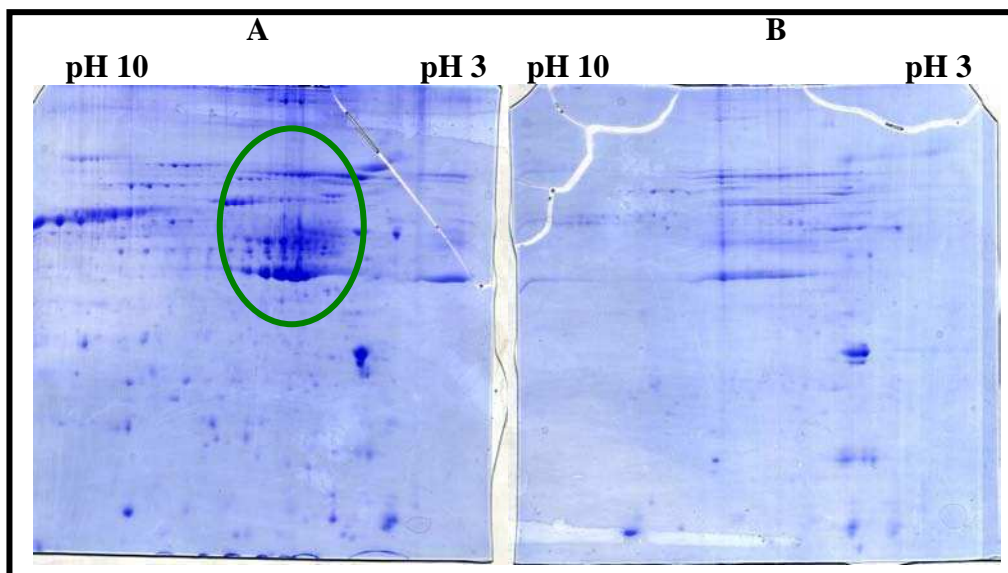


Figura 6. Comparación de protocolos 1 y 2 en geles 2D. **A** Protocolo de extracción 1 **B**. Protocolo de extracción 2. pH 3-10.

No obstante, las muestras preparadas por los protocolo 1 y 2 no fueron separadas eficientemente, además el grupo de proteínas señalado en la figura 8 no fue resuelto totalmente. En consecuencia se decidió adaptar el protocolo desarrollado para *Mycobacterium paratuberculosis*, en este caso utilizando un rango de pI de 4-7. La utilización del protocolo 3 nos permitió optimizar la extracción de proteínas solubles y la corrida electroforética en dos dimensiones pudiendo separar las proteínas de merozoítos de *B. bigemina* por su punto isoeléctrico y masa de una manera más eficiente (Figura 7).

Los resultados de la comparación entre el gel en el cual se separaron las proteínas totales de *B. bigemina* con el gel en que se separaron las proteínas totales de eritrocitos sin infectar, nos permitieron corroborar la inexistencia de contaminación de proteínas del eritrocito en las preparaciones de proteínas del parásito demostrando la eficiencia de los protocolos de purificación de merozoítos a partir de eritrocitos infectados.

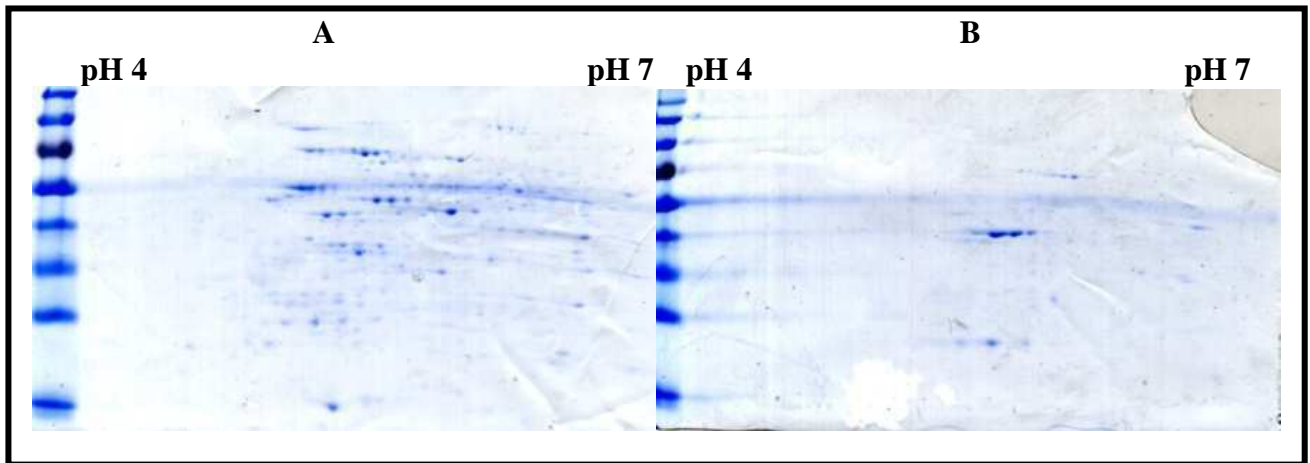
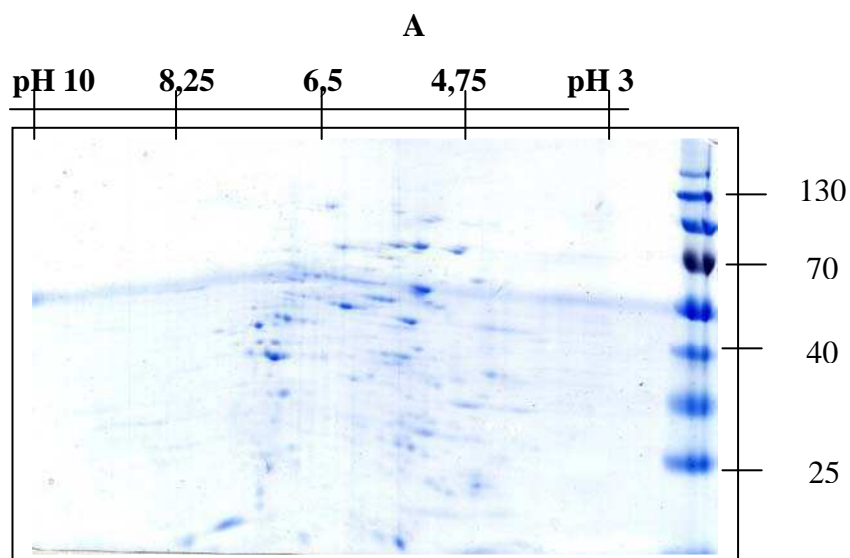


Figura 7. Gel en 2D teñido. IEF: tiras de 7 cm, rango de pH 4-7 y SDS- PAGE 10%, **A.** Proteínas de merozoítos de BbiS2P, **B.** Proteínas solubles de eritrocitos no infectados

2. 1. 2. Detección de antígenos inmunoreactivos a un suero bovino infectado con *B. bigemina*

Para identificar antígenos del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* en todo el rango de puntos isoeléctricos, se realizó el isoelectroenfoque en un rango de pH de 3 a 10 (Figura 8A) con el protocolo 3. Se realizaron dos gels por duplicado uno de ellos fue utilizado para la transferencia a la membrana PVDF (Figura 8B). En la membrana con las proteínas transferidas se observaron menos puntos que en el gel teñido con Coomassie coloidal debido a que la tinción de la membrana con Coomassie R es menos sensible.



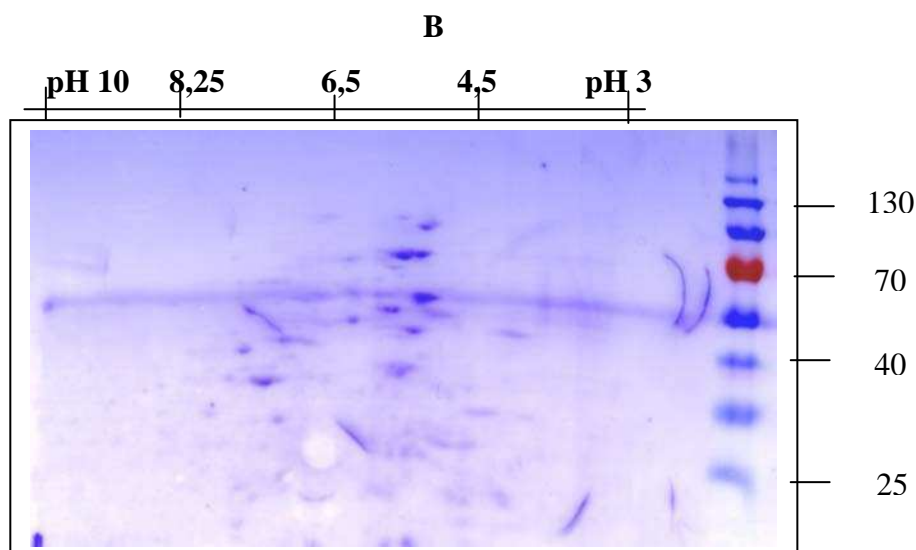


Figura 8. A. Gel teñido con Coomassie coloidal. **B.** Membrana PVDF con proteínas transferidas del gel SDS PAGE teñidas con Coomassie R-250. La escala de pI se consideró teniendo en cuenta la linealidad del gradiente de pH de las tiras utilizadas.

Los resultados del *Western Blot* utilizando un suero bovino inoculado con antígenos solubles de *B. bigemina* (Echaide y col., 1993) (Figura 9A) y un suero de un animal infectado naturalmente en la fase crónica de la enfermedad (Figura 9B) dieron lugar a la identificación de proteínas inmunoreactivas distribuidas mayoritariamente en el rango de pI menores a 6,5. Este mismo patrón fue observado con el suero Red positivo de la FAO (Guglielmone y col., 1997) proveniente de una infección experimental realizada con antígenos solubles de una cepa venezolana y eritrocitos infectados con una cepa mexicana y con el. Por otro lado, el *Western Blot* realizado con un suero de un bovino negativo para la babesiosis reaccionó contra algunas proteínas de bajo peso molecular diferentes a la fracción identificada con los sueros bovinos de animales infectados (Figura 9C).

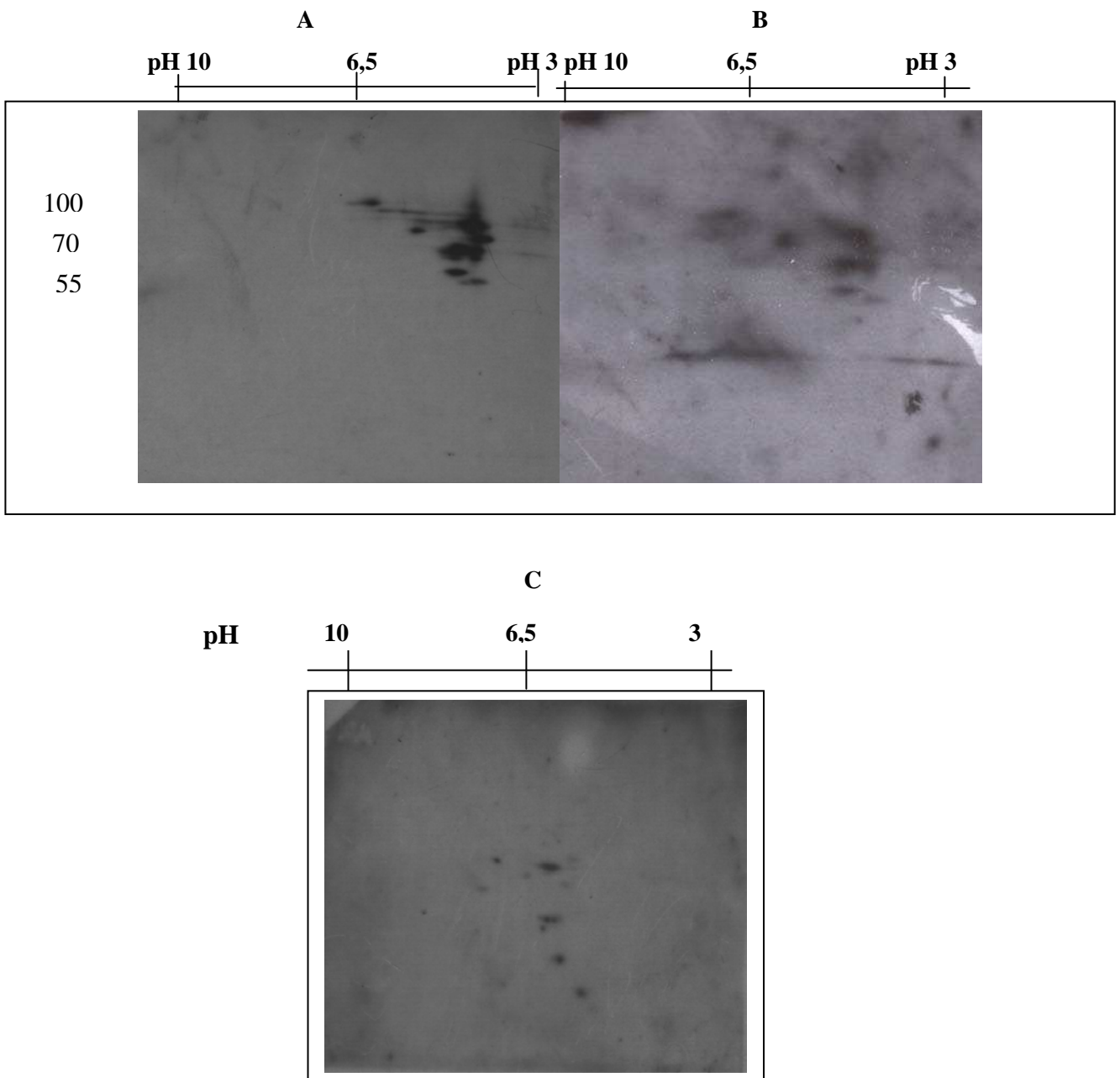


Figura 9. *Western Blot* los sueros bovinos positivos. En este caso solo se muestra el suero proveniente de una inoculación de un ternero con antígenos solubles de *B. bigemina* (Echaide y col., 1993) (A) y Suero de un bovino infectado naturalmente proveniente del área enzoótica (B). Suero bovino negativo (C)

La optimización de la técnica de separación de proteínas de merozoítos de *B. bigemina* utilizando geles de dos dimensiones, permitió detectar con un suero bovino infectado proteínas solubles las cuales podrás ser estudiadas como potenciales antígenos.

2. 1. 3. Distribución de las proteínas de *Babesia* spp. según su punto isoeléctrico

La abundancia de datos genómicos actuales permite responder preguntas acerca de la estructura de los proteomas y de su evolución. En tal sentido, una herramienta de análisis útil es la posibilidad de calcular la distribución del punto isoeléctrico (pI) *in silico* de los proteomas completos predichos a partir de la anotación genómica. Utilizando el programa Virtual 2D (Medjahed y col., 2003) u otros similares, es posible visualizar una distribución trimodal en algunos de los proteomas eucariotas con grupos de proteínas con pI de alrededor de 5, 7 y 9 (Schwartz y col., 2001).

Se ha reportado en la literatura que los parásitos intracelulares poseen un proteoma con una desviación hacia las proteínas básicas (Kiraga y col., 2007). El proteoma de organismos relacionados tales como *P. falciparum* muestran una distribución trimodal de las proteínas totales según su punto isoeléctrico con proteínas de pI de 5, 7 y 10 con mayor cantidad de proteínas básicas (Figura 13). Hasta el momento no existen reportes acerca de la distribución del proteoma de ninguno de los parásitos del género *Babesia* según su punto isoeléctrico pero los resultados experimentales presentados en este trabajo demuestran que las proteínas solubles del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* se distribuyen principalmente entre el pI de 4,75 y 8,25 (Figura 8A)

El genoma de *B. bigemina* no está anotado en la actualidad, pero la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes de *B. bovis* está disponible en el NCBI. Para establecer un patrón general sobre la distribución de las proteínas y antígenos de *Babesia* spp. se predijo la distribución en dos dimensiones (2D Virtual) de acuerdo a su punto isoeléctrico y peso molecular, de las proteínas anotadas de *B. bovis* utilizando el programa JVirGel (Figura10)

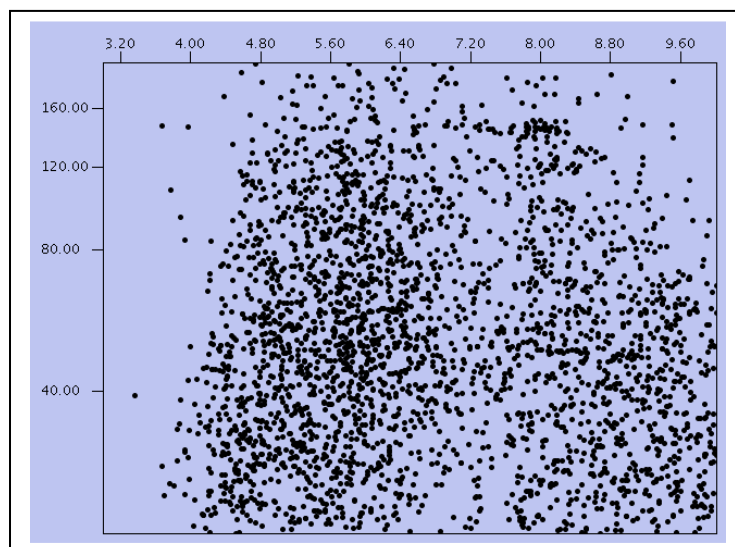


Figura 10. Gel 2D Virtual de las proteínas de *B. bovis* realizado con el programa JVirGe

El análisis de la distribución de los puntos isoeléctricos extraídos de los resultados de la predicción del programa pepstats del servidor EMBOSS demostraron una distribución trimodal de las proteínas totales observando tres grupos de proteínas con el punto isoeléctrico en el rango de 4-6 (curva 1), 6-8 (curva 2) el cual tiene mayor cantidad de proteínas y por último en la curva 3 y con menor frecuencia de distribuyen las proteínas de a 10 (Figura 11). Esta misma distribución trimodal se observó cuando se analizaron los puntos isoeléctrico de todas las proteínas de *Theileria parva* aunque la frecuencia de proteínas es similar en los tres grupos (Figura 12).

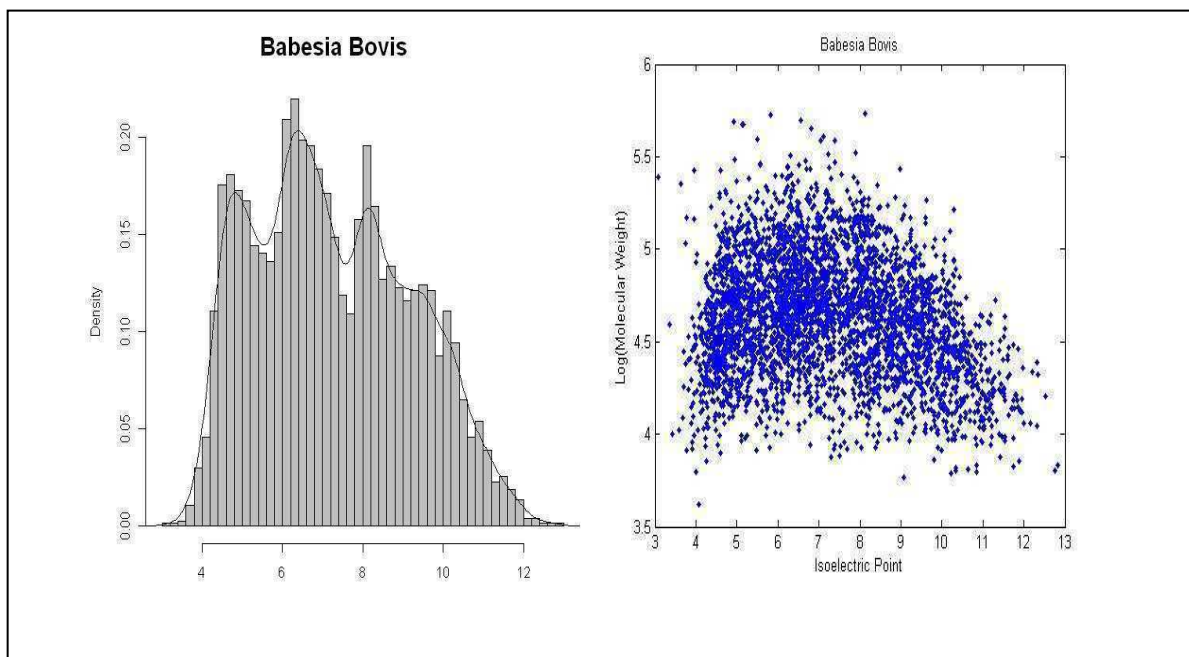


Figura 11. Distribución de frecuencias según su de las proteínas de *B. bovis* (predicción realizada con el pepstats (EMBOSS). La línea continua marca la distribución de los pI que es trimodal. Número de proteínas analizadas: 3705. Comando hist (R), Intervalo=0,28=14/50. Opción prob.= TRUE (gráfica de densidad de probabilidad de secuencia). Curva de densidad de probabilidad (suavizado). Comando density (R) opción bW=0,25 (Ventana gaussiana). El gráfico de putos muestra la distribución de las proteínas por de acuerdo logaritmo del peso molecular en función del pI.

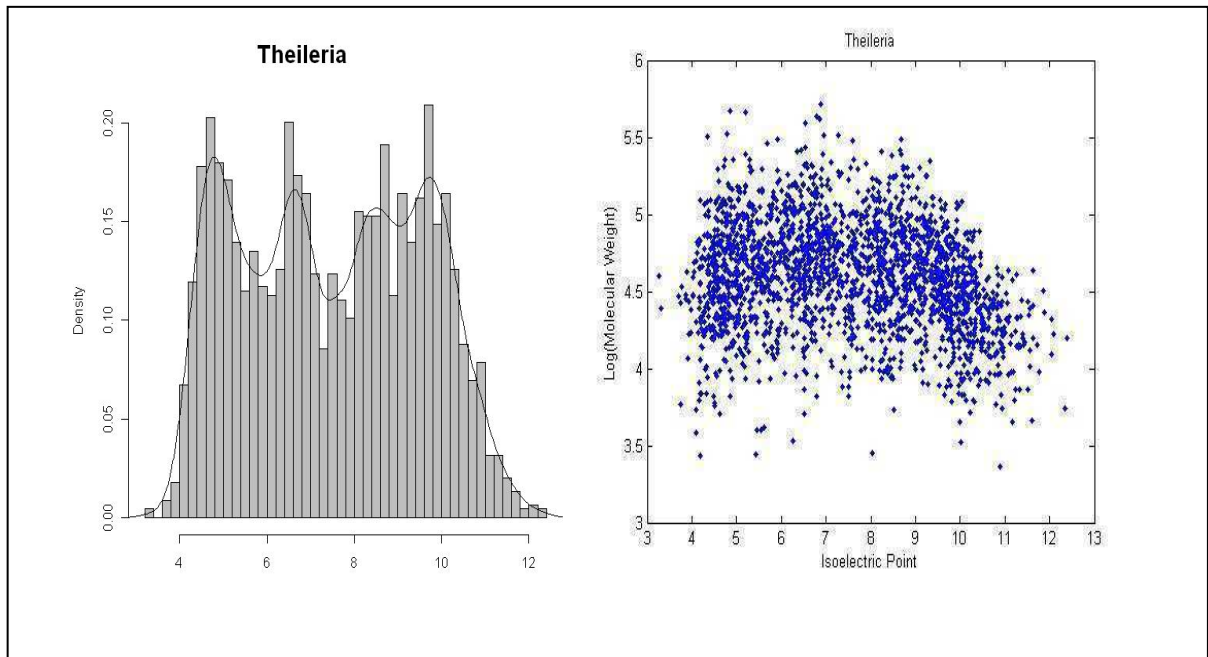


Figura 12. Distribución de frecuencias de las proteínas de *Theileria parva* según su punto isoeléctrico (predicción realizada con el pepstats (EMBOSS)). La línea continua marca la distribución de los pI que es trimodal. Número de proteínas analizadas: 2223. Comando hist (R), Intervalo=0,28=14/50. Opción prob.= TRUE (gráfica de densidad de probabilidad de secuencia). Curva de densidad de probabilidad (suavizado). Comando density (R) opción bw=0,25 (Ventana gaussiana). El gráfico de puntos muestra la distribución de las proteínas por de acuerdo logaritmo del peso molecular en función del pI.

La distribución frecuencia de las proteínas de un determinado punto isoeléctrico resultó ser diferente en *P. falciparum* y si bien la distribución es trimodal como otros eucariotas (Figura 14) presentando de proteínas con pI 5, 7 y 10 se observó una frecuencia alta de proteínas básicas(figura 13) lo cual podría deberse a que el genoma es rico en A-T

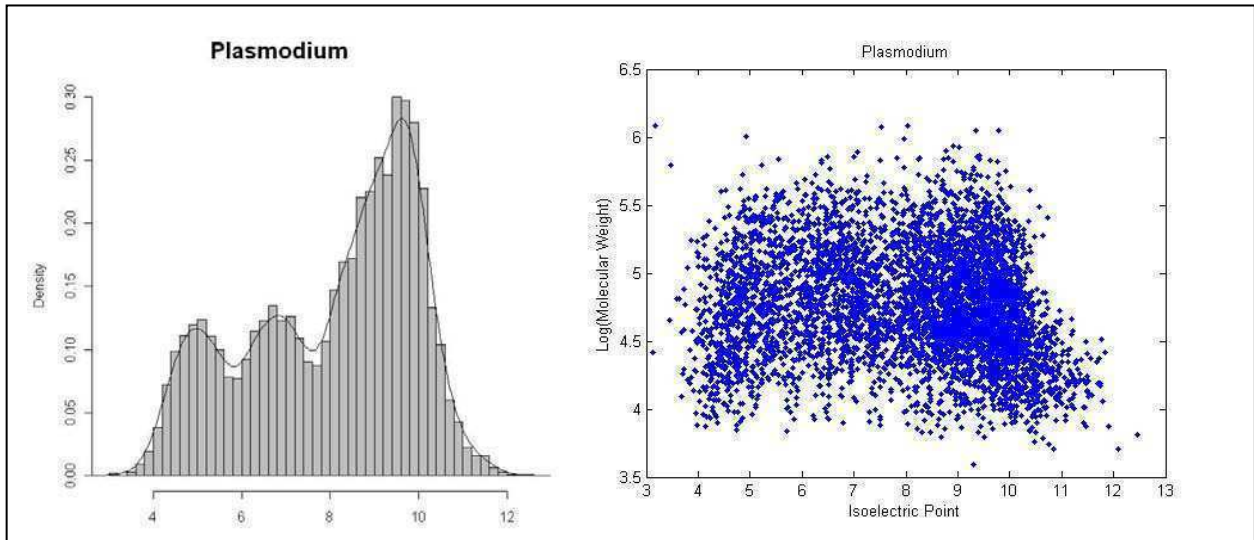


Figura 13. Distribución de frecuencias de las proteínas de *P. falciparum* según su punto isoeléctrico (predicción realizada con el pepstats (EMBOSS)). La línea continua marca la distribución de los pI que es trimodal. Número de proteínas analizadas: 5265. Comando hist (R), Intervalo=0,28=14/50. Opción prob.= TRUE (gráfica de densidad de probabilidad de secuencia). Curva de densidad de probabilidad (suavizado). Comando density (R) opción bw=0,25 (Ventana gaussiana). El gráfico de putos muestra la distribución de las proteínas por de acuerdo logaritmo del peso molecular en función del pI.

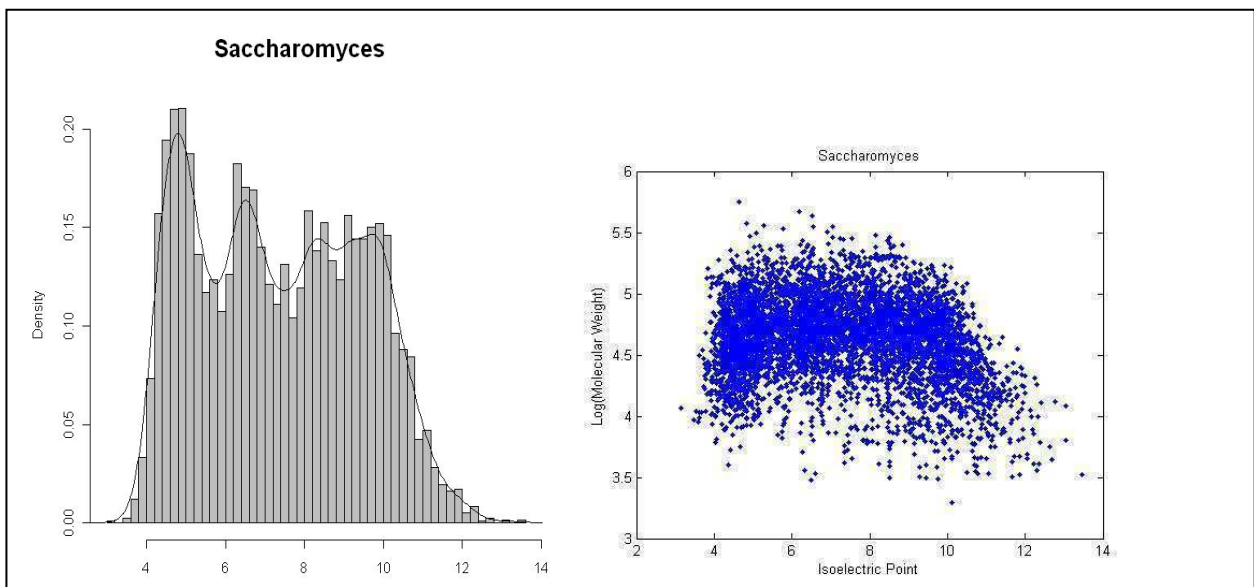


Figura 14. Distribución de *Saccharomyces* spp. según su punto isoeléctrico (predicción realizada con el pepstats (EMBOSS)). La línea continua marca la distribución de los pI que es trimodal.. Número de proteínas analizadas: 5861. Comando hist (R), Intervalo=0,28=14/50. Opción prob.= TRUE (gráfica de densidad de probabilidad de secuencia). Curva de densidad de probabilidad (suavizado). Comando density

(R) opción bw=0,25 (Ventana gaussiana). El gráfico de putos muestra la distribución de las proteínas por de acuerdo logaritmo del peso molecular en función del pI.

La disponibilidad de los proteomas anotados de organismos apicomplejos tales como *B. bovis*; *T. parva* y *P. falciparum* nos permitió analizar de una manera más integral los resultados experimentales obtenidos con la electroforesis en dos dimensiones de *B. bigemina*

2. 2. Genómica: Identificación y caracterización de genes potencialmente involucrados en los mecanismos de interacción patógeno-hospedador específicos para el phylum Apicomplexa.

En este objetivo específico se propone identificar en *Babesia bigemina* genes potencialmente involucrados en los mecanismos de invasión y egreso a las células blanco tanto del vector (garrapata) como del hospedador mamífero (bovino). La estrategia consistió en la búsqueda por homología en el genoma de *B. bigemina* de proteínas con funciones implicadas en la interacción patógeno–hospedador, provenientes de organismos relacionados, tales como *Plasmodium* spp., *B. bovis* y *Theileria* spp.

2. 2. 1. Identificación de la familia de genes que codifican para proteínas con dominio MACPF (*membrana attack-complex/perforin*) en *Babesia bovis*

Las proteínas formadoras de poro son empleadas por varios microorganismos patógenos para alcanzar su éxito como colonizador. Varios patógenos intracelulares utilizan proteínas formadoras de poro para invadir las células del hospedador, sobrevivir dentro de ella y finalmente egresar para infectar nuevas células.

En Apicomplexa se han reportado proteínas con dominio MACPF en *Plasmodium* spp (Kaiser y col., 2004; Kadota y col., 2004; Ishino y col., 2005; Ecker y col., 2007) y *Toxoplasma gondii* (Kafsack y col., 2009). En *Plasmodium* spp. se ha reportado que la familia está conformada por cinco genes que codifican para 5 proteínas secretorias que poseen el dominio MACPF (Kaiser y col., 2004). Este dominio está definido por una secuencia consenso característica Y/W- X₆- (F/Y)GTH(F/Y)- X₆- GG a partir de la cual se define el dominio como tal debido a que estos aminoácidos definen la estructura secundaria que determina la estructura tridimensional importante para que la proteína cumpla con su rol en la formación de poros en la membrana. Se ha observado que en el género *Plasmodium* existe mayor homología entre las secuencias de los dominios MACPF de los genes ortólogos que en los genes parálogos. Por lo tanto, es posible identificar los genes que codifican para proteínas del tipo perforinas en el genoma de *B. bigemina* a partir de la búsqueda por similitud con los genes de *B. bovis* anotados con dominio MACPF en la base de datos de genes de referencia (*Refseq*) del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) En la colección no redundante de secuencias de ADN, ARN y proteínas de *B. bovis* del *Refseq* identificamos siete genes con el dominio MACPF anotado.

Adicionalmente, confirmamos la anotación de los dominios MACPF en cada proteína identificada utilizando el predictor de dominios proteicos SMART (Tabla 4).

Identificación del locus en el genoma (<i>locus tag</i>)	Anotación	Cromosoma	Dominio MACPF (SMART)
BBOV_II007150	mac/perforin domain containing protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	2	MACPF: 518-744 aa (Evalue=1,30e-36)
BBOV_II002020	mac/perforin domain containing protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	2	MACPF: 422-646 aa Evalue=3,70e-51
BBOV_II001970	mac/perforin domain containing membrane protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	2	MACPF: 154-354 aa (Evalue=3,90e-32)
BBOV_IV001370	MAC/perforin domain containing protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	4	MACPF: 172-371aa Evalue (1,40e-24)
BBOV_III000410	hypothetical protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	3	MACPF1: 210-423aa Evalue=4,00e-19 MACPF2: 497-700aa Evalue=5,00e-21 MACPF3: 1040-1255aa (Evalue=9,60e-28)
BBOV_III000320	hypothetical protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	3	MACPF: 87-294aa (Evalue=1,40e-16)
BBOV_II006750*	hypothetical protein [<i>Babesia bovis T2Bo</i>]	2	MACPF: 241-401aa (Evalue=9,30e-03)

Tabla 4. Proteínas de *Babesia bovis* anotadas en el base de datos de genes (RefSeq) del NCBI con dominio MACPF. *No considerada en este trabajo como proteína del tipo perforina por su valor de E mayor a e^{-4} .

Teniendo en cuenta los valores de E obtenidos en la predicción de dominios MACPF en cada proteína y considerando significativos los valores mayores o iguales a e^{-4} , definimos seis

proteínas del tipo perforina en *B. bovis* descartando a la proteína BBOV_II006750 cuyo valor de E de la predicción del dominio fue de $9,30e^{-03}$. Incluso, el alineamiento de los dominios MACPF de las siete candidatas demostró que esta proteína no presenta el motivo característico del dominio: (Y/W- X₆- (F/Y)GTH(F/Y)- X₆- GG (Figura 15).

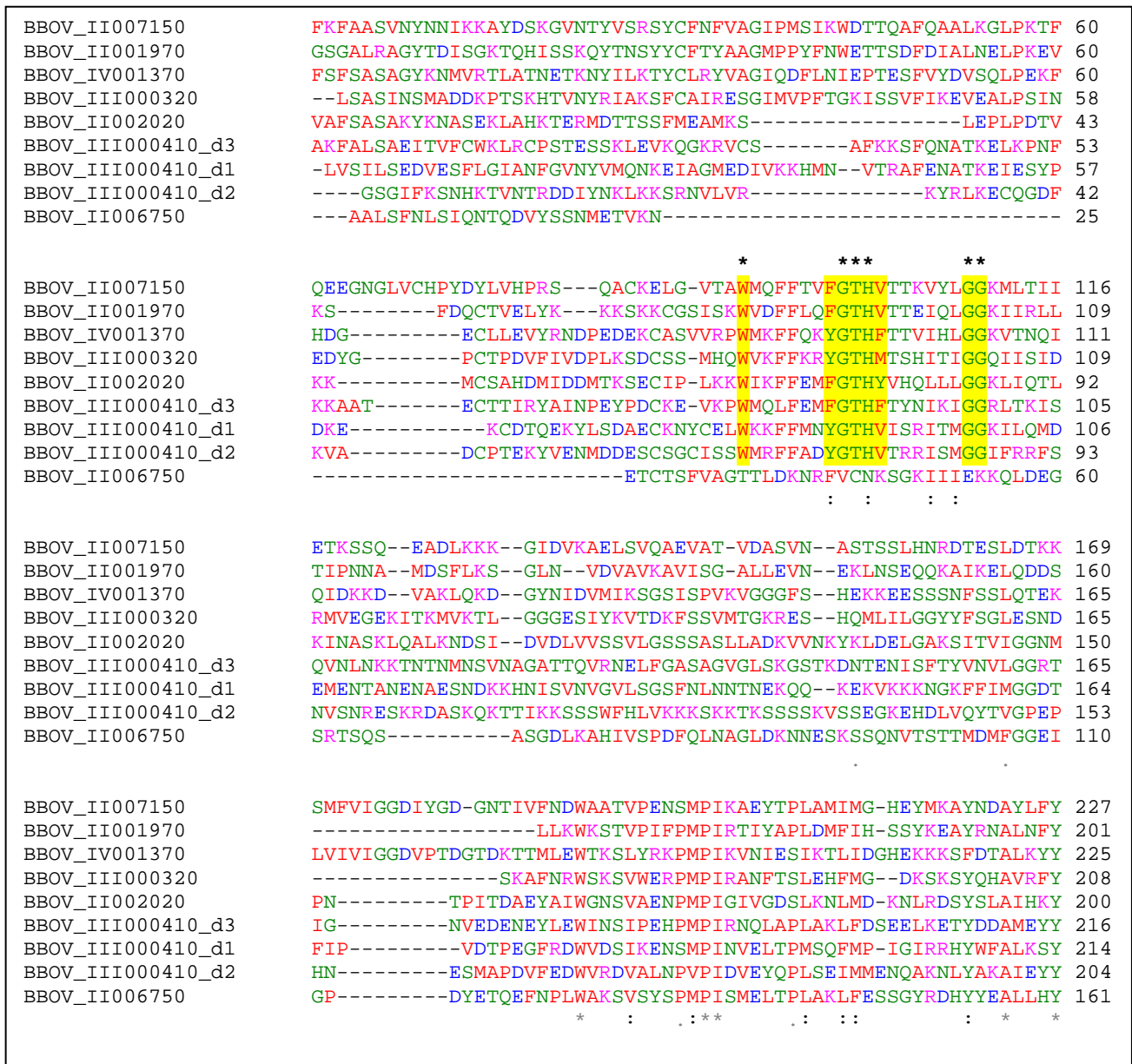


Figura 15. Alineamiento múltiple por Clustal W de la región predicha como dominio MACPF de los genes depositados en el banco de genes del NCBI. En amarillo se resalta el motivo característico del dominio MACPF (Y/W- X₆- (F/Y)GTH(F/Y)- X₆- GG. Los asteriscos marcan los aminoácidos que están conservados en todos los dominios MACPF de distintos organismos.

De esta forma, se identificaron seis genes que codifican para proteínas del tipo perforina de *B. bovis*, cinco de las cuales poseen un dominio MACPF hacia el extremo carboxilo terminal,

mientras que BBOV_III00410 posee tres dominios dispuestos en tándem cuya secuencia de aminoácidos varía entre uno y otro (Figura 15)

2. 2. 2. Identificación y anotación de proteínas con dominio MACPF en *Babesia bigemina*

Los dominios MACPF de las seis proteínas de *B. bovis* se utilizaron para identificar los genes ortólogos en el genoma de *B. bigemina* no anotado pero con disponibilidad de la secuencia de los *contigs* en el sitio del *Wellcome Trust Sanger Institute*: (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/). Utilizando cada uno de los dominios MACPF de *B. bovis* realizamos la búsqueda con el algoritmo TBLASTN en los *contigs* e identificamos ocho secuencias ortólogas distribuidas en diferentes *contigs* del genoma.

Debido a que la anotación del genoma de *B. bigemina* aún no ha sido finalizada, procedimos a anotar esta familia de genes utilizando herramientas bioinformáticas para predecir la estructura de cada uno de los genes. Las predicciones obtenidas por los programas FGNEISH HMM (entrenado con *P. falciparum*) y Glimmer HMM entrenado manualmente con el genoma anotado de *B. bovis* nos permitieron generar un consenso de cada secuencia definiendo ocho genes cada uno con su secuencia codificante que posteriormente fue corroborada analizando las secuencias de aminoácidos con el predictor SMART, logrando definir la secuencia del péptido señal y el dominio MACPF características fundamentales para considerar estas proteínas como perforinas

Por otra parte, la comparación utilizando la herramienta del *Artemis Comparisson Tools* (Artemis) de los genes anotados de *B. bigemina* con los previamente anotados de *B. bovis*, nos permitió curar nuestras anotaciones logrando definir la familia de ocho genes que codifican para proteínas del tipo perforina (PLP) nombrándolas de la letra A a la H para diferenciarlas de las descritas en *Plasmodium* spp. Debido a la ortología entre los genes *plp* de *Babesia* spp., la denominación de los miembros de la familia fue aplicada a los genes de *B. bovis* (Figura 16).

Los resultados de la anotación y la comparación entre los genes *plp* de *B. bigemina* y *B. bovis* mostraron en primer lugar que *B. bigemina* posee dos genes adicionales que codifican para proteínas con dominio MACPF que contienen el motivo característico conservado y además según la predicción de Signal P estos presentaron la secuencia del péptido señal lo cual indicaría que estos no son pseudogenes. Otra característica importante que surge de la anotación, es que los genes *plpa* y *plpb* en ambos parásitos no poseen intrones mientras que, el resto de los genes en ambos parásitos poseen entre 2 y 15 intrones con un tamaño promedio de 30 pb cada uno.

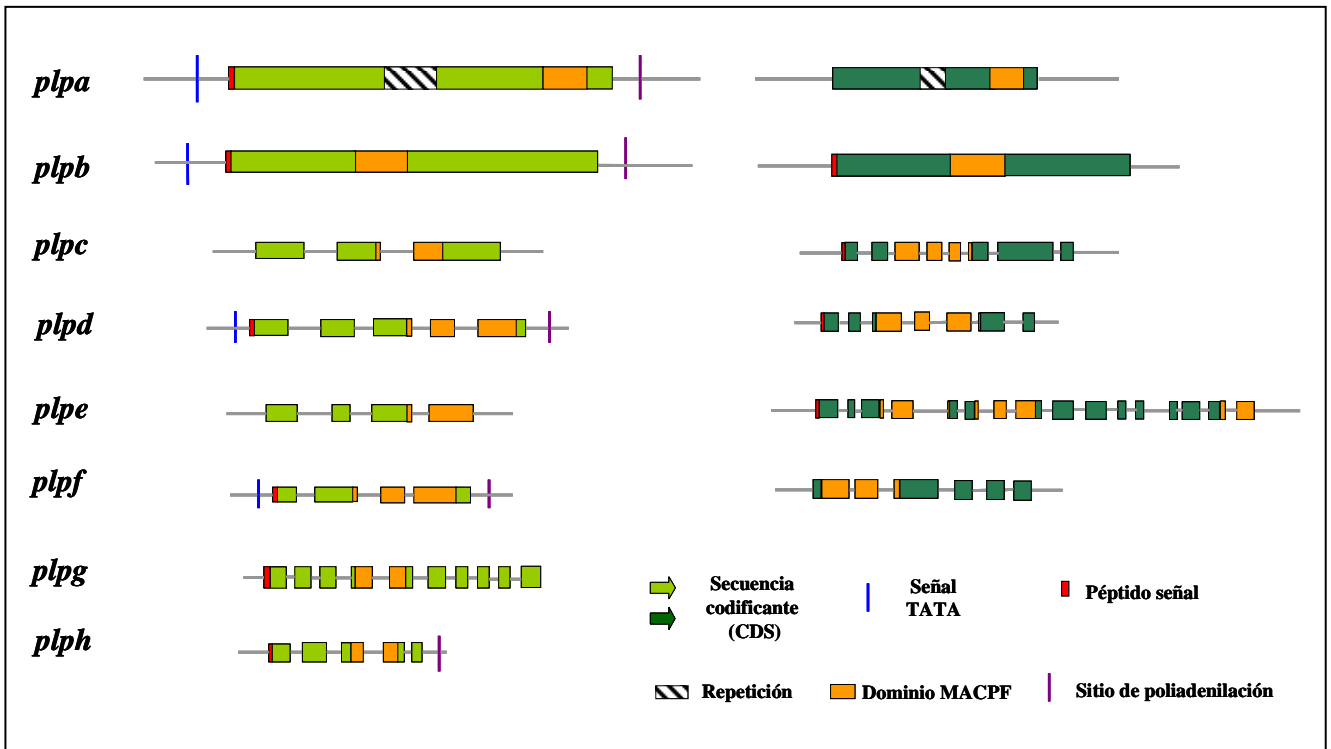


Figura 16. Anotación estructural de los genes con dominio MACPF de *B. bigemina* (A) genes ortólogos en *B. bovis* (B)

La anotación de las proteínas de *B. bigemina* comparadas con las de *B. bovis* demostraron algunas similitudes y diferencias destacables (Figura 17). Una de las similitudes más notables es la presencia de dos dominios repetitivos en la región central de la proteína PLPA de ambos parásitos, la conservación de estos dominios repetitivos en ambas proteínas sugeriría que su posible función fue seleccionada a lo largo de la evolución. Más adelante describiremos esta región repetitiva en ambas proteínas de *B. bigemina* y *B. bovis*. Una diferencia importante es la presencia de tres dominios MACPF en la PLPE de *B. bovis*, mientras que en *B. bigemina* esta proteína posee un solo dominio sin embargo pudimos observar la existencia de dos proteínas adicionales a las de *B. bovis* cada una con un solo dominio. El análisis de las secuencias de los dominios demostró que existe una alta homología entre cada uno de los dominios de la BboPLPE y los dominios de la BbiPLPE, BbiPLPG y BbiPLPH respectivamente (Figura 18). Los porcentajes de identidad de los alineamientos de a pares entre los dominios con menos homología fue de alrededor del 20%.

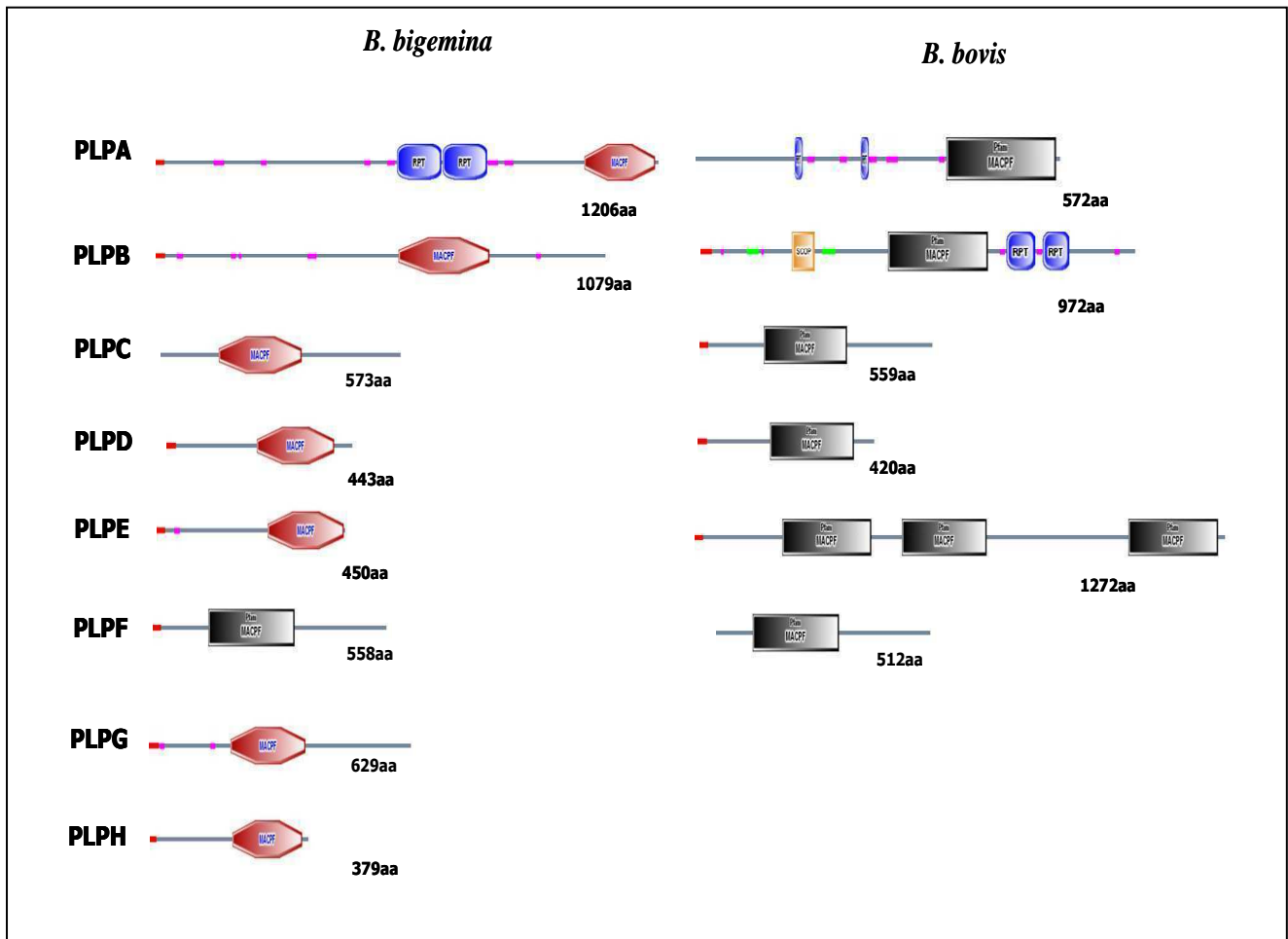


Figura 17. Anotación estructural de las proteínas MACPF de *B. bigemina* y *B. bovis*. Estructuras generadas en el servidor SMART.

```

BboPLPE_MACPFd1  -----KCDTQEKYLSDAECKNYCELWKKFFMNYGTHVI  33
BbiPLPE_MACPF   MFLSAEWNPTRAFQNASNVLLEYENK GKCSKIDYR TNGSCAGYYELWKSFFNNYGTHVI  60
                                     **.. :.* : : .*. * *****
BboPLPE_MACPFd1  SRI TMGGKILQMENTANENAESNDKKNISVNVGVLSGSFNLNNTNEKQKQEKVKKK  93
BbiPLPE_MACPF   FRL TMGGKLLRIVENLEDNEAKEKSKERQSSFGVQLS IINANLSMSNKKEDGMRKALNDQ 120
                                     *:*****: : * : : : *::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
BboPLPE_MACPFd1  NGKFFIMGGDTFIPVDTPEGFRDWVDSIKENSMPINVELTPMSQFMPIGIRRHWFALKS 153
BbiPLPE_MACPF   SSKYFVMGGDNLTSFDSSDSLKKWMSVERNAMPIDIQLTPISQFIPKEIRSHFWMAFKV 180
                                     .*:*****: .*. : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
BboPLPE_MACPFd1  Y-- 154
BbiPLPE_MACPF   YND 183
                                     *

```

% Identidad: 37%

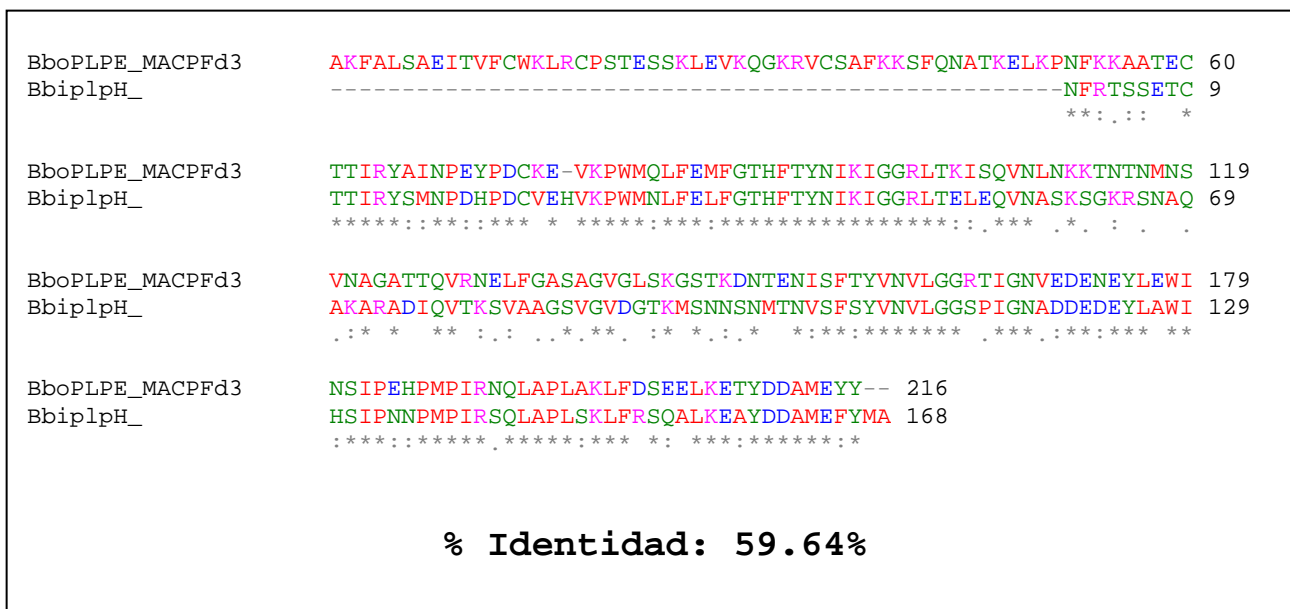


Figura 18. Alineamiento entre los dominios MACPF de la BboPLPE y BbiPLPE, G y H. **A.** BboPLPEMACPFd1/BbiPLPE, **B.** BboPLPEMACPFd2/BbiPLPG, **C.** BboPLPEMACPFd3/BbiPLPH. Cada alineamiento presenta su porcentaje de identidad.

Teniendo en cuenta que la anotación de la familia de genes *plp* fue basada en predicciones *in silico* se intentó verificar la anotación de algunos de los genes utilizando herramientas de biología molecular.

Verificación experimental de la anotación

Bbiplpc

En este caso particular la secuencia codificante anotada utilizando los programas bioinformáticas no nos permitió predecir la secuencia del péptido señal, la cual es fundamental para definir esta familia de proteínas formadoras de poro y secretorias. Por tal motivo se procedió a la verificación de la anotación por métodos experimentales planteando dos modelos posibles de gen. Cada uno de estos modelos fue evaluado por RT-PCR. El gen del modelo 1 correspondió a una secuencia con un marco de lectura sin la secuencia señal de exportación mientras que el modelo 2 fue extendido río arriba hasta una probable secuencia de péptido señal predicha por el algoritmo Signal P (Figura 19). La amplificación del fragmento del transcripto correspondiente al modelo 1 utilizando el par de oligonucleótidos 1 y 2 mostró un producto con 30 pb menos que el producto de la amplificación a partir de ADN genómico. De esta manera verificamos la presencia de un intrón de 30 pb predicho en la anotación *in silico*. Por otro lado, cuando se realizó la amplificación del transcripto utilizando un oligonucleótido específico para una región río arriba (3) y el oligonucleótido 2, pudimos detectar un producto a partir de ADN copia aunque más pequeño que el producto generado por el ADN genómico. En esta amplificación también se pudo observar la presencia del intrón de 30 pb que alternativamente apareció en el mensajero, lo cual podría ser una evidencia de que este gen experimenta *splicing* alternativo. Asimismo, la obtención de producto utilizando el par de oligonucleótidos 3 y 2 nos permitió inferir que hacia el extremo 5' del gen debía situarse la secuencia del péptido señal, como consecuencia planteamos el segundo modelo de gen extendido hacia el 5' y logramos predecir un péptido señal que no iniciaba en un ATG y que además poseía un codón *stop* en el tercer exón. Los resultados de la RT-PCR utilizando los pares de oligonucleótidos 4/6 y 5/6 resultaron negativos mientras que la amplificación de esta secuencia en el ADN genómico mostró un resultado positivo. Por ende, el gen del modelo 2 fue descartado debido a que no pudimos comprobar la presencia del péptido señal en el ARN mensajero.

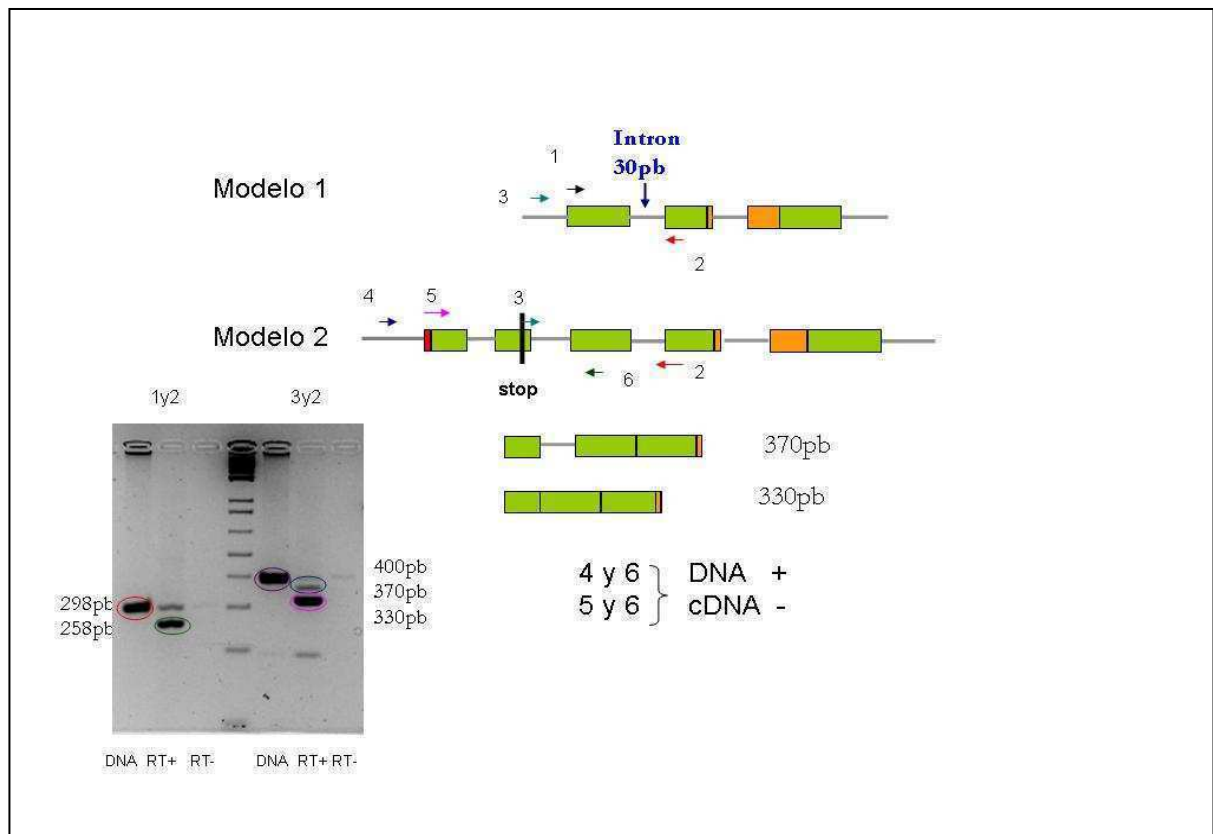


Figura 19. Modelos posibles para verificar la anotación del gen *Bbiplpc* y evaluación por RT-PCR. Las flechas corresponden a los oligonucleótidos utilizados: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

El hecho de que no hallamos podido encontrar con el abordaje *in silico* el péptido señal de esta secuencia, puede deberse por un lado, a errores en la secuenciación del genoma y por el otro a las limitaciones de los programas de predicción tales como el SignalP3.0 entrenado con una restringida diversidad de eucariotas. Por otro parte, esta proteína podría ser secretada por otros mecanismos desconocidos o tal vez podría representar una proteína no funcional.

2. 2. 3. Estudio estructural del dominio MACPF en *Babesia* spp.

2. 2. 3. 1. Predicción de la estructura secundaria

Como se describió anteriormente, el dominio MACPF se encuentra conservado en organismos eucariotas y procariotas y específicamente existe un motivo de aminoácidos consenso entre todos los dominios MACPF conocido (Y/W)-X₆-(F/Y)GTH(F/Y)-X₆-GG (Pointing, 1999). Con el fin de estudiar la conservación de esta secuencia consenso realizamos un alineamiento múltiple entre secuencias del dominio MACPF de *Homo sapiens* (C9 del complemento y perforina), de *Photorhabdus luminescens* y las secuencias del dominio de las proteínas reportadas de apicomplejos (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *B. bovis*) y *B. bigemina*. Pudimos demostrar que tanto en *B. bovis* como en *B. bigemina* se conservó esta secuencia de aminoácidos consenso (Figura 20, asteriscos azules). Por otra parte, la conservación de estos residuos en todas las perforinas implica además, la conservación de la estructura secundaria y terciaria que es fundamental para que estas proteínas cumplan con la función de formar poros en la membrana. En este trabajo demostramos que las proteínas del tipo perforinas predichas en *B. bigemina* y sus ortólogos en *B. bovis* conservan la estructura secundaria del dominio MACPF presentando dos grupos de hélices α , CH1 y CH2 (Figura 9, CH1=1 y CH2=2) que se ha reportado que alternan residuos hidrofóbicos e hidrofílicos que tienen la habilidad de convertirse en las horquillas beta anfipáticas que atraviesen la membrana durante la inserción del poro (Peitsch y col., 1990).

Otro grupo de residuos conservados en la PLPs de *Babesia* spp. incluyen cuatro residuos G (marcadas en la Figura 21 en azul) que están conservados en el 95 % de todas las proteínas con dominio MACPF. Estos residuos conforman la curva cerrada de la lámina β que funcionaría como una bisagra que permite enderezar la lámina durante la perforación de la membrana.

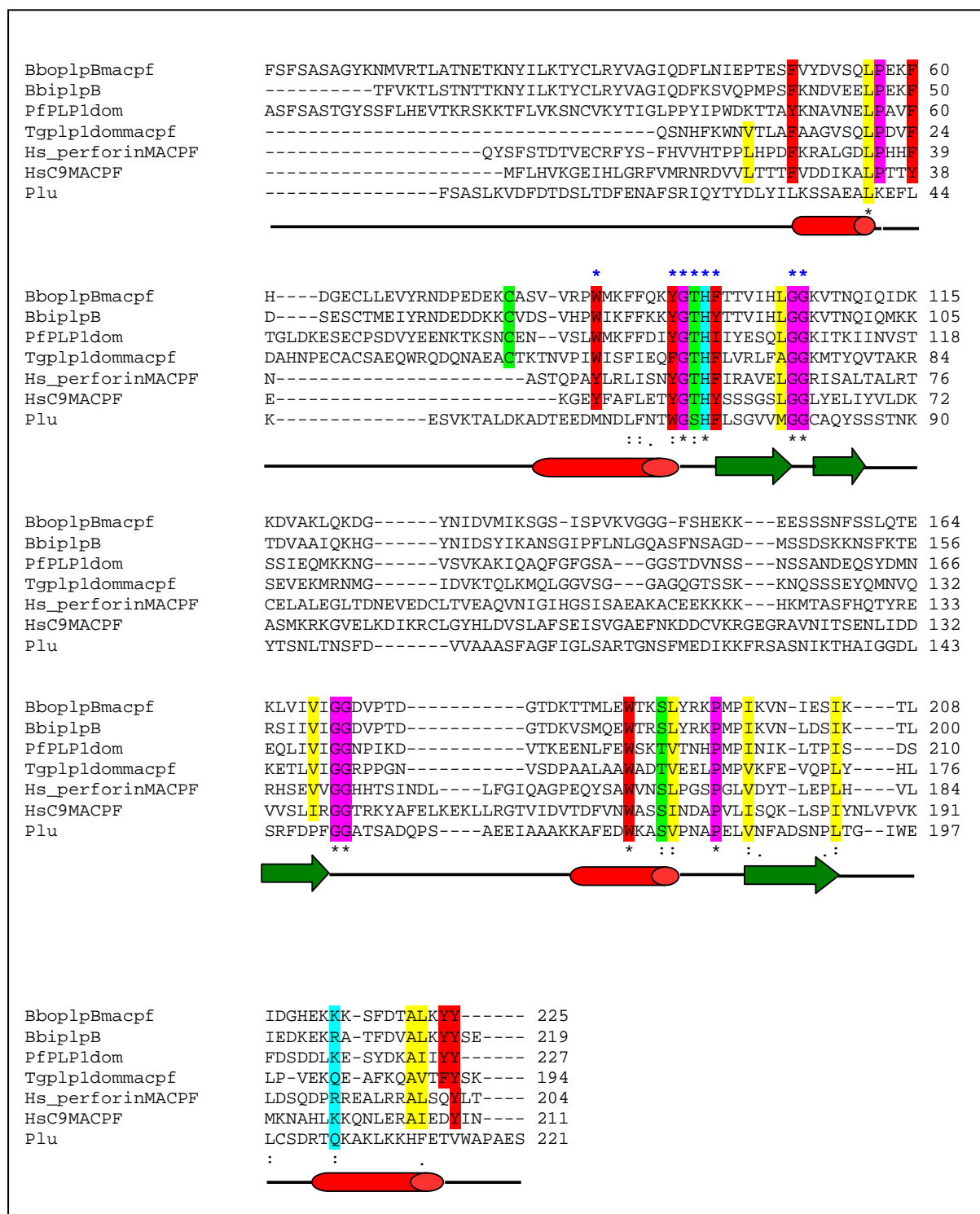
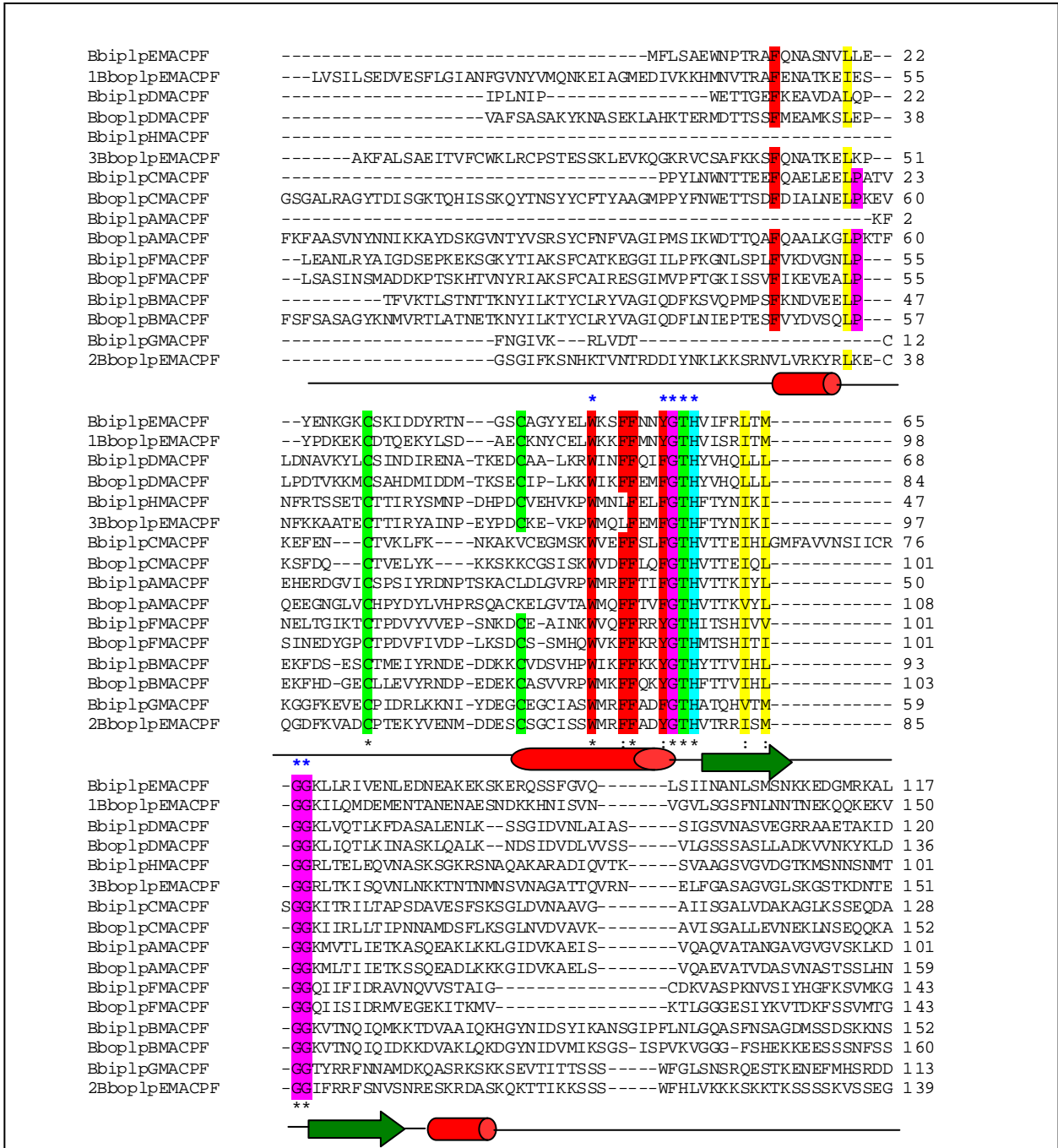


Figura 20. Alineamiento múltiple con secuencias proteicas del dominio MACPF de diversos orígenes: *Babesia bovis* (BboplPB), *Babesia bigemina* (BbiPLPB), *Plasmodium falciparum* (PfPLP1), *Toxoplasma gondii* (Tgplp1), *Homo sapiens* (proteína del complemento C9 y perforina), *Photorhabdus luminescens* (Plu). Residuos conservados resaltados como cargados (celeste), polares (verde), alifáticos (fucsia), aromáticos (rojo) y aminoácidos muy propensos a formar α -hélices (amarillo). Los asteriscos azules marcan el motivo característico del dominio MACPF. Consenso de la de estructura secundaria conservada del dominio MACPF. Los barriles en rojo representan l hélices α y las flechas en verde las láminas β .

Finalmente, demostramos que en todos los dominios MACPF de las perforinas de *B. bigemina* y *B. bovis* se conservan los residuos amonoacídicos característicos manteniendo la estructura secundaria que define la conformación de la estructura tridimensional de este dominio acorde a su función de proteína formadora de poros en la membrana (Figura 22).



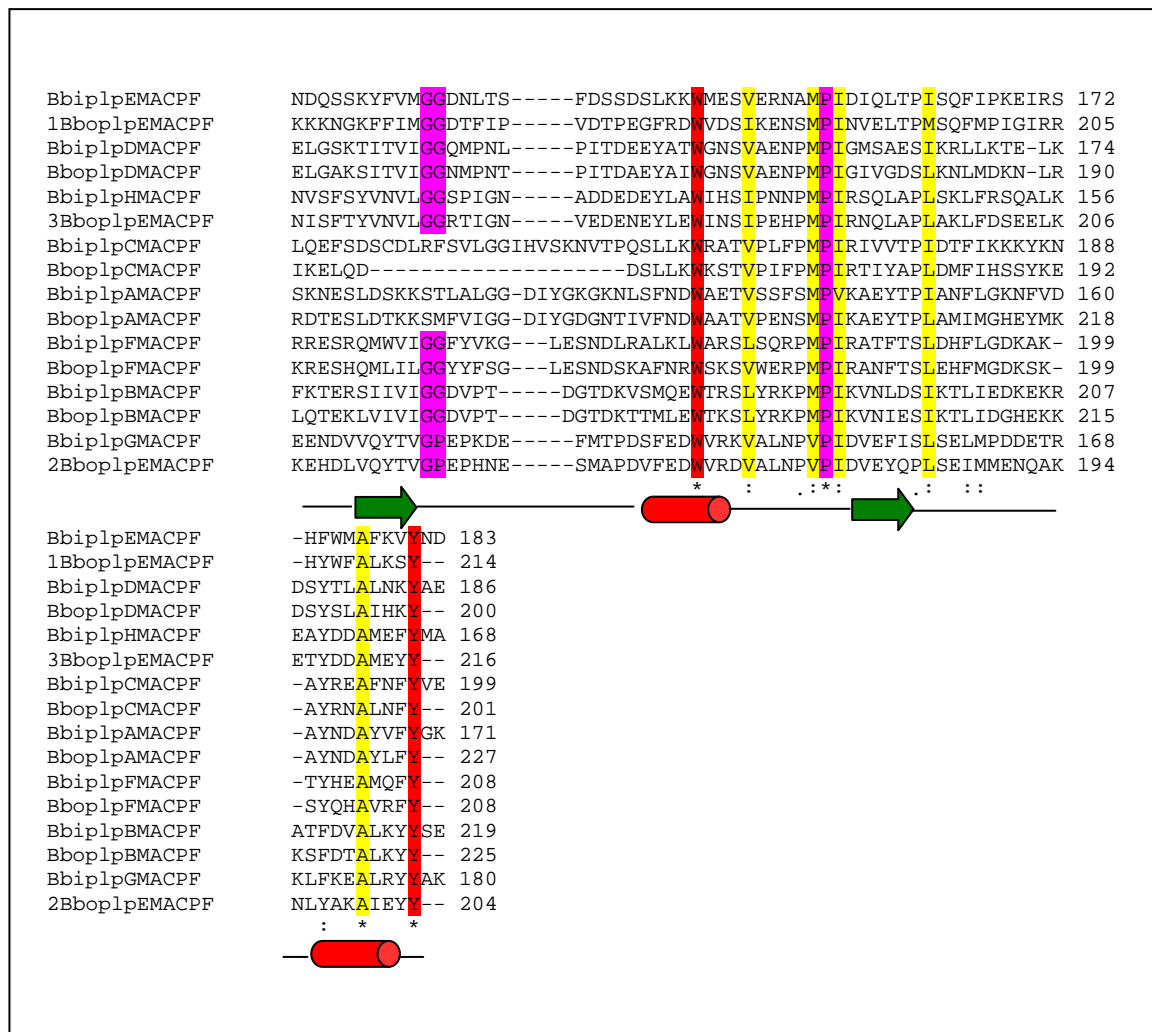


Figura 22. Alineamiento múltiple de dominios MACPF de *B. bovis* y *B. bigemina*. Residuos conservados resaltados como cargados (celeste), polares (verde), alifáticos (fucsia), aromáticos (rojo) y aminoácidos muy propensos a formar α -hélices (amarillo). Los asteriscos azules marcan el motivo característico del dominio MACPF. La estructura secundaria consenso se representa debajo del alineamiento.

2. 2. 3. 2. Predicción de la estructura tridimensional del dominio MACPF

Método: Modelado por homología a proteína de estructura conocida

Hasta el momento se ha cristalizado el dominio MACPF de dos proteínas: la subunidad alfa de la proteína del complemento humano C8 (Hadders y col., 2007) y la proteína con dominio MACPF/Perforin-like de la gamma-proteobacteria *Photorhabdus luminescens* (Rosado y col., 2007). Utilizando como molde las estructuras tridimensionales de estos dominios que se

encuentran depositadas en la PDB (*Protein Data Bank*) realizamos un modelado de la estructura terciaria de los dominios MACPF de la BbiPLPA y BbiPLPB. Los dominios predichos por SMART para ambas proteínas no fueron útiles para establecer la homología estructural con los dominios cristalizados. La búsqueda del dominio MACPF a través del servidor PRODOM nos permitió definir un dominio más grande para cada una. (Tabla 5)

Proteína	Dominio PRODOM	Descripción	Score	E value
BbiPLPA	PD863442	DOMAIN MAC/PERFORIN PFD0430C PF08_0050 PF08_0052 PFI1145W SPOROZOITE-EXPRESSED S13	386	$6e^{-37}$
BbiPLPB	PD863442	DOMAIN MAC/PERFORIN PFD0430C PF08_0050 PF08_0052 PFI1145W SPOROZOITE-EXPRESSED S13	384	$1e^{-36}$

Tabla 5. Búsqueda de homólogos con estructura conocida a partir de los dominios obtenidos con PRODOM.

Identificación de posibles templados para modelar el dominio MACPF de las perforinas de *B. bigemina*

Las búsquedas para hallar una secuencia de estructura conocida se realizaron por métodos perfil-secuencia (PsiBlast) y perfil-perfil (FFAS03). El algoritmo Psi-Blast busca homólogos en organismos muy lejanos filogenéticamente mientras que el servidor FFAS03 (Jaroszewski y col., 2005) búsquedas a partir de alineamientos perfil-perfil y un algoritmo de reconocimiento de plegado y asignación de función. Los algoritmos perfil-perfil usan información presente en proteínas homólogas para amplificar los patrones que definen una familia. Como resultado, permiten la detección de homologías remotas. Los resultados obtenidos por los métodos anteriores se comparan en la Tabla 6.

	FFAS 03 (significativo menor a -9.5)	Psi Blast (punto de corte $1e^{-4}$)
BbiPLPA	Templado A mol:protein length:231 ACID PHOSPHATASE Pdb 1d2t Score -6.480 Valor E ND	Templado Chain A, structure of C8 a (complement)-MACPF Homo sapiens Pdb 2QQH Score 55.3 Valor E 2×10^{-6}
BbiPLPB	Templado A mol:protein length:207 Hypothetical protein Atu0120 Pdb 2i6h Score -5.750 Valor E ND	Templado Chain A, structure of C8 a (complement)-MACPF Homo sapiens Pdb 2QQH Score 55.3 Valor E 2×10

Tabla 6. Templados identificados por el algoritmo de búsqueda Psi- BLAST y el FFAS 03

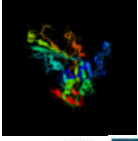
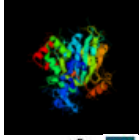
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, fueron descartados los templados predichos por el FFAS03 por su alta puntuación (*score*) y además porque ninguno de estos templados resultaron homólogos al dominio de interés. Por el contrario los resultados de las 7 iteraciones del Psi-Blast presentaron homología con la cadena A de la proteína C8 del complemento humano con un valor de E significativo.

Asignación de plegamiento mediante *Threading*

Se le asignó el plegamiento al dominio MACPF de *B. bigemina* a través de métodos de *threading*. Estos métodos se basan en el alineamiento de la secuencia incógnita a una secuencia con estructura conocida (o alineamientos entre perfiles), renombrando los residuos del templado a los de la secuencia de interés y modelando alternativamente las inserciones. El servidor utilizado fue el PHYRE el cual implementa un algoritmo de búsqueda perfil-perfil junto a la evaluación

de similitud de la estructura secundaria predicha. Los resultados estimaron con una predicción del 100% y con valores de E significativos (menores a $1e^{-4}$) que el mejor templado para modelar el dominio MACPF de BbiplpA y B era la cadena alfa de la proteína C8 del complemento humano. (Figura 23).

A

View Model	E-value	Estimated Precision	BioText	Fold/PDB descriptor	Superfamily	Family
 Jmol MDL	2.4e-22	100 %	n/a	PDB header: immune system, membrane protein	Chain: A: PDB Molecule: complement component c8 alpha chain;	PDBTitle: structure of c8a-macpf reveals mechanism of membrane attack2 in complement immune defense
 Jmol MDL	7.3e-11	100 %	n/a	PDB header: unknown function	Chain: A: PDB Molecule: unknown protein;	PDBTitle: structure of a macpf/perforin-like protein

B

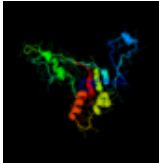
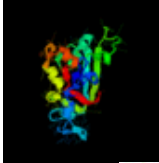
Fold Recognition						
View Model	E-value	Estimated Precision	BioText	Fold/PDB descriptor	Superfamily	Family
 Jmol MDL	4.8e-07	100 %	n/a	PDB header: immune system, membrane protein	Chain: A: PDB Molecule: complement component c8 alpha chain;	PDBTitle: structure of c8a-macpf reveals mechanism of membrane attack2 in complement immune defense
 Jmol MDL	0.0001	95 %	n/a	PDB header: unknown function	Chain: A: PDB Molecule: unknown protein;	PDBTitle: structure of a macpf/perforin-like protein

Figura 23. Asignación del plegamiento del dominio MACPF para **A.** BbiPLPA y **B.** BbiplpB utilizando el servidor PHYRE

Construcción del modelo del dominio MACPF por homología

La estructura tridimensional del dominio MACPF de las proteínas de *B. bigemina* fue modelada utilizando como templado la cadena alfa de la proteína C8 del complemento humano. Para ello se empleo el servidor TITO, el cual analizó la estructura del templado seleccionado y el alineamiento de la secuencias a modelar con la secuencia del templado (Figura 24). Previamente, se confirmó que la estructura y la secuencia del templado coincidían en sus residuos. Las posiciones sobrantes fueron removidas del alineamiento tanto en la secuencia incógnita como en el templado.

BbiplpAmacpf qqh	-TPPGLEYLGSQYDMVKGN---PLG-----DTITLLDPGYR----ANI IQMHWKDFE 45 GSVRAIDEDCSQYEP I P G S Q K A A L G Y N I L T Q E D A Q S V Y D A S Y Y G G Q C E T V Y N G E W R E L R Y 60 : . : : * * : : * . . * * * : : * . . * . : : : . * * :
BbiplpAmacpf qqh	GVSNSLLYMQPKGAWVRSYVSYCHKSDTVSEVSKSLKLNALSVDASVSAEVPDGLKFAA 105 DSTSERLYYGDDEKYFRKPYNFLKYHFEALADTGISSEFYDNANDLLSKVKKDKSDSFGV 120 . : . . * * . . : . * . . * . : * : . . : : * . . * . * . .
BbiplpAmacpf qqh	SASYNNVKNSESQKGLKKYVRSYCLNYVAGIPSSIPWDYTTAFTIALKQLPTKFEHERD 165 TIGIG-PAGSPLLVGVGVSQSQTDFLNLNLYNEKFFIFTRIFT---KVQTAHFKMRKD 176 : * * : * : . : . : . . . : : * * * * . : : : : . : *
BbiplpAmacpf qqh	GVICSPSIYRDNPTSKACLDLGVPRWRFFTIFGTHVTTKIYLGKMKVTLIETKASQEAK 225 DIMLDEGMLQSLMELPDQYNYGM--YAKRINDYGTHTYITSGSMGGIYIYILVIDKAKMES 234 . : : . . : : . : * : : : * : . : * * * * * . : * * : : . : : .
BbiplpAmacpf qqh	LKKLGDIDVKAIEISVQAQVATANGAVSVGVSKLKDSKNESLDSKKSTLALGGDIYGKGNL 285 LGXX-XXXXXXXXXXARKAMAVEDIISRVRGGSSGWSGGLAQRNSTITYR----SWGRSL 289 * * : * * : * * * . : : * * : : . * : * :
BbiplpAmacpf qqh	SFNDWAE TVSSFSMPVKA EYTP IANFLGKN-FV DAYNDAYVFY GKV LVG 333 KYNPVVIDFEMQPIHEVLRHTSLGPLEAKRQNLRRALDQYLMAAA---- 334 . : * : . : * . : : . * . : * * : : .

Figura 24. Alineamiento de la secuencias a modelar (dominio MACPF de BbiPLPA) con la secuencia del templado (qqh: cadena alfa de la proteína C8 del complemento humano). Los residuos conservados en todos los dominios MACPF se encuentran en colores.

Los resultados arrojados por el servidor TITO determinaron que entre el templado 2QQH y el dominio MACPF de BbiPLPA existe un núcleo en común de 11 fragmentos incluidos los residuos del motivo clave de este dominio.

El alineamiento mejorado permitió modelar con el programa Modeller los dominios MACPF de la BbiPLPA (Figura 25B) y BbiPLPB (Figura 25C) demostrando una buena homología con el templado de estructura conocida (Figura 25A) y la conservación en la estructura del motivo característico del dominio MACPF (Figura 25A, B y C en amarillo).

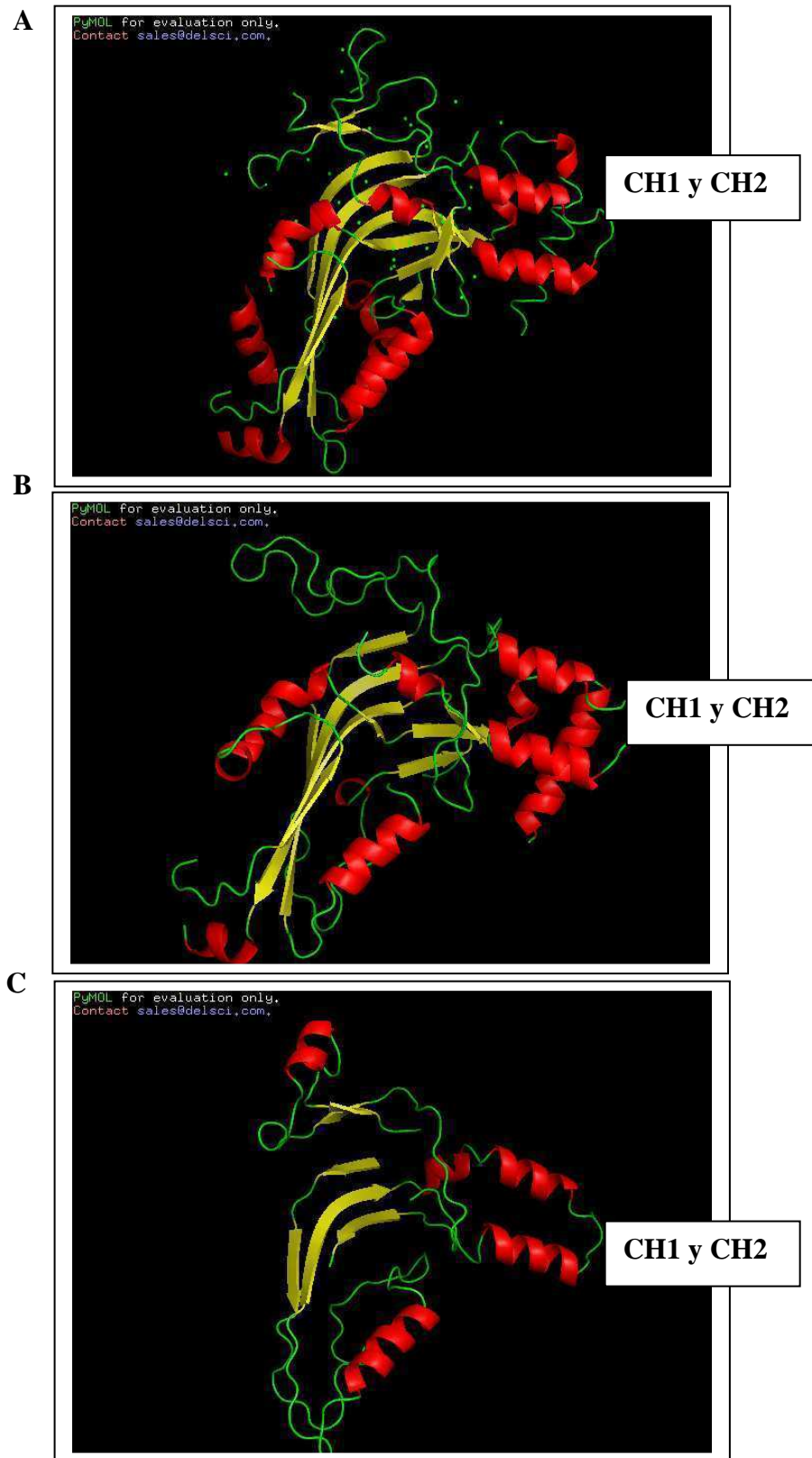





Figura 26. Estructura en tres dimensiones con la representación de la estructura secundaria realizada con el programa gráfico PyMOL. En rojo se pueden observar las hélices alfa y en amarillo las láminas beta características de los dominios MACPF de todos los eucariotas. A. Dominio MACPF de la subunidad alfa de la proteína C8 del complemento humano; B. Modelo de la estructura terciaria del dominio MACPF de la BbiPLPA y C. Dominio MACPF de la BbiPLPB.

Comparación estructural entre el templado y los modelos

Con el fin de validar los modelos obtenidos se realizó la superposición de la estructura del templado y de cada uno de los modelos obtenidos utilizando el servidor 3d-SS (3- Dimensional Structural Superposition)

El análisis de la similitud estructural dada por la medida por el RMSD. Esta medida indica la raíz cuadrada de la media del cuadrado de las distancias entre átomos equivalentes. El valor de RMSD de las estructuras predichas resultó ser menor que 1 para ambas, indicando que la predicción de la estructura del dominio MACPF ajustada al templado resultó tener una baja desviación (Figura 27).

A

PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
2QQH	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	
QHA3838_.MODEL.PDB	-		12.44	7.328	0.600	

B




PDB ID	Chain ID	Superimposes	Sequence identity (%)	Stamp score (Max 10)	RMSD (Å)	Color Scheme (Display)
2QQH	A	[Fixed Molecule]	100.00	10.000	-	
C2QQHA4179_.MODEL.PDB	-		16.79	2.941	0.751	

Figura 27. Superposición estructural entre el templado y de cada uno de los modelos obtenidos utilizando el servidor 3d-SS. A. Modelo del dominio MACPF de la BbiPLPA, B. Modelo del dominio MACPF de la BbiPLPB.

A pesar de la baja identidad secuencial de estos posibles dominios MACPF de *Babesia bigemina* con los dos dominios MACPF de la estructura cristalizada depositada en la PDB, la información contenida en la secuencia (a través de las búsquedas perfil- perfil) nos permitió encontrar una cierta homología estructural con un valor de E significativo. La comparación espacial entre las estructuras entre ambos templados y los dominios MACPF de BbiPLPA y BbiPLPB predichos, validó los resultados del modelado estructural.

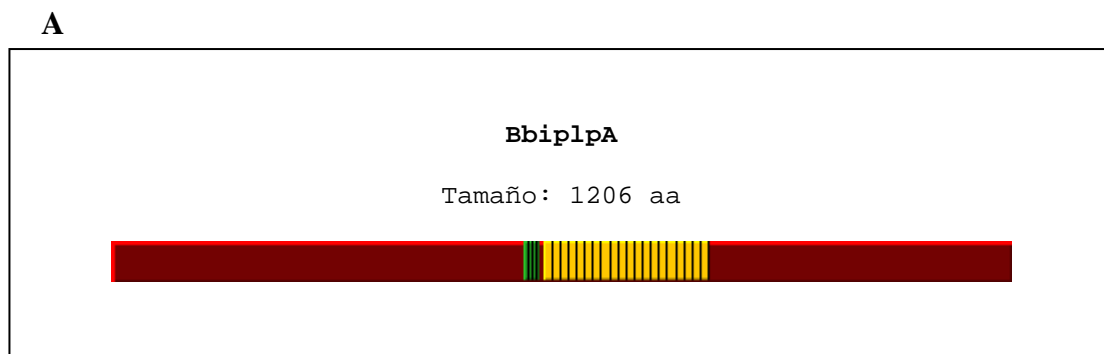
2. 2. 3. 3. Predicción de otros dominios: Repeticiones en tándem

Caracterización molecular de la BbiplpA

A partir del análisis de la anotación de la familia de proteínas con dominio MACPF en *B. bigemina* pudimos observar que la PLPA presentaba una región de repeticiones en tándem (Figura 28A) que fue detectada por el programa *Tandem Repeat Finder* (Benson, 1999). Los resultados de la identificación de repeticiones en el gen *Bbiplpa* mostraron una región repetitiva de 666 pares de bases con un periodo de 33 pb y 20,2 copias (Tabla 7 y Figura 28A). La traducción de esta región nos permitió definir bloques repetitivos de 11 aminoácidos (Figura 28B y 29B)

Índices	Tamaño del periodo	Número de copias	Tamaño del consenso	Porcentaje de nucleótidos idénticos	Porcentaje Indels	Score	A	C	G	T	Entropía (0-2)
1662--1720	15	3.9	15	88	0	91	59	11	13	15	1.62
1738--2404	33	20.2	33	97	0	1219	36	11	23	27	1.90

Tabla 7. Resultados arrojados por el programa *Tandem Repeat Finder*. En rojo: la repetición analizada



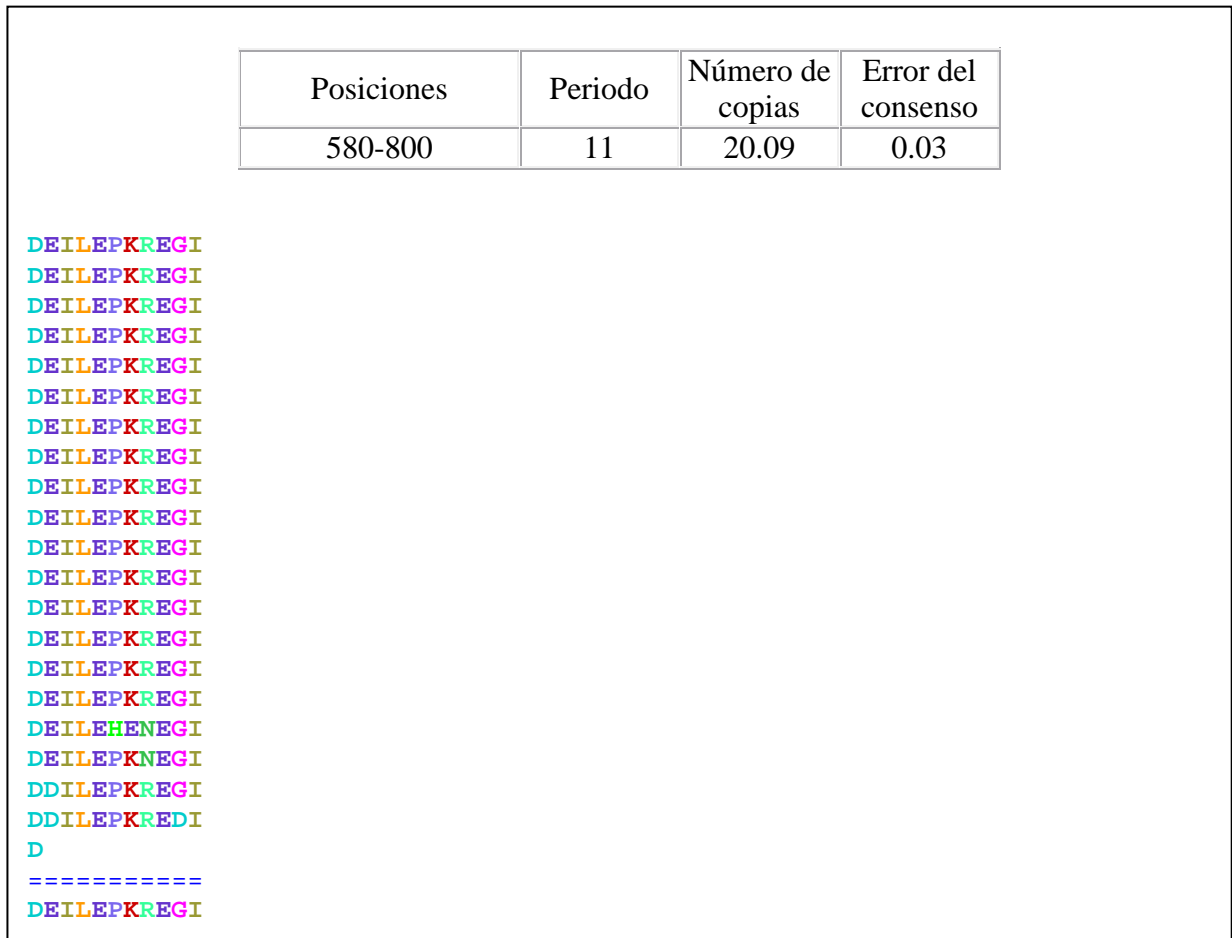
B

Figura 28. Predicción de repeticiones de la proteína BbiPLPA utilizando el programa XSTREAM. **A.** ubicación de las repeticiones en la proteína; **B.** Características de la repetición, secuencia repetitiva y consenso.

Figura 29. A. Secuencia codificante del gen *Bbiplpa* de la cepa del genoma (aislamiento australiano virulento). En rojo: los nucleótidos idénticos de la repetición (**GATGAAATTCTTGAACCTAAACGTGAGGGTATA**) y en azul: los variables. En violeta: oligonucleótidos específicos para amplificar la región repetitiva. B. Repeticiones en tándem (**DEILEPKREGI**) en la proteína BbiPLPA. En verde: dominio MACPF

Se estudió el polimorfismo de esta región repetitiva utilizando oligonucleótidos específicos. Los productos de la amplificación por PCR resultaron variables en tamaño (Figura 30).

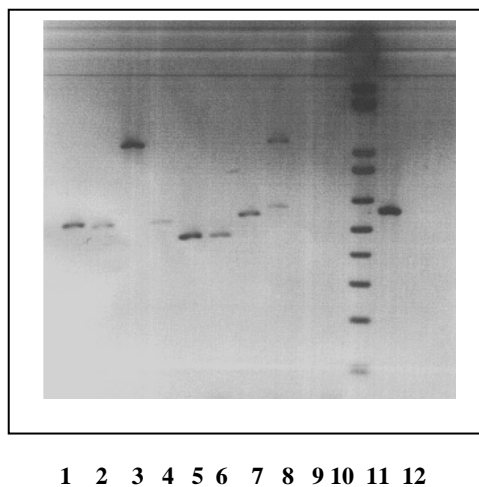


Figura 30 Amplificación de la región repetitiva del gen *Bbiplpa* en distintos aislamientos de *Babesia bigemina*. 1: BbiS2P, 2: BbiS1A, 3: BbiM1P, 4: BbiM1A, 5: BbiMx (JG29), 6: BbiMx, 7: BbiBr, 8: BbiM2P y *Babesia bovis* 9: BboS2P, 10: control sin ADN, 11: 1 kb Plus (Invitrogen), 12: BbiS3P

A partir de la secuenciación de los productos resultantes observamos que no solo existía un polimorfismo en cuanto al tamaño de la región repetitiva sino que el polimorfismo a nivel de secuencia fue notable. Este hallazgo nos permitió definir 24 variantes de la repetición. A esta repetición la denominamos *Perforin-like repeat* (PLR) (Tabla 8).

Repetición	Secuencia
1	DE I LE PKNEG I
2	* * * * * H * * *
3	* * * * * H * D *
4	* * * * * R * D *
5	* * * * * H * * M
6	* * * * * R * DV
7	* * * * * L * D *
8	* D * * * * R * D *
9	* D * * * * R * * L
10	* * * P * * * R * * L
11	* * * * * R * * L
12	* * * * * R * A *
13	* * * * * R * V *
14	* * * * * R * DM
15	* * * * * H * A *
16	* * T * * * * * * *
17	* * * * * H * DV
18	* * * * * R * * *
19	* * * * * R * S *
20	* * * * * R * DL
21	* A * * * * H * D *
22	* * * * H E * * * *
23	* D * * * * R * * *
24	* * * * * R D * *

Tabla 8. Repeticiones definidas en el análisis secuencial de los productos de cada aislamiento de *B. bigemina*.

El análisis de las repeticiones en aislamientos de referencia nos permitió definir dos patrones de repeticiones diferentes para los aislamientos atenuados (cepas vacunales) y para los aislamientos patógenos. Estos resultados podrían sugerir que estas repeticiones estarían asociadas a la atenuación o patogenicidad de la cepa, aunque para confirmar esta hipótesis es necesario realizar estudios de polimorfismo en otros genes.

Los resultados del análisis de las secuencias de aislamientos de campo del Noroeste Argentino (NOA) y Noreste Argentino (NEA) nos permitieron observar diferencias entre cada una de estas regiones. Las tres muestras analizadas del NEA presentaron el patrón de repeticiones de las cepas atenuadas lo cual sugeriría que estos animales están infectados con las cepas atenuadas consecuencia de la vacunación. Por otro lado, el patrón de repeticiones del NEA resulto ser diferente a todos los aislamientos analizados, estableciendo una nueva variante genotípica. (Figura 31).

<u>Aislamientos atenuados de Argentina</u>																						
BgS1A:	15	4	12	4	4	4																
BgM1A:	15	4	12	4	4	4																
BgS2A:	15	4	12	4	4	4																
<u>Aislamientos patógenos de Argentina</u>																						
BgS2P:	1	5	4	6	3	2	7															
BgS3P:	1	1	2	3	4	3	4	4														
BgM1P:	2	4	8	8	9	10	10	11	4	8	4	4	11	11	4	8	4	4	8	4	4	18
BgM2Pa:	2	4	8	8	9	10	10	11	4	8	4	4	11	11	4	8	4	4	8	4	4	18
BgM2Pb:	13	4	4	2	2	2	2	14														
<u>Aislamientos de México</u>																						
México:	16	2	2	2	2																	
Mx Kuttler peq:	16	2	2	2																		
Mx Kuttler G:	6	4	6	6	6	3	6	4														
Brasil:	1	1	1	6	17	3	3															
<u>Aislamientos de campo</u>																						
NEA:																						
Salinas 4:	15	4	4	12	4	4	4															
Mirunga 11:	15	4	4	12	4	4	4															
La Angela 822:	15	4	4	12	4	4	4															
NOA																						
139:	4	4	18	15	4	12	4	4														

Figura 31. Caracterización de aislamientos de referencia y aislamientos de campo.

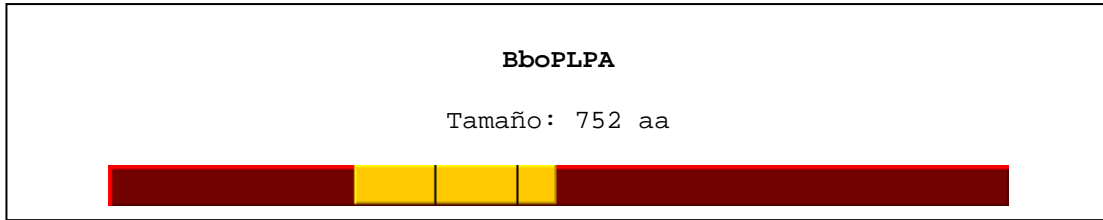
Caracterización molecular de la proteína Bboplpa

En *B. bovis* el gen ortólogo a *Bbiplpa* posee también río arriba del dominio MACPF una región de repeticiones en tándem. El análisis de la secuencia codificante del gen anotado en el NCBI utilizando los programas *Tandem repeat Finder* y el XSTREAM determinó que el período de la repetición es 2,5 donde el tamaño del bloque entero es 68 aminoácidos mientras que el bloque incompleto posee la mitad del número de aminoácidos. (Tabla 9, Figura 32 y 33)

Índices	Tamaño del periodo	Número de copias	Tamaño del consenso	Porcentaje de nucleótidos idénticos	Porcentaje Indels	Score	A	C	G	T	Entropía (0-2)
619--1121	203	2.5	204	98	0	963	38	12	28	21	1.89

Tabla 9. Resultados arrojados por el *Tandem repeat Finder* para el gen *Bboplpa*

A



B

Posiciones	Periodo	Número de copias	Error del consenso
207-374	68	2.47	0.01

DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPVHNMD

DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPVHNMD

DDPFYEEESEADNEGDKDWVDVNDEDLDDDDID

=====

DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPVHNMD

:

[D, 2]PFY[E, 3]SEADNEGDKDWVGVNDEDL[D, 3]ID[K, 2]PSEDNAIRKDEKNADESAHNEQ[G, 2]EYVNPVHNMD

Figura 32. Predicción de repeticiones de la proteína BboPLPA utilizando el programa XSTREAM. A. ubicación de las repeticiones en la proteína; B. Características de la repetición, secuencia repetitiva y consenso.

A

>gi|156085646|ref|XM_001610183.1| Babesia bovis mac/perforin domain containing protein (BBOV_II007150) mRNA, complete cds

```
ATGAACCAAAACCACGAAGACGAAGTGGCTCTGGCTATGCCGCCTCCCGTTCGAGGCTTGC GGAAAGCTATTAATAAT
AACAAACATCACACCACGGTACGCTACCAGTAGTAGCAACAATAGATCACATCATAGAATCCCAGAACAACA
GAAACAAATTACAATCCTAACATCAATTTTCATAGAAAGGTCACACTCCGATGCTAATAAAAACAAAGCGCAAACATGCA
AAAAAGATTATCGACAGGGCACGTTTCGATAATAGTGTGTTTAATACATCTTCACGAACGATGAGGGAAAGTGATTT
GACGGTTTGGATACCTTTGATGAAGAAAACGATTTTGGATGATAGCATTGTAGAATCTCCTAAATCAACAAATATAAAG
GGCGAATACATCGATGAAAGTGATTATAAAGATTATATGGATGACATTTTGTATGGTGTATGTACCTGAAAAGTCA
TTCATGGATGACATAGACGACAGAGGATCTTTAGATCTTCTAGATGACAACGTTAACAAAACTCACGTAAATATAAG
TTTGATAATCTAGATCCTGAGCAAGAAAGTGAAGATGATCTACTGTTGGCAGGCTATGACGATAACGATGGCGATGAT
CCGTTCTACGAAGAAGAAAGTGAAGCCGATAATGAAGGAGATAAAGATTGGGTTGGTGTAAACGATGAAGATCTCGAC
GATGATATAGATAAGAAGCCTAGTGAGGATAATGCTATACGTAAAGATGAGAAGAACGCCGATGAATCGGCGCACAAT
GAACAGGGTGGGGAATATGTTAATCCAAATCATAACATGGATGATGATCCATTCTACGAAGAAGAAAGTGAAGCCGAT
AATGAAGGGGATAAAGATTGGGTTGGTGTAAACGATGAAGATCTCGACGATGATATAGATAAGAAGCCTAGTGAGGAT
AATGCTATACGTAAAGATGAGAAGAACGCCGATGATCGGCGCACAATGAACAGGGTGGGGAATATGTTAATCCAAATC
ATAACATGGATGATGATCCATTCTACGAAGAAGAAAGTGAAGCCGATAATGAAGGGGATAAAGATTGGGTTGATGTAA
ACGATGAAGATCTAGACGATGATATAGATCTCCCCAACCACGAATTACCAGAGGATGCATCAATGGATGCAATGAT
GCATTTGGAAGATGAAGATGATGAAGATCATGGTGAAGATGAAGATGCTGATATAAATGAAGAAATAAATGATGTTGA
ATCACCAGTGGTCTTGAATACTTGGGAGCTGGATATGATCTTTTGAAGGGCAACCCGATGGGTGATACAATTATACT
ATTAGATCCGGGTTATAGAGCAAGTGTCTGTACAAATGCATTTGGCGTGATGACGCTGAAGGGCTTTCAAACAGTCCGCA
TTTTATTCAACCGAAGGGGGCTTGGGTGCGACTTATACGTATGTCACAAAGGTGAAACGATTTAGAGGTTGCAAA
GACTCAATCTCTGGATAATGTTCTATCTGCTGATGCTTACAGTATCTGCATCTTTACCAGGAGATAAATTTAAGTTTGC
TGCAATCAGTCAACTATAACAACATAAAGAAGGCTTATGACTCCAAGGGCGTAAATACATATGTAAGCAGGTCATACTG
TTTCAATTTTGTAGCGGGTATACCGATGCTATTAAATGGGACACAACCTCAAGCTTTCCAAGCCGATTGAAAGGTTT
GCCAAAAACATTTCAAGAAGAAGGCAATGGGTTGGTTTGGCCACCCTACGACTATCTTGTTCATCCACGTTCTCAGGC
GTGCAAAAGAGTTAGGAGTAACCGCATGGATGCAATTTTTACTGTATTTCGGCACGCACGTTACGACTAAAGTTTATCT
TGGAGGGAAGATGCTTACTATCATTTGAAACCAATCATCCCAAGAAGCTGACCTGAAAAAGAAGGGCATTGACGTAAA
AGCTGAACTGAGTGTCCAGGCTGAGGTAGCAACGGTTGATGCATCGGTTAACGCCAGCACGTTCCAGCCTTACAATAG
AGATACAGAAATCGTTGGATACTAAAAAGTCGATGTTTGTATAGGAGGTGATATATACGGGGACGGGAATACTATCGT
CTTCAATGACTGGGCTGCTACCGTTCCAGAAAATTCATGCCATAAAAGCTGAGTACACCCCGCTTGCATGATAAT
GGCCACGAATACATGAAAGCATAACAATGATGCCTATCTGTTTTACGGAAAGGTGTCAGTGGGTGCCGTATAG
```

B

>BboplpA

```
MNQNHEDVVALAMPPVRLRKAINNNNNITPRYATSSNNRSHHRIPEQTTETNYPNPNINFIERSHSDANKTK
RKHAKKDYRQGTDFDNSVFNTSSTNDEGSVFDGLDTFDEENDFDDSVESPKSTNIKGEYIDESDYKDYMDLILY
GDDVPEKSFMDIDDRGSLDLLDDNVNKNRSRYKFDNLDPEQESENDLLLAGYDDNDG
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDKPSEDNAIRKDEKNADESANHEQGGGEYVNPNNHMD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDKPSEDNAIRKDEKNADESANHEQGGGEYVNPNNHMD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDDIDSPPTHELPEASMDAMMHLEDEDEDHGENEDADIN
EEINDVESPSGLEYL GAGYDLLKGNPMGDTIILLDPGYRASVVQMHWRDDAEGLSNSRHFQPKGAWVRPYT
SCHKGETISEVAKTQSLDNVLSADASVSASLPGDKFKFAASVNYNNIKKAYDSKGVNTYVSRSYCFNFVAG
IPMSIKWDTTQAFQAALKGLPKTFQEEGNLVCHPYDYLVHPRSQACKELGVTAWMQFFTVFGTHVT
TKVYLGKMLTHIETKSSQEADLKKKGIDVKAELSVQAEVATVDASVNSTSSLHNRDTESLDTKKSMT
VIGGDIYGDGNTIVFNDWAATVPENSMPIKAEYTPLAMIMGHEYMKAYNDAYLFGKVSVGA
```

Figura 33. A. Secuencia codificante del gen *BboplpA*. En rojo se observan las repeticiones, en violeta y negra los oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 1167 pb que contiene la

repetición, BboplpArpt_Fnew y BboplpArpt_Rnew, respectivamente; **B.** Repeticiones en la secuencia de la proteína (rojo y naranja). En verde el dominio MACPF.

Los fragmentos amplificados a partir de ADN de distintas cepas de *B. bovis* entre las cuales se encontraban cepas argentinas y extranjeras resultaron ser de diferente tamaño, demostrando un polimorfismo en esta región repetitiva (Figura 34)

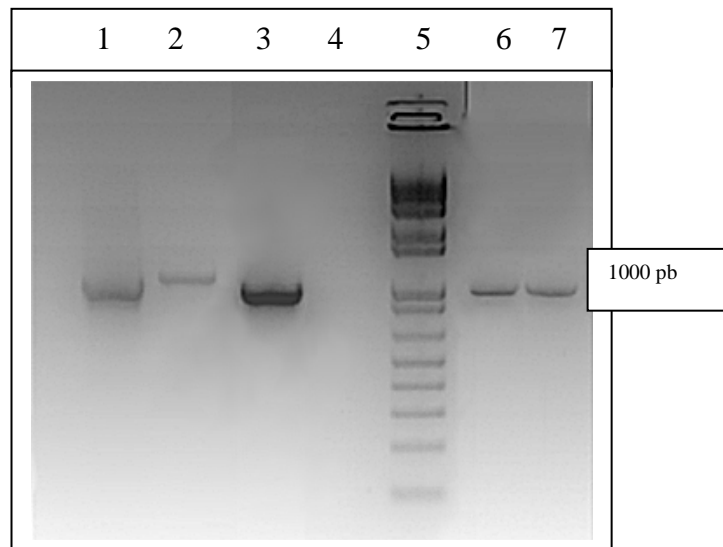


Figura 34. Amplificación de la región repetitiva de *Bboplp*. 1: BboR1A, 2: BboM2P, 3: BboBr1P 4: Control sin ADN 5: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen), 6: BboUy1P, 7: BboM1A.

La secuenciación de los productos de PCR nos permitió verificar el polimorfismo de secuencia en la región repetitiva de las distintas cepas de *B. bovis* estudiadas. Asimismo, el análisis de las repeticiones de las cepas argentinas mostró que en las cepas atenuadas el número de copias de la repetición fue menor reduciéndose a 1,5 (Figura 35).

Por otro lado, cuando analizamos el alineamiento múltiple de las secuencias repetitivas de todas las cepas analizadas pudimos observar que las diferencias a nivel de aminoácidos en algunas posiciones específicas (*snips* en la secuencia de nucleótidos) generaron dos grupos: el de las cepas extranjeras y el de las cepas autóctonas (Figura 36 y Figura 37).

```

>T2BBboPLPArpt
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPNHNMDD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPNHNMDD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVDVNDEDLDDDID

>Brasil1PBboPLPArpt
DDPFYEEESEADNAGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPNHNMDD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVDVNDEDLDDDID

>Uy1PBboPLPArpt
DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEYVNPNHNMDD
DDPFYEEESEADNEGDKDWVDVNDEDLDDDID

>R1ABboPLPArptF
DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDESTHNEPGGEYVNPDHNMDD
DDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID

>M2PBboPLPArpt
DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDESTHNEPGGEYVNPDHNMDD
DDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDESTHNEPGGEYVNPDHNMDD
DDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID

>M1ABboPLPArpt
DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDESTHNEPGGEYVNPDHNMDD
DDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID

```

Figura 35. Secuencias de aminoácidos de las repeticiones en las distintas cepas analizadas resultado de la secuenciación de los productos de PCR. La secuencia repetitiva de la BboT2B fue analizada a partir de la secuencia depositada en el NCBI.

```

M2PBboplArpt -----
M1ABboplArpt -----
R1ABboplArptF -----
T2bBboplArpt DDPFYEEESEADNEGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESAHNEQGGEY 60
BrasilBboplArpt -----
UyBboplArpt -----

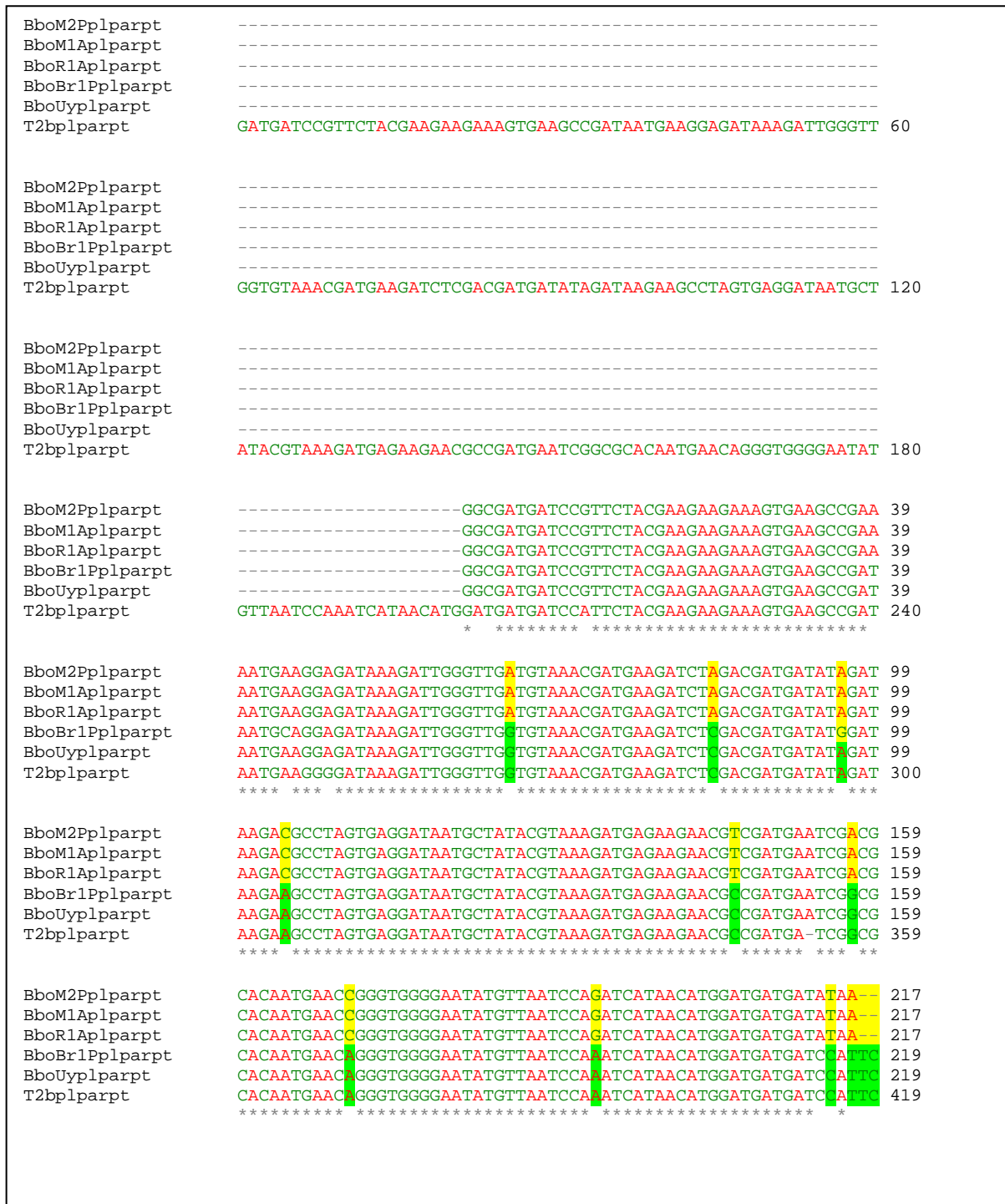
M2PBboplArpt -----DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDEST 52
M1ABboplArpt -----DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDEST 52
R1ABboplArptF -----DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDEST 52
T2bBboplArpt VNPNHNMDDDPFYEEESEAEENEGDKDWVGVNDEDLDDDIDKKPSEDNAIRKDEKNADESA 120
BrasilBboplArpt -----DDPFYEEESEADNAGDKDWVGVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNADESA 52
UyBboplArpt -----DDPFYEEESEAEENEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDEST 52
*****:* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

M2PBboplArpt HNEPGGEYVNPDHNMDDDDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDIDKTPSEDNAIRKDEKNVDEST 112
M1ABboplArpt HNEPGGEYVNPDHNMDDDDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID----- 100
R1ABboplArptF HNEPGGEYVNPDHNMDDDDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID----- 100
T2bBboplArpt HNEPGGEYVNPNHNMDDDDDPFYEEESEADNAGDKDWVDVNDEDLDDDID----- 168
BrasilBboplArpt HNEPGGEYVNPNHNMDDDDDPFYEEESEADNAGDKDWVDVNDEDLDDDID----- 100
UyBboplArpt HNEPGGEYVNPNHNMDDDDDPFYEEESEADNAGDKDWVDVNDEDLDDDID----- 100
*** *****:***** **:::*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

M2PBboplArpt EKNVDESTHNEPGGEYVNPDHNMDDDDINNEENESPEDEGDKDWVDVNDEDLDDDID 168
M1ABboplArpt -----
R1ABboplArptF -----
T2bBboplArpt -----
BrasilBboplArpt -----
UyBboplArpt -----

```

Figura 36. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las repeticiones de las cepas estudiadas de *B. bovis*. Se encuentran resaltadas las variaciones en las secuencias de aminoácidos entre aislamientos, en amarillo: variaciones correspondientes a las cepas argentinas y en verde: las variaciones correspondientes a las cepas extranjeras.



2. 2. 4. Historia evolutiva de la familia del tipo perforina en el phylum Apicomplexa

2. 2. 4. 1. El dominio MACPF en el phylum Apicomplexa

Como fue descrito anteriormente, el dominio MACPF está distribuido en proteínas de un amplio rango de eucariotas. En el caso de los eucariotas inferiores y particularmente en el phylum Apicomplexa este dominio forma parte de proteínas pertenecientes a una familia cuyos miembros cumplen un rol importante en la entrada y salida del parásito de las células del hospedador aunque se ha reportado en el género *Plasmodium* que existe una baja homología entre genes parálogos, mientras que la homología entre ortólogos de las distintas especies es mayor (Kaiser y col., 2004). Esto sugiere que los parálogos en cada uno de los organismos podrían tener un rol diferencial. Con el objeto de comprobar este comportamiento en *Babesia* spp. analizamos la homología entre los dominios MACPF de *B. bovis* y *B. bigemina*. El alineamiento entre los dominios MACPF de los parálogos en *B. bovis* y *B. bigemina* demostró la baja identidad entre ellos, con valores de entre 20 y 30 %, observándose solo la conservación de los residuos característicos del dominio MACPF (Figura 38).

A

```
BboplAmacpf      FKFAASVNYNNIKKAYDSKGVNTYVRSYCFNFVAGIPMSIKWDDTQAFQAALKGLPKTF 60
BboplCmacpf      GSGALRAGYTDISGKTQHISSKQYTNSYYCFTYAAGMPYPFNWETTSDFDIALNELPKEV 60
BboplBmacpf      FFSASAGYKNMVRTLATNETKNIYLKTYCLRYVAGIQDFLNIPTESFVYDVSQLEPKF 60
BboplFmacpf      --LSASINSMADDKPTS KHTVNYRIAKSFCAIRESGIMVPFTGKISSVFKEVEALPSIN 58
BboplDmacpf      VAFSASAKYKNASEKLAHKTERMDTTSSFMEAMKS-----LEPLPDTV 43
3BboplEmacpf     AKFALSAEITVFCWKLRCPESTESSKLEVKQGKRVCS-----AFKKSFQNA TKELKPNF 53
2BboplEmacpf     ----GSGIFKSNHKTVNTRDDIYNKLLKSRNVLVR-----KYRLKECQGF 42
1BboplEmacpf     -LVSILSEDEVESFLGIANFQVNYVMQNKELIAGMEDIVKHKHM--VTRAFENATKEIESYP 57

BboplAmacpf      QEEGNGLVCHPYDYLVHPRS---QACKELG-VTAWMQFFTVPFGTHVTTKVYLGGKMLTII 116
BboplCmacpf      KS-----FDQCTVELYK---KKS KCGSISKWVDFFLQFGTHVTTEIQGGKIIRLL 109
BboplBmacpf      HDG-----ECLLEVYRNDPEDEK CASVVRP WMKFFQKYGTHFTTVIHLGGKVTNQI 111
BboplFmacpf      EDYG-----PCTP DVFIVDPLKSDCSS-MHQVVKFFKRYGTHMTSHITIGGQIISID 109
BboplDmacpf      KK-----MCSAHDMIDDMTKSECIP-LKKWIKFFEMFGTHYVHQLLLGGKLIQTL 92
3BboplEmacpf     KKAAT-----ECTTIRYAINPEYDCKE-VKPWMLFEMFGTHFTYNIKIGGRLTKIS 105
2BboplEmacpf     KVA-----DCPTEK YVENMDDESCSGCISWWRFFADYGTHVTRRISMGGIFRRFS 93
1BboplEmacpf     DKE-----KCDTQEKYLSDAECKNYCELWKKFFMNYGTHVISRI TMGGKILQMD 106
                .                .                *  : *  : ***  : : **

BboplAmacpf      ETKSSQ--EADLKKK--GIDVKAELSVQAEVAT-VDASVN--ASTSSLHNRDTESLDTKK 169
BboplCmacpf      TIPNNA--MDSFLKS--GLN--VDVAVKAVISG-ALLEVN--EKLNSEQQKAIKELQDDS 160
BboplBmacpf      QIDKKD--VAKLQKD--GYNDVMIKSGSISPVKVGGGFS--HEKKEESSNFSSLQTEK 165
BboplFmacpf      RMVEGEKITKMKVKTLL--GGGESIYKVTDKFSSVMTGKRES--HQMLILGGYYFSGLESND 165
BboplDmacpf      KINASKLQALKNDSI--DVDLVVSSVLGSSASLLADKVVNKYKLDELGAKSITVIGGNM 150
3BboplEmacpf     QVNLNKKTNTNMNSVNAGATTQVRNELFGASAGVGLSKGSTKDNTENISFTYVNVLGGRT 165
2BboplEmacpf     NVSNRESKRDASKQKTTIKKSSSWFHLVKKKSKKTKSSSKVSSEGEKHDLVQYTVGPEP 153
1BboplEmacpf     EMENTANENAESNDK--KHNL SVNVGVLGSGFNLNNTNEKQQK EKVKKKNGKFFIMGGDT 164
                .                .                :

BboplAmacpf      SMFVIGGDIYGD-GNTIVFNDWAATVPENSMPIKA EYTPLAMIMG-HEYMKAYNDAYLFY 227
BboplCmacpf      -----LLKWKSTVPIFMPPIRTIYAPLDMFIH-SSYKEAYRNALNFY 201
BboplBmacpf      LVIVIGGDVPTDGTDKT TML EWTKSLYRKPMPIKVNIESIKTLIDGHEKKKSFD TALKYY 225
BboplFmacpf      -----SKAFNRWSKSVWERPMPPIRANFTSLEHFMG--DKSKSYQHAVRFY 208
BboplDmacpf      PN-----TPITDAEYAIWGNSVAENPMPIGIVGDSLKNLMD-KNL RDSYSLAIHKY 200
3BboplEmacpf     IG-----NVEDENEYLEWINSIPEHPMP IRNQLAPLAKLFDSEELKET YDDAMEYY 216
2BboplEmacpf     HN-----ESMAPDVFEDWVRDVALNPVPIDVEYQPLSEIMMENQAKNLYAKAIEYY 204
1BboplEmacpf     FIP-----VDTPEGFRDWVDSIKENSMPINVELTPMSQFMP-IGIRRHWFALKSY 214
                *  :  . : **  . : :  :  *  *
```

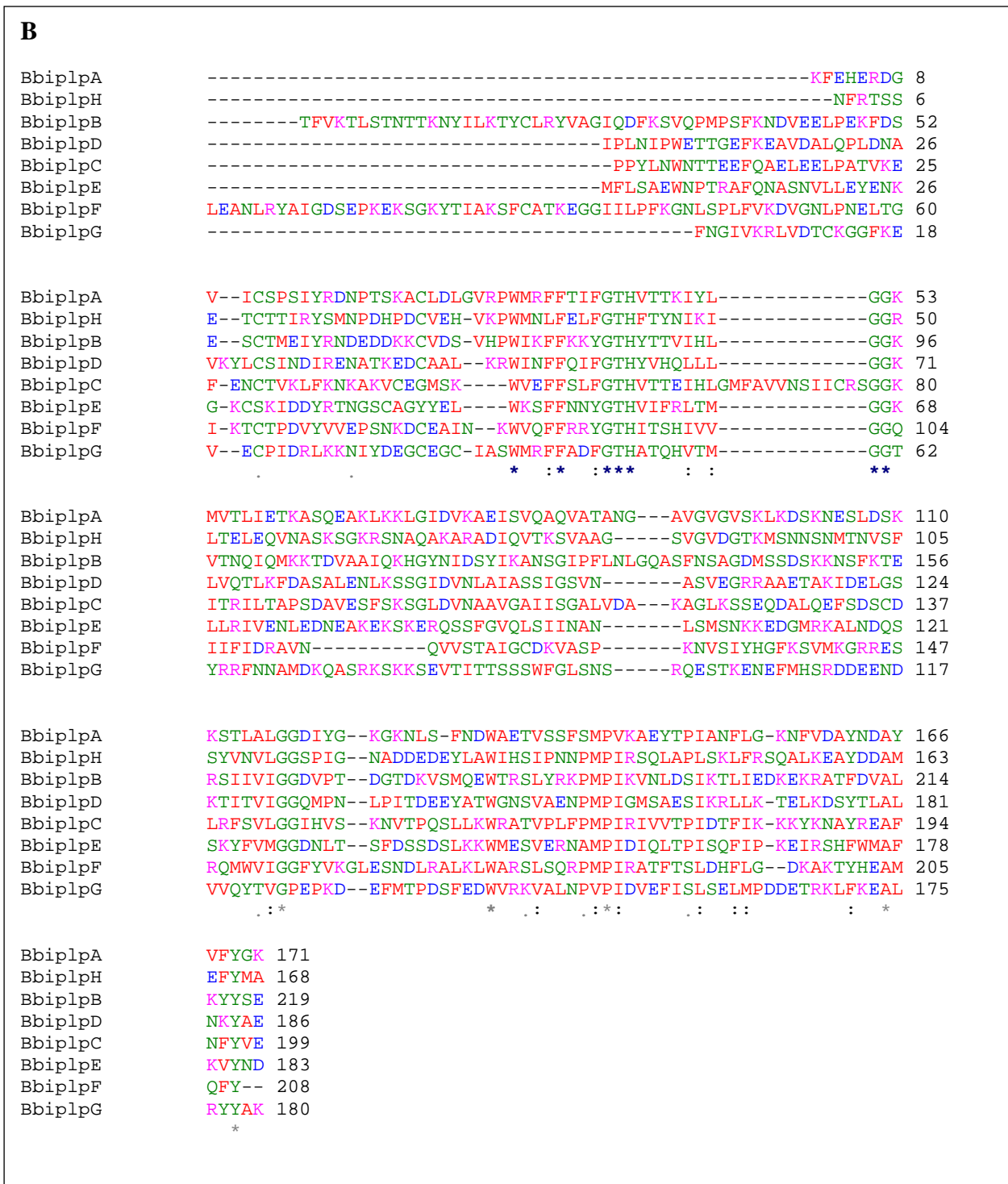


Figura 38. A. Alineamiento múltiple de los dominios MACPF de *B. bovis*; B. Alineamiento múltiple de los dominios MACPF de *B. bigemina*. Los asteriscos azules indican la única zona conservada en los dominios MACPF de las proteínas parálogas correspondientes al motivo característico del dominio.

Además, se comprobó que al igual que en *Plasmodium* spp., en *Babesia* spp. existe mayor identidad entre las PLPs ortólogas de las distintas especies. El análisis de a pares entre las

proteínas ortólogas de *B. bigemina* y *B. bovis* resultó en porcentajes de identidad que varían entre 36,6% (BbiPLPE/BboPLPE1) y el 63,13% (BbiPLPB/BboPLPB) (Figura 39).

A

Par de ortólogos	Identidad (%)
BbiPLPA/BboPLPA	59,76
BbiPLPB/BboPLPB	63,13
BbiPLPC/BboPLPC	48,73
BbiPLPD/BboPLPD	54,89
BbiPLPE/BbiPLPE1	36,46
BbiPLPG/BboPLPE2	50,68
BbiPLPH/BboPLPE3	48,6
BbiPLPF/BboPLPF	59,64

B

```

BbiplpBmacpf  -----TFVKTLSTNTTKNYILKTYCLRYVAGIQDFKSVQPMPSFKNDVEELPEKF  50
BboplplBmacpf  FFSFASAGYKNMVRTLATNETKNYILKTYCLRYVAGIQDFLNIEPTESFVYDVSQLEPKF  60
                    .:***:*** *****:***:***  .:*** **  **_.*****

BbiplpBmacpf  DSECTMEIYRNDEDDKKCVDSVHPWIKFFKKYGTHYTTVIHLGGKVTNQIQMKKTDVAA  110
BboplplBmacpf  HDGECLELVYRNDPEDEKCAVVRPWWKFFQKYGTHFTTVIHLGGKVTNQIQIDKDKDAK  120
                    .._* :***:*** :***:***_*:*:***:*****:*****:***:***_*_*

BbiplpBmacpf  IQKHGYNIDSYIKANSVIPFLNLGQASFNAGDMSSDSKKNFSTERSIIVIGGDVPTDG  170
BboplplBmacpf  LQKDGYNIDVMIKSGS-ISPVKVGGG-FSHEKKEESSNFSSLQTEKLVIVIGGDVPTDG  178
                    :**_.***** **:_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*

BbiplpBmacpf  TDKVSMQEWTRSLYRKPMPKIKVNLDSIKTLIEDKEKRATFDVALKYYS  219
BboplplBmacpf  TDKTMMLEWTKSLYRKPMPKIKVNIESIKTLIDGHEKKKSFDTALKYY--  225
                    ***_.* ***:*****:*****:***: **_.*****
  
```

```

BbiplpEmacpf  -----MFLSAEWNPTRAFQNASNVLLLEYENKG  27
1BboplplEmacpf  LVSILSEDVESFLGIANFVNVVMQNKIAGMEDIVKHKMNVTRAFENATKEIESYDPKE  60
                    ::_.* ****:***: :_*_*_*

BbiplpEmacpf  KCSKIDDYRTNGSCAGYYELWKSFFNNGYTHVIFRLTMGGKLLRIVENLEDNEAKEKSKE  87
1BboplplEmacpf  KCDTQEKYLSDAECKNYCELWKKFFMNYGTHVISRITMGGKILQMDMENTANENAESND  120
                    **_.*:** :*:**_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*

BbiplpEmacpf  RQSSFVQVLSIINANLSMSNKKEDGMRKALNDQSSKYFVMGGDNLTSFDSSDSLKKWMES  147
1BboplplEmacpf  KKHNISVNVGVLSGSFNLNNTNEKQKQEKVKKKNGKFFIMGGDTFIPVDTPPEGFRDWD  180
                    :*:**_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*

BbiplpEmacpf  VERNAMPIDIQLTPISQFIPKEIRSHFWMAFKVYND  183
1BboplplEmacpf  IKENSMPINVELTPMSQFMPIGIRRHWFALKSY--  214
                    :*:**_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*_*
  
```

Figura 39. A. Análisis de a pares entre proteínas ortólogas de *B. bigemina* y *B. bovis*. B. Alineamientos entre BbiplE/BbiplE1 y BbiplB/BboplB.

Para extender el análisis de los genes *plp* ortólogos a organismos relacionados, realizamos una búsqueda a través de BLASTP en los genomas de *Theileria annulata* y *Theileria parva*. Estos parásitos son causantes de la fiebre de la costa este y la theileriosis tropical en el ganado bovino y en los búfalos enfermedades transmitidas por las garrapatas del género *Rhipicephalus* (*T. parva*) y *Hyalomma* (*T. annulata*). Una vez que el vector infectado se adhiere al hospedador los esporozoítos infectan linfocitos dentro de los cuales se convierten en esquizontes y luego de un proceso de división celular se producen merozoítos que invaden los eritrocitos. Esta es una de las características por las cuales se los incluye en el orden Piroplasmida al igual que *B. bovis* y *B. bigemina*.

La búsqueda de proteínas con dominio MACPF en los genomas de *Theileria* spp. nos permitió identificar seis proteínas homólogas con dominio MACPF (ortólogas a las seis proteínas de *B. bovis*) y ocho en *T. parva* (ortólogas a las ocho proteínas anotadas por nosotros en *B. bigemina*) (Tabla 10).

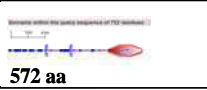
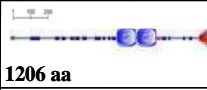



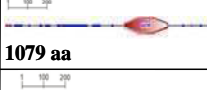
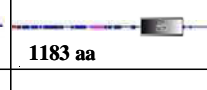
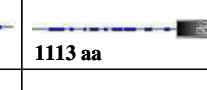



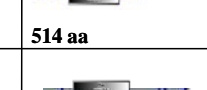

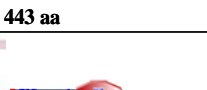

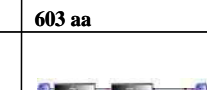




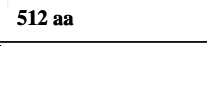
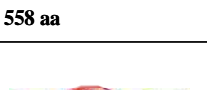
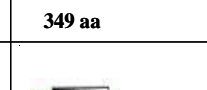
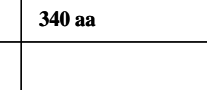
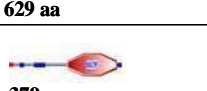

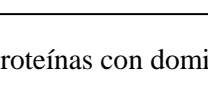

PLP	Bbo	Bbi	Tp	Ta
A	 572 aa	 1206 aa	 812 aa	 817 aa
B	 972 aa	 1079 aa	 1183 aa	 1113 aa
C	 559 aa	 573 aa	 442 aa	 514 aa
D	 420 aa	 443 aa	 498 aa	 603 aa
E	 1272aa	 450 aa	 353 aa	 1219 aa
F	 512 aa	 558 aa	 349 aa	 340 aa
G		 629 aa	 356aa	
H		 379aa	 353aa	

Tabla 10. Comparación de las proteínas con dominio MACPF en *Babesia* spp. y *Theileria* spp.

Al mismo tiempo, observamos que la mayor similitud entre ortólogos se extiende a nivel de orden ya que existen pares de ortólogos de *Theileria* spp. y *Babesia* spp. para cada una de las proteínas de la familia de las PLPs. Un hallazgo importante fue que el ortólogo de BboPLPE en

T. annulata posee tres dominios MACPF y el orden de estos dominios se mantiene en ambas proteínas observándose mayor similitud entre los dominios ortólogos que entre los dominios de la misma proteína de un mismo organismo. En contraste, hallamos en *T. parva* el ortólogo de la PLPE de *B. bigemina* y dos proteínas adicionales que mantienen mayor identidad entre los ortólogos de la BbiPLPG y BbiPLPH. Además las proteínas PLPE, G y H de *B. bigemina* y *T. parva* presentaron homología con cada uno de los tres dominios MACPF de las proteínas PLPE de *B. bovis* y *T. annulata*.

Asimismo, el análisis de a pares entre las secuencias de aminoácidos de las PLPs de *B. bovis* y las dos especies de *Theileria* demostraron que hay una mayor similitud e identidad entre la mayoría de las proteínas ortólogas de *Theileria* spp. (entre 67, 4% y 81, 7% de similitud y 60,3% y 73,9% de identidad) mientras que en el caso de la PLPE los valores de similitud e identidad resultaron inferiores (25,1% similitud y 23,6% de identidad). Estas diferencias radican en la variación en los tamaños de las dos proteínas analizadas y el número dispar de dominios presente en cada una de ellas. Este resultado puede ser sustentado por el hecho de que la similitud e identidad entre la BboPLPE y TaPLPE son mayores que las arrojadas del análisis de las mismas proteínas en *T. parva* y *T. annulata* y esto se encuentra directamente relacionado con la presencia en ambas proteínas de los tres dominios MACPF (Tabla 11).

PLP	PLPA Similitud (Identidad) %	PLPB Similitud (Identidad) %	PLPC Similitud (Identidad) %	PLPD Similitud (Identidad) %	PLPE Similitud (Identidad) %	PLPF Similitud (Identidad) %
Bbo/Ta	35,9(26)	41,9 (31,2)	41,5 (28,7)	33,5 (24,5)	35,7 (23,7)	24,5 (15,2)
Bbo/Tp	36,9 (26)	38,9 (28,9)	38,4 (26,4)	38,7 (28,8)	14,8 (10,7)	24,9 (15,7)
Ta/Tp	74,4 (65)	67,4(60,3)	77,6 (73)	68,7 (65,3)	25,1 (23,6)	81,7 (73,9)

Tabla 11. Análisis de a pares de secuencias de las PLPs de *B. bovis* (Bbo), *T. parva* (Tp) y *T. annulata* (Ta). En azul se encuentran las similitudes e identidades más bajas.

2. 2. 4. 2. Análisis filogenético del dominio MACPF en Haemosporida y Piroplasmida

El phylum Apicomplexa posee varios organismos que infectan un amplio rango de animales. Uno de los géneros más relevantes a nivel de salud pública de este phylum son los parásitos del género *Plasmodium* pertenecientes al orden Haemosporida. Este género presenta un amplio rango de hospedadores vertebrados. Entre las especies de mayor importancia se encuentran *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* que infectan humanos, *Plasmodium yoelii* y *Plasmodium berghei* que infectan roedores. Otros dos parásitos apicomplejos pertenecientes a la familia Sarcocystidae considerados de gran importancia en salud pública y veterinaria son *Toxoplasma gondii*, utilizado como modelo de estudio de este phylum y *Neospora caninum* un parásito que afecta a perros y bovinos.

En la introducción de este trabajo de tesis se ha descrito que los organismos nombrados anteriormente poseen proteínas con dominio MACPF, estas proteínas y las de Piroplasmida (*Babesia* y *Theileria*) presentan una gran divergencia de secuencia por fuera del dominio lo cual dificulta la reconstrucción de la historia evolutiva de esta familia en el phylum.

Por tal motivo, realizamos un análisis filogenético de los dominios MACPF de cada una de las PLPs de *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. annulata*, *T. parva* (orden Piroplasmida) (Tabla 12A) y *P. falciparum* y *P. yoelii* (Haemosporida) (Tabla 12B). Los dominios MACPF de las proteínas de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* (Tabla 12C) fueron utilizados como grupo externo en la reconstrucción filogenética.

A

<i>Bbo</i>	<i>Bbi</i>	<i>Ta</i>	<i>Tp</i>	PLP
XP_001610233.1 (BBOV_II007150)	BbiPLPA	TA11680	TP02_0166	PLPA
XP_001609302.1 (BBOV_IV001370)	BbiPLPB	TA019210	TP01_0164	PLPB
XP_001609721.1 (BBOV_II001970)	BbiPLPC	TA07905	TP04_0335	PLPC
XP_001609726.1 (BBOV_II002020)	BbiPLPD	TA07910	TP04_0337	PLPD
XP_001611176.1 (BBOV_III000410)	BbiPLPE	TA18285	TP03_0798	PLPE
XP_001611167.1 (BBOV_III000320)	BbiPLPF	TA18325	TP_0810	PLPF
	BbiPLPG		TP03_0799	PLPG
	BbiPLPH		TP03_0801	PLPH

B

<i>Pf</i>	<i>Py</i>	PLP
PFD0430c	Py00454	PLP1
PFL0805W	PY00181	PLP2
PFI1145W	PY05180	PLP3
PF08_0050	PY03076	PLP4
PF08_0052	PY03943	PLP5

C

<i>Tg</i>	<i>Nc</i>	PLP
TGGT1_111620	NC_LIV_103580	PLP1
TGGT1_016570	NC_LIV_081590	PLP2
	NC_LIV_103830	PLP3

Tabla 12. Secuencias anotadas en la base de datos de genes de referencia RefSeq del NCBI y anotadas en este trabajo de tesis (*B. bigemina*) a partir de las cuales se extrajeron los dominios MACPF para el análisis filogenético **A.** *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. annulata* y *T. parva*; **B.** *P. falciparum* y *P. yoelii*; **C.** *T. gondii* y *N. caninum*.

Aun cuando existe una mayor homología en la región del dominio entre las secuencias analizadas, esta no es heterogénea, presentando incluso regiones donde es poco confiable establecer hipótesis de homología posicional entre los aminoácidos. Por ello se utilizaron programas de alineamiento múltiple que se ajustan a las características de las secuencias de estudio.

En tal sentido, el programa DIALIGN de alineamiento múltiple de secuencias fue de gran utilidad debido a que este funciona de manera óptima con secuencias que solo poseen homologías locales. El alineamiento de las 42 secuencias del dominio MACPF de Piroplasmida y Haemosporida y de 4 secuencias de *T. gondii* y *N. caninum* (el dominio de la proteína NcPLP3 no se incluyó en el grupo externo debido a su gran divergencia) generó 429 posiciones enriquecidas en *gaps*. Por lo tanto, el alineamiento fue recortado con el programa TrimAl el cual filtra los *gaps* teniendo en cuenta el contexto filogenético de las secuencias en estudio (Figura 40).

```

          10          20          30          40          50          60
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
BbiplpA -----
BbiplpB -----TFVKTLSTNTTKNYILKTYCLRY
BbiplpC -----
BbiplpD -----
BbiplpE -----
BbiplpF -----L-----EANLRYA-----IGDSEPKEKSGKYTIAKSFCAIK
BbiplpG -----
BbiplpH -----
Bboplpa F-----KF-----AASVNYN-----NIKKAYDSKGVNTYVSRSYCFNF
Bboplpb F-----SF-----SASAGYK-----NMVRTLATNETKNYILKTYCLRY
Bboplpc -----GSG-----ALRAGYT-----DISGKTQHISSKQYTNYSYCFY
Bboplpd -----VAF-----SASAKYKNASEK-----LAHKTERM-----
Bboplpe_1 lvsilsedvesflgianfgVNYvmQNK-----EIAMMEDIIVKHKM-----
Bboplpe_2 gsgif-KSN-----HKTVNRDDIYN-----KLEKSRNVLVRKYRl---
Bboplpe_3 -----AKF-----ALSAeitvfcwklrcp-----STESSKLEVKQGKRVCS--
Bboplpf -----L-----SASINSM-----ADDKPTSKHTVNYRIAKSFCAIR
Taplpa F-----KF-----SASAKFK-----KLEDASKSRNSKVYINKSYCFKY
Taplpb F-----SF-----SASTGYK-----NFVKSTASNKVRYITKTYCLRY
Taplpc -----GTG-----SLNTQYQ-----ELKADSENKKNKLYTNTYCFY
Taplpd -----NSF-----TGSLEYKNAVMNSKyacNFLHDFRSKRQKIYNKTEQCVR
Taplpe_1 -----VNYEYKLENKSLN-----KLLTRNNLRRIKKNCSIH
Taplpe_2 -----Y-SSY-----NNNEYTHDDMLH-----TLNKYKLLIKTYKIVY
Taplpe_3 -----AKF-----SLSANYS-----EINDLLKNNKNIYVDKSYCFLL
Taplpf ddfslDNPF-----S-EEIWNR---NAKG--LGLNDITFHKn-----NLY
Tpplpa F-----KF-----SASAKFK-----KLQDVSKSGKSKMFINKSYCFKY
Tpplpb F-----SF-----SASTGYK-----NFVKSTATNKVRYITKTYCLRY
Tpplpc -----GTG-----SLNTQYQ-----ELKKDSEHTNNKL-----
Tpplpd -----NSF-----TGSLEYKNALMN-----FKSKRQKIYNKTEQCVR
Tpplpe -----VNYEHKLENKSLN-----KLLTKNNLSIKKNCSIH
Tpplpf -----ELWNR---NSKG--LGLNDITFNKSKFKIVKCYCSLY
Tpplpg -----Y-SGY-----NNDEYTHDDMLH-----NLNKHNNLLIKSYKIVY
Tpplph -----AKF-----SLSTNYS-----EISDLLKNNDNKLYVDKSYCFLL
Pfp1p1 -----ASF-----SASTGYS-----SFLHEVTKRSKKTFLVKSNVCVY
Pfp1p3 -----GSF-----SASTGYK-----SVSNTISKNKFRMFMLKSYCFKY
Pfp1p2 Y-----SF-----SASAEFK-----NALKKLKQNNVIFLMKTYCLRY
Pfp1p4 -----KPF-----SASMPYK-----SYFADLEIKKKKYALAQNMCVLN
Pfp1p5 -----HPF-----N-DSNYY-----KMLVKRINRGDSIIIEKKLCSKY
Pyplp1 -----GSF-----SASTGYK-----KFINEISKRTSKTYFIKSNCIKY
Pyplp2 Y-----SF-----SASAGYK-----NALKKLKIQNSIIFMMKIYCLRY
Pyplp3 -----GSF-----SASVGYT-----SASNTISKKKFRMFIKSYCFKY
Pyplp4 -----NPF-----SASIPYK-----GYFTDLEIKKKRYIVAENTCLHS
Pyplp5 -----HPF-----N-SSNYY-----RMLVERIEKGYSIIDKKICSKY
Tgplp1 -----
Tgplp2 q-----
Ncplp1 -----
Ncplp2 -----

```

```

          70          80          90          100          110          120
=====+=====+=====+=====+=====+=====+
BbiplpA -----KF---EHERDGV
BbiplpB VAGIQDF-KSVQPM-----PSFKNDVE-----ELPEKF---DS---E
BbiplpC ---PPY-LNWNTT-----EEFQAELE-----ELPATV---KEFENCTV
BbiplpD ---IPLN-IPWETT-----GEFKEAVD-----ALQPLD---NAVKYL--
Bbiplpe ---MFLS-AEWNPT-----RAFQNASN-----VLLE-Y---ENKGKCSK
Bbiplpf EGGIILP-FKGNLS-----PLFVKDVG-----NLPNEL---TGI-K--T
Bbiplpg -----FN-----GIVKRLVDTCGGF---KE----V
Bbiplph -----NF---RTSSE--T
Bboplpa VAGIPMS-IKWDTT-----QAFQAALK-----GLPKTF---QEENGLV
Bboplpb VAGIQDF-LNIEPT-----ESFVYDVS-----QLPEKF---HD----G
Bboplpc AAGMPPY-FNWETT-----SDFDIALN-----ELPKEV---KSPDQCTV
Bboplpd -----DTT-----SSFMEAMK-----SLEPLP---DTVKKM--
Bboplpe_1 -----NVT-----RAFENATK-----EIES-Y---PDKKCDT
Bboplpe_2 -----KECQGF---KV----A
Bboplpe_3 -----AFK-----KSFQATK-----ELKPNF---KKAAT---E
Bboplpf ESGIMVP-FTGKIS-----SVF IKEVE-----ALPSIN---EDYGP--
Taplpa VAGISTS-LNWDLT-----LGFQSSLK-----RLSTEF---KGFEKNSM
Taplpb VGGIIVD-HSLETT-----EEFKKAVA-----ALPDRF---DS----H
Taplpc AAGIPPT-LDWNTT-----EDFNLSVS-----ELPKKI---KDYEKCTP
Taplpd QVGIPLN-LKWEYT-----EYFNHIVS-----KLPVLS---SKLIEN--
Taplpe_1 TSGMIIS-YQWNLK-----KSILILLN-----KIQNKLVDNSGHSS--S
Taplpe_2 KANLTTL-DFLKNI-----NDEnre-NSDDIFILKVLRIYKNCNSEF---DS----Q
Taplpe_3 EAALPIH-NSLKIT-----KSFATAMN-----KLSKDF---SNHTK---D
Taplpf ESGLIIP-FKGELNkfsELNNDVELVD-----KLPNTI---ETSSECP
Tpplpa VAGISTS-LKWDFT-----LGFQSSLG-----RLSD-F---KGLEKDSI
Tpplpb VGGIIVD-HSLDTT-----DEFKAVE-----ALPDKF---DS----H
Tpplpc -----STT-----EDFNLSVS-----ELPKKI---KDYEKCTP
Tpplpd QVGIPLN-LKWGYT-----EYFNRTLS-----RLPILS---SKVIKN--

```

```

TpplpE TSGMIIS-YQWKLK-----KISISILLN-----DIQNKLVKDSGHTS--N
TpplpF ESGLITP-FHGELR-----GEFVEMVG-----KLPNTV---E-STECP
TpplpG KANLTSL-NFLKNK-----NNDEIGLNFNGMLILNVLKKLNKNCNSEF---DN-----Q
TpplpH EAALPIH-NSLKMT-----RSFATAMS-----KLTRDF---KKHTK--D
Pfplp1 TIGLPPY-IPWDKT-----TAYKNAVN-----ELPAVF---TGLDKESE
Pfplp3 VASLSQY-SQWKLT-----DQFVRAIS-----LLPSHF---NSLEKDGT
Pfplp2 YTGIPITTSYKFS-----ENFNKALS-----KLPKYF---DGLREDSK
Pfplp4 YATYDLK-ESGN-----NINKDFVLDIE-----KLPILT---K--Nqm-K
Pfplp5 FSFINDI-NKNDDL-----TFFLTLLN-----ELGDNY---QNIKDDTY
Pyplp1 TIGLPPY-VPWEQT-----TAYMNAVD-----ILPREF---TGLDEDSE
Pyplp2 YTGIPITMTKWEFT-----DNFRNALN-----KLPHTF---DGLKEDNE
Pyplp3 VASLSQY-SQWKLS-----DQFLRAID-----LLPSYF---NSLEHDGK
Pyplp4 YATYSLR-ESTK-----NINSDFLLDTE-----SLPILS---K--NITEK
Pyplp5 FVALKNV-DNSKLD-----PFFISMLN-----DLEKNY---NNININKY
Tgplp1 -----YT-----LAFDDAVA-----HLPVTF---DGNERTP
Tgplp2 -----SNH-FKWNVT-----LAFAGVS-----QLPDVF---DAHNEPCA
Ncplp1 -----YT-----LAFDDALE-----QLPTTF---DGAEQDSL
Ncplp2 -----VT-----LAFAAAVE-----HLPDTF---EGHNPHCG

```

130 140 150 160 170 180

```

=====+=====+=====+=====+=====+=====+
BbiplpA -CSPSIYR---DNPTSACLDLGG-VRPWRFFTFIFGTHVTTKIYLG-----
BbiplpB SCTMEIYRN--DE-DDKKC-VDS-VHPWIKFFKKYGYHTTVIHLG-----
BbiplpC -KLF-----KNKAKVC--EG-MSKWVEFFSLFGTHVTTIHLGMFAVVsicrsG
BbiplpD -CSINDIR---ENATKEDC--AA-LKRWINFFQIFGTHVHQLLLG-----
BbiplpE -IDD-----YRTNGSC-AGY-YELWKSFFNNGYGHVIFRLTMG-----
BbiplpF -CTPDVYV-----VEPSNKDC--EA-INKWVQFFRRYGYHTTSHIVVG-----
BbiplpG ECPIDRLK---NI-YDEGC-EGC-IASWRRFFADFGTHATQHVTMG-----
BbiplpH -CTTIRYS---MNPDPDC--VEHVKPPMNLFEFGTHFTYNIKIG-----
BboplPA -CHPYDYL---VHPRSQACKELG-VTAWMQFFTVFGTHVTTKVYLG-----
BboplPB ECLLEVYRN--DP-EDEKC-ASV-VRPWRFFQKYGTHFTTVIHLG-----
BboplPC -ELY-----KKSKKC--GS-ISKWVDFFLQFGTHVTTIQLG-----
BboplPD -CSAHDMI---DDMTKSEC--IP-LKKWIKFFEMFGTHVHQLLLG-----
BboplPE_1 -QEK-----YLSDAEC-KNY-CELWKKFFNNGYGHVISRITMG-----
BboplPE_2 DCPTEKYVE--NM-DDESC-SGC-ISSWRRFFADYGYHTVTRRISMG-----
BboplPE_3 -CTTIRYA---INPEYDC--KE-VKPWMQLFEMFGTHFTYNIKIG-----
BboplPF -CTPDVFI---VDPLKSDC--SS-MHQVVKFFKRYGTHMTSHITIG-----
TaplpA -CRPYIYR---EDPKNENCEELG-VSDWMLFNFTFGTHVATKIYLG-----
TaplpB RCTLDMFKS---NE-DDPMC-AEN-VWPWMQFIKMFGTHFTTIHVLG-----
TaplpC -EGY-----KKRIKEC--KD-LVKWMEFFSEFGTHVVVQVHLGegrinqyil---G
TaplpD -CNIDNK----LNLSDREC--KS-IKPWIKFFVFGTHFNNQLTLGIYIVVyc-----
TaplpE_1 -NNSQLNQ-----KNI-EKYWYNIFNTYGHVLTKITLG-----
TaplpE_2 KCPISKFKD--DP-FNPNC-IC-KVMWVQFFKDYGTSLTKQITMG-----
TaplpE_3 -CNPICYT---DDKNSKDC--KE-IKKWMDLFEQFGTHFSYNIKLG-----
TaplpF -DVF-----ISEVESC--EK-LRIWIKLFKSYGTHMTTYAMTG-----
TpplpA -CKPFIYR---EDPKNENCQELG-ISDWMLFNFTFGTHVATKIYLG-----
TpplpB SCTIETFKS---NE-DDSIC-AET-VLPWMQFIKMFGTHFTTIHVLG-----
TpplpC -EGY-----KNRIKEC--KD-LVKWMEFFSEFGTHVVVQVHLG-----
TpplpD -CNIDNK----LNLSDREC--KS-IKPWIKFFVFGTHFNNQLTLG-----
TpplpE -SNPQKNQ-----KNI-EKDWYNIFNTYGHVLTKITLG-----
TpplpF -DIF-----ITELESC--KN-LRIWINLFKTYGTHITTYAMTG-----
TpplpG KCPISMFRN---DP-FDANC-IRC-IMPWMEFFKDYGTFTMEKITMG-----
TpplpH -CNAIKYS---INKNNKDC--KE-IKNWMLFDQFGTHFSYNIKLG-----
Pfplp1 -CPSDVYE---ENKTKSNC--EN-VSLWMKFFDIYGTHIIYESQLG-----
Pfplp3 YCSDEEFRD---NR-KSEKC-GKS-VTAWMYFFKNFGTHVSTLLHLG-----
Pfplp2 -CSYEYYI---NKLNSPEC-EEN-VNKWMLFFKLHGTHVAYEYILG-----
Pfplp4 LCTKVLYMN---N---NLHC-SEG-IKSWMKFFEKYGTHVVLSAHFG-----
Pfplp5 KCSLQYYKMnmNK-YSENC-LKT-ITPWISFFNNGYGHVISGVYYG-----
Pyplp1 -CTPDVYE---QKKMTKEC--RN-VQLWIQFFKTYGTHIIVEAQLG-----
Pyplp2 -CTYEYYI---SKSHTQC-EKN-VNKWMTFFKLHGTHVAYEYILG-----
Pyplp3 YCNAEELRD---NKTGMENC-GKS-VESWLFFFKNFGTHVSTLIHLG-----
Pyplp4 TCSKLVYMY---NS-KNEQC-IKF-IKPWIDFFRKYGTHVVVSAHFG-----
Pyplp5 KCGVHSHYK---NK-YDKNC-LRT-ITPWITFFNLYGTHLVSEVYYG-----
Tgplp1 -CSVQQWR---ADHMADGCQQTN-IPWMAFIEQFGTHYVARTLYAG-----
Tgplp2 -CSAEQWR---QDQNAEACTKTN-VPIWISFIEQFGTHFLVRLFAG-----
Ncplp1 -CSVQQWR---TDHMTDACQQSN-IPKWIGFIEQFGTHYSRLYAG-----
Ncplp2 -CSPEQWR---QDEAADVCAGSN-IPTWIRFIEQFGTHYLVRFLFAG-----

```

```

=====+=====+=====+=====+=====+=====+
BbiplpA GKMVTLIETKASQEAKLK-----KLGIDV-----K--AEISVQA-QVA---T---AN
BbiplpB GKVTNQIQMKKTDVAAIQ-----KHGYNI-----D--SYIKANS-GIP---FlnlGQ
BbiplpC GKITRILITAPSDAVESFS-----KSGLDV-----N--AAVGAII-SGA---L---VD
BbiplpD GKLVQTLKFDASALENLK-----SSGIDV-----N--LAIASSI-GSV---N---AS
BbiplpE GKLLRIVENLEDNEAKEK-----SKERQS-----SFGV-QLS---I---IN
BbiplpF GQIIFIDRAVNQVSTAI-----GCDKva-----SP--KN--VSI-YHG-----
BbiplpG GTYRRFNAMDKQASRKS-----KKSEVT-----I--TTSSSWF-GLS---N---SR
BbiplpH GRLTELEQVNASKSGKRS-----NAQAKA-----R--ADIQVTK-SVA---A---GS
BboplPA GKMLTIIETKSSQEADLK-----KKGIDV-----K--AELSVQA-EVA---T---VD
BboplPB GKVTNQIQIDKDVAKLQ-----KDGYNi-----D--VMIKSGSiSPV---K---VG
BboplPC GKIIIRLLTIPNNAMDSFL-----KSGLNV-----D--VAVKAVI-SGA---L---LE
BboplPD GKLIQTLKINASKLQALK-----NDSIDV-----D--LVVSSVL-GSS---S---AS
BboplPE_1 GKILQMDEMENTANENAE-----SNDKKh-----NLSV-NVG---V---LS
BboplPE_2 GIFRRFSNVSNRESKRDA-----SKQKTT-----I--KKSSSWF-HLV---K---KK
BboplPE_3 GRLTkISQVNLNKKtNTN-----MNSVNA-----G--ATTQVRN-ELF---G---AS
BboplPF GQIISIDRMVEGEKITKM-----VKTlGG-----GES-----I
TaplpA GKIFTTLEEVKKNQEKkLS-----DQGLDV-----K--AILSAKI-KDI---G---ID
TaplpB GKITHQVQIDKTDVLHMq-----QSGVNV-----D--LAVKATI-SPSFVDS---LE
TaplpC GKLTRYLSVPSSIIESLS-----NKGFDV-----N--AVIGAVI-SGV---K---TD
TaplpD GKINQTMVFDSSSTLEGLK-----KKGIDi-----E--AEVrTEL-GSE---N---NK
TaplpE_1 GKVIEINTADGSENTTKD-----TSIFG-----N-KFD---L---NF
TaplpE_2 GVINKFYNLKRYDGSMNK-----EYKKKT-----V--KESSTFF-HLS---K---YK
TaplpE_3 GRITYITQEEGSKEEKEN-----EKSGGak-----IGHKLQKDN-KGI---G---IE
TaplpF GKFINMESVVNIHLQTKDyenKNiKAEM-----GEA-----S
TpplpA GKIFTTLEIKKSQEKKLS-----DQGLDV-----R--AILSAKI-KDT---D---ID
TpplpB GKITHQVQIDKSDVLHMq-----QNGINV-----D--AAVKASI-SPVMVDS---LQ
TpplpC -KLTRYLSVPSSIIESLA-----NKGldV-----N--AAIGAVI-SGV---S---AN
TpplpD GKINQTMVFDSSSTLEELK-----KKGIDi-----E--AEVrTEL-GSG---N---VK
TpplpE GKIEINAVEGGQNITEN-----TSIFG-----S-KLD---I---NF
TpplpF GKFINMESVVNIINLQARdsiKNtKAKRT-----GEA-----S
TpplpG GVINKFYNIKKYEGSMRK-----EYKKKT-----I--KQSSTFF-HLS---K---SR
TpplpH GRITFITQEEGSKDERGN-----EKSVdV-----GVGGKfEKDN-KGV---G---IE
Pfp1p1 GKITKIINVSTSSIEQMK-----KNGVSV-----K--AKIQAQF-GFG---S---AG
Pfp1p3 GKITQQVKISKNDYKAMT-----ESGLSI-----S--ASVSAGF-GLF---K---VK
Pfp1p2 GKIIKININKEEYNKMK-----ENNINv-----K--TFFNiYF-HKM---G---LS
Pfp1p4 GMSFNTMEITKRKIEEIK-----IYKYKY-----S--LWNNPYL-NiF---K---SG
Pfp1p5 GKIIHNLyFENNLKkKE-----YKIRMYKSRlNPFST--IN--SNL-YFG---S---VL
Pyplp1 GKITKIINVSNTSVNQMK-----KdGVSV-----K--AQIQAQF-GFA---S---SG
Pyplp2 GKIIKVNIEKEEYNKIK-----ENNLNM-----K--TiFDYfF-HKM---G---LS
Pyplp3 GKITQQVKISKNEYKSLs-----ESGLST-----S--VSASVGF-GLF---K---AK
Pyplp4 GKTINTLEVPiHKFEELK-----IYNYKY-----S--IENRYL-DVF---K---DR
Pyplp5 GKIIILYSDYNNINDS-----EQVQIYKRLNPFtS--GNKLGsf-YFG---S---II
Tgplp1 GKMTYQVTMKSSDVKALK-----KKGVDV-----K--AEVKLML-GAF---S---AG
Tgplp2 GKMTYQVTAKRSEVEKMR-----NMGI DV-----K--TQLKMQL-GGV---S---GG
Ncplp1 GKMTYQVTMKSSDVKAMK-----KKGVDV-----K--AELKIML-AGF---G---MG
Ncplp2 GKMTYQVTVKRSEVEKMK-----KKGADV-----K--SQLKMQL-VGV---S---GG

```

250 260 270 280 290 300

```

=====+=====+=====+=====+=====+=====+
BbiplpA GAVG-----VGVSklK--DSKNEsLDS-KK
BbiplpB ASFN-----SAGDMSS--DSKKNsFKTERS
BbiplpC AKAG-----LKSSEQD--ALQEFSDsCDLR
BbiplpD VEGR-----RAAEtAK--IDE---LGSKT
BbiplpE ANLS-----MSNKKED--GMRKALNDQSSK
BbiplpF -----FKSVM--KG---RRSRQ
BbiplpG QEST-----KENEFMH--SRDDEENDVv--
BbiplpH VGVD-----GTkMSNNsNmt---NVSFSY
BboplPA ASVN-----ASTSSLH--NRDTEsLDT-KK
BboplPB GGFS-----HEKKEES--SSNFSSlQTEKL
BboplPC VNEK-----LNSEQQK--AIKELQD-----
BboplPD LLAD-----KVVNKYK--LDE---LGAKS
BboplPE_1 GSFN-----LNNTNEK--QqKEKvKkKNGK
BboplPE_2 SKKT-----KSSSKV--SSEGKEHDLV--
BboplPE_3 AGVG-----LSKGSTKDNTe---NiSFTY
BboplPF YKVT-----DKFSSVM--TG---KRESHQ
TaplpA SNVE-----VSTIKSK--NSLDHLLDt-KK
TaplpB VGTT-----TNTeKGS--VSLsNNLKYEKQ
TaplpC ISVG-----ASKSDES--EIKQLKkSSKlK
TaplpD LNLd-----MSGSKAR--LDE---IGQKk
TaplpE_1 FKTS-----LNSISKD--NIENLDKNEQEK
TaplpE_2 SESM-----EeKNSGE--SDKEELEEVY--
TaplpE_3 GNvQ-----LiFGNKKGENK---NLSFKY
TaplpF SQFS-----EiFTRRI--KG---SKIKRH
TpplpA SNVE-----VSTIKSK--NAGDFLLDt-KK
TpplpB GGFA-----STSEKAS--LSQSNNLKYDKQ
TpplpC IAVG-----VSKSEES--EIKQLKkSSKlK

```


TpplpD LNLD-----MGGKKSRLDE----IGQKK
 TpplpE FKMS-----LNSNSKD--KLHDLKDNKSEK
 TpplpF SEFS-----EIFRRRI--KG----NKIKKH
 TpplpG SESL-----NEKKSGE--TNKEELEELY--
 TpplpH GNVK-----FVFGNKRGESK----NLSFKY
 Pfplp1 GSTD-----VNSSNSS--ANDEQSYDMNEQ
 Pfplp3 GSTN-----TESNESS--NNESSSSLEKE
 Pfplp2 SAFQ-----KEAQKIL--NK----FRISKH
 Pfplp4 SLFQdlsinvdghkenkNNSNNNini---DEKKNNDAYIKNDVLI--EQYRDN----IN
 Pfplp5 SKEK-----IYIRER
 Pyplp1 GSTS-----VSSDNSS--KNDNSSYDMSEK
 Pyplp2 VKRN-----KQVQKFI--NK----IHGSKT
 Pyplp3 ASTS-----TDSKESS--HEESSNSSIEKE
 Pyplp4 LLLQkilkiekgeyay-RNDSQDNymqdehDEKNDDLEKKANDIL--NKYEDSNSNKIN
 Pyplp5 SKKQ-----SSTNKQ--NNDNMLTYIKEK
 Tgplp1 ASGQ-----VKTNQDS--ASQLRSLNVEKE
 Tgplp2 AGQG-----TSSKKQ--SSSEYQMNVOKE
 Ncplp1 ASSQ-----TKTNNES--ASQMRNLNIEKE
 Ncplp2 GNQG-----VATTNK--SSSNYEMNVOKE

310 320 330 340 350 360
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+

BbiplpA STLALGGD-----I-----
 BbiplpB IIVIGGDV-----P-----
 BbiplpC FSVLGGIH-----V-----
 BbiplpD ITVIGGQM-----P-----
 BbiplpE YFVMGGDN-----L-----
 BbiplpF MWVIGGFYVK-----G-----
 BbiplpG QYTVGPEP-----K-----
 BbiplpH VNVLGGSP-----I-----
 BboplpA SMFVIGGD-----I-----
 BboplpB VIVIGGDV-----P-----
 BboplpC -----
 BboplpD ITVIGGNM-----P-----
 BboplpE_1 FFIMGGDT-----F-----
 BboplpE_2 QYTVGPEP-----H-----
 BboplpE_3 VNVLGGRT-----I-----
 BboplpF MLILGGYFYS-----G-----
 TaplpA STFVLGGD-----I-----
 TaplpB VLVIGGDG-----L-----
 TaplpC FSVLGGIH-----P-----
 TaplpD MYVIGGKM-----P-----
 TaplpE_1 IMIFGGNA-----ITNRKRT
 TaplpE_2 TLTIGPEP-----P-----
 TaplpE_3 TNILGGLP-----V-----
 TaplpF LWVIGGSFVN-----N-----
 TpplpA STFVLGGD-----I-----
 TpplpB VLVIGGDG-----L-----
 TpplpC FSVLGGIH-----P-----
 TpplpD MSVLGGKM-----P-----
 TpplpE I I I LGGNA-----MTDRKTT
 TpplpF LWVIGGSFVN-----N-----
 TpplpG TLTIGPEP-----P-----
 TpplpH TNILGGLP-----V-----
 Pfplp1 LIVIGGNP-----I-----
 Pfplp3 TVIIGGTT-----I-----
 Pfplp2 IAILGGNP-----G-----
 Pfplp4 LEIRGGNN-----F-----
 Pfplp5 NLIMDGGVHINYPYINEvnmekknnyvnnveknlydqkkkyrnyynfyelK-----
 Pyplp1 LVVIGGNP-----I-----
 Pyplp2 VSILGGHP-----G-----
 Pyplp3 TVIIGGTT-----I-----
 Pyplp4 LDIKGGNN-----L-----
 Pyplp5 NTIYDGGIDIKEYKDGEgkv-----
 Tgplp1 ALVIGGKP-----P-----
 Tgplp2 TLVIGGRP-----P-----
 Ncplp1 ALVIGGKP-----P-----
 Ncplp2 TLVIGGRP-----P-----

370 380 390 400 410 420
 =====+=====+=====+=====+=====+=====+

BbiplpA -----YGKGNLNSFNDAETV--SSFMPVKAEYTPIANFLGKNFVDAYNDA-----
 BbiplpB -----TDGTDKVSMEWTRSL--YRKPMPKVNLDSEIKTLIEDKEKRATFDV-----
 BbiplpC -----SKNVTPQSLKWRATV--PLFPMPIRIVVTPIDTFIKKKYKNAYREA-----
 BbiplpD -----NLPITDEEYATWGNVS--AENPMPIGMSAESIKRLLKTELKDSYTLA-----
 BbiplpE -----TSFDSSDSLKKWMEVS--ERNAMPIDIQLTPISQFIPKEIRSHFWMA-----
 BbiplpF -----LESNDLRALKLWARSL--SQRPMPIRATFTSLDHFLGDKA--KTYHE-----
 BbiplpG -----DEFMTPDSFEDWVRKV--ALNPVPIDVEFISLSELMPPDDETRKLFKE-----
 BbiplpH -----GNADDEEYLAWIHSI--PNNPMPIRSQPLAPLSKLFRSQALKEAYDD-----

```

BboplpaA -----YGDGNTIVFNDWAATV-PENSMP IKA EYTP LAM I M G H E Y M K A Y N D A-----
BboplpaB -----TDGTDKTTMLEWTKSL-YRKPMP IKVNI ESIKTLIDGHEKKSFD T-----
BboplpaC -----DSLLKWKSTV-PIFPMP IRTIYAPLDMFIHSSYKEAYRNA-----
BboplpaD -----NTPITDAEYAIWGNVSV-AENPMP IGI VGD SLKNLMDKNLRDSYSLA-----
BboplpaE_1 -----IPVDTPPEGFRDWDVSI-KENSMP INV ELPMSQFMP IGI RRHYWFA-----
BboplpaE_2 -----NESMAPDV F E D WVRDV-ALNPVP IDVEYQPLSEIMMENQAKNLYAK-----
BboplpaE_3 -----GNVEDENEYLEWINSI-PEHPMP IRNQLAPLAKLFDSEELKETYDD-----
BboplpaF -----LESNDKAFNRWKS SV-WERPMP IRANFTSLEHFMGDKS--KSYQH-----
TaplpaA -----YGHGKTIEFG EWARSV-ADHSMP IKA EFTP I SHFIDKKLSETYNKA-----
TaplpaB -----VDSKDVNSLNNWAREL-YKRPMP IKIKLESIKTL LGDKK--DLFDE-----
TaplpaC -----DRQISPS S IRNWKSTV-PRYPMP IKIDVETISTFLPRS YN SFKEA-----
TaplpaD -----NFPMD DNEFAHWAETV-AENPMP IGVVSTSLKTLIKPALHPSYDQA-----
TaplpaE_1 NNYGEINYVKKLDKQKIETI-KYNPVP IKFELTPLSYFIYQNFSSSNPQlnekegnkln
TaplpaE_2 -----GNVANSNVLSDWLEKV-IQNPTP IDFELVPLIQIIPDKYLKVYENA-----
TaplpaE_3 -----SDINKES EYVWKI KSV-YKYPMP IRTQFAPISKIFKSKALKDSYDE-----
TaplpaF -----LEQIDPKVFSKWKVETI-DKRPMP IKAKFV ELSIFFPEKQ--ETYMK-----
TpplpaA -----YGHGKTIEFAEWARSV-ADHAMP IKA EFTP I SHFIDKNLRDAYNKA-----
TpplpaB -----VDSKNANSLNNWAKEL-YKRPMP IKIKLESIKSL LGKKR--ELFDE-----
TpplpaC -----DRNISPTSIRKWKSTV-PRYPMP IKIDVESISTFLPRS YN SFKEA-----
TpplpaD -----NFPMD DNEFAHWAETV-AENPMP IGVVSTSLKTLMHPAMHQSYDQA-----
TpplpaE NNNGEINYDKKLDKQKVVETI-KYNPVP IKFELTPLSYFIYQNFSDENLVN-----
TpplpaF -----LEQIDPKMFSKWKVTI-DKRPMP IKARFSELSMFFPEKH--ETYMK-----
TpplpaG -----GNVSNKVISDWLEKV-VHNPTPIDLELVP IKQI IPEKYLKIYENA-----
TpplpaH -----SDISKESEYVWKI KSV-YKYPMP IRTQFAPISKIFKSKALKDSYDE-----
Pfp1p1 -----KDVTK EENLFEWSKTV-TNHPMP INIKLTPISDSFSDDDLKESYDK-----
Pfp1p3 -----FDPNDPNNF EKWAESI-SENMP IKGEYEPLSRILPTRL SKIYEEA-----
Pfp1p4 -----LNVNNTSFF EKVVHSI-NTNSMP IRTKLLPFSFFMDDNDMIQAYKD-----
Pfp1p5 -----DDVRKRNYNSWKDTIEWEQAKPVKLNLVPLSEFINSEEGKSAYYM-----
Pyplp1 -----KDVTK EENLYEWSKTV-SSNPMP IHIKLLPIYKSF DSEELKESYEK-----
Pyplp2 -----LNIDDSFF EKWIDSI-DKNSMP IRTKLLPFSFFMDDPNMIKAYND-----
Pyplp3 -----YDPNDPSNF EKWADSI-KNNPMP IKGQYEPLSRILPERLNKIYDEA-----
Pyplp4 -----NDDWKQLTYEKWKNSI-YTNI EP IYLDLFSLSSFMHIEKESYNNA-----
Pyplp5 -----LMTNGIEE EWERTINGKYAKP IKLILRPFSDFIKTDDGKVAYYK-----
Tgplp1 -----ADVSDPKAI AAWANSV-DALPMPVKLELPLQNL LPEDKREAFTHA-----
Tgplp2 -----GNVSDPAALAAWADTV-EELPMPVKFEVQPLYHLLPVEKQEA FKQA-----
Ncplp1 -----ADVSDPKAI ASWANSV-EALPMPVKLELPLQNL LPEDKREAFKQA-----
Ncplp2 -----ANVSDPGALAVWADTV-EELPMPVKFEVQPLHFL LPLEKQEA FKQA-----

```

430

```

=====
BbiplpaA --YVfyGK-
BbiplpaB --ALKYYSE
BbiplpaC --FNFYVE-
BbiplpaD --LNKYAE-
BbiplpaE --FKVYND-
BbiplpaF --AMQFY--
BbiplpaG --ALRYYAK
BbiplpaH --AMEFYma
BboplpaA --YLFY---
BboplpaB --ALKYY--
BboplpaC --LNFY---
BboplpaD --IHKY---
BboplpaE_1 --LKS Y---
BboplpaE_2 --AIEYY--
BboplpaE_3 --AMEYY--
BboplpaF --AVRFY--
TaplpaA --YLYY---
TaplpaB --ALRFY--
TaplpaC --LNFY---
TaplpaD --LHQY---
TaplpaE_1 liIKNY---
TaplpaE_2 --LKYY---
TaplpaE_3 --AFRFY--
TaplpaF --AIEYY--
TpplpaA --YLYY---
TpplpaB --ALKFY--
TpplpaC --LSFY---
TpplpaD --LHQY---
TpplpaE --SFHYF--
TpplpaF --AVEYY--
TpplpaG --LKYY---
TpplpaH --AFRFY--
Pfp1p1 --AIYY--
Pfp1p3 --LRFY---
Pfp1p4 --ALIFY--
Pfp1p5 --LLEFY--
ALEFY--

```

Pyplp1 --ALLY--
 Pyplp2 --ALMFY--
 Pyplp3 --LSFY---
 Pyplp4 --LLYY---
 Pyplp5 --ALEYY--
 Tgplp1 --VTYYSK-
 Tgplp2 --VTFYSK-
 Ncplp1 --VSYYGK-
 Ncplp2 --VAFYSK-

Figura 40. Resultado del alineamiento múltiple con las 46 secuencias del dominio MACPF realizado con el programa DIALIGN. Las líneas rojas muestran el alineamiento resultante luego del filtrado utilizando el programa TrimAl.

Con el programa Modelgenerator se ajusto un modelo de evolución según el criterio de AIC2: WAG+I+G. El árbol construido con PhyML 3.0 SH-LRT se muestra en la figura 41.

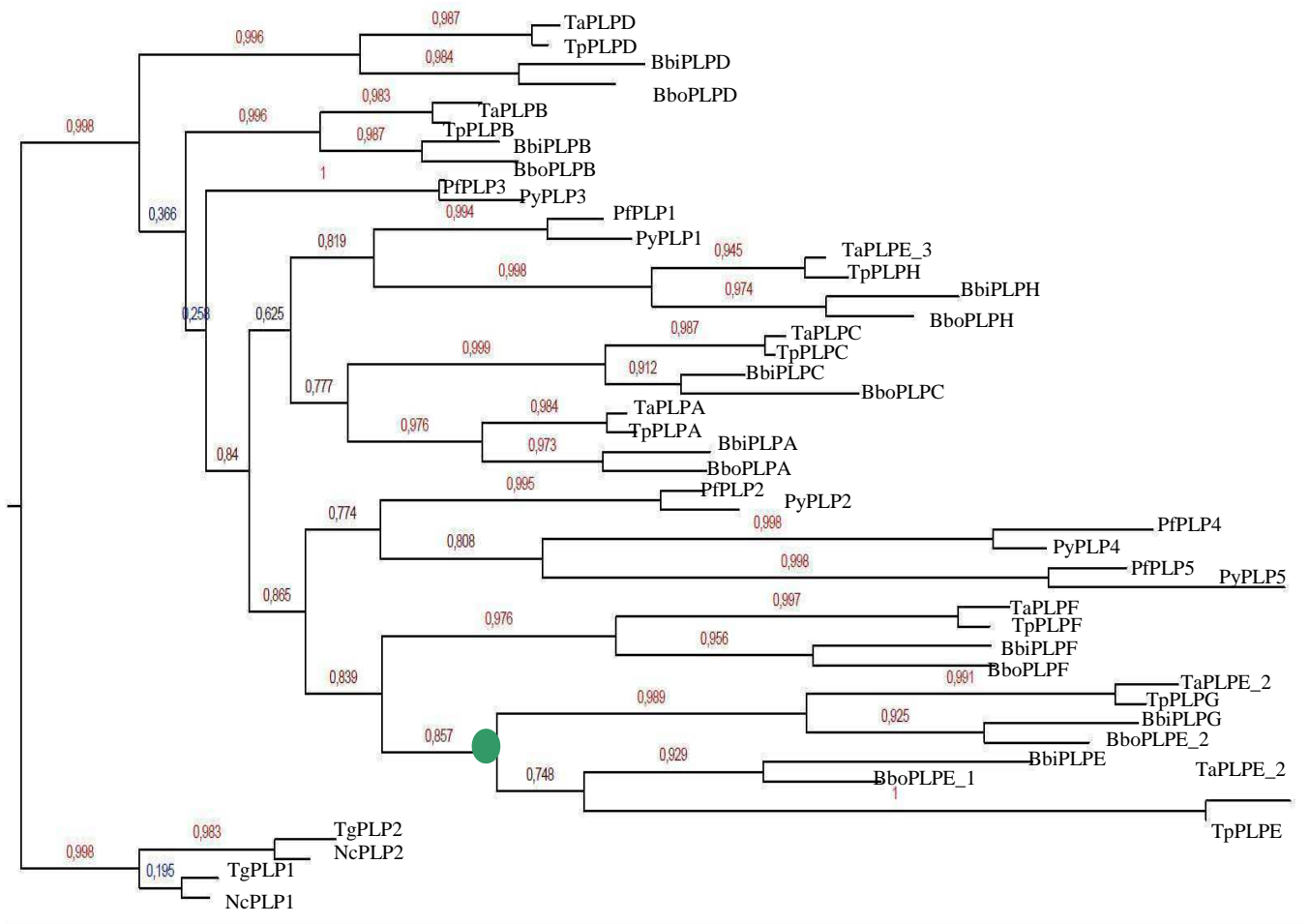


Figura 41. Árbol filogenético realizado por Máxima Verosimilitud de dominios MACPF de proteínas de Piroplasmida y Haemosporida utilizando como grupo externo a los dominios de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*. Las ramas están soportadas por valores de SH-LRT. En rojo se observan los valores entre 1 y 0,9 (más confiables), en marrón los valores intermedios entre 0,8 y 0,7 y los soportes más bajos se observan en color azul.

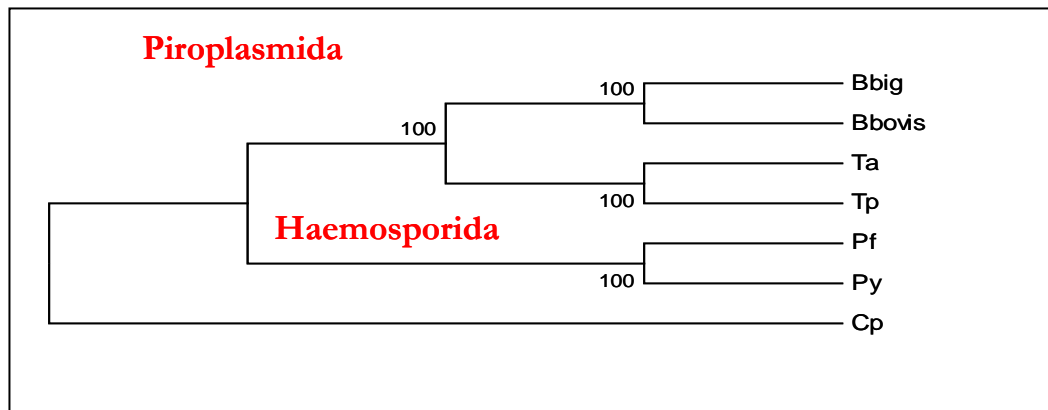


Figura 42. Árbol filogenético de especie inferido por Máxima Parsimonia usando seis genes conservados de *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. annulata* (Ta), *T. parva* (Tp), *P. falciparum* (Pf), *Cryptosporidium parvum* (Cp) como grupo externo. (Bootstrap 525 réplicas, semilla 64238)

Los resultados de la filogenia molecular revelaron una topología resuelta para la familia génica, demostrando que algunos procesos de duplicación ocurrieron antes de la separación Piropasmida-Haemosporida mientras que otros fueron independientes. Por otra parte, las diferencias en el largo de ramas del árbol filogenético resultante mostró la gran divergencia entre las perforinas (Figura 41).

A partir de la observación del árbol filogenético se pudo inferir con un buen soporte de rama que la agrupación en cada clado se corresponde con el árbol de especie. Se observa que cada grupo de ortólogos tanto en Piropasmida como en Haemosporida se encuentran en un mismo clado mientras que los parálogos se encuentran en clados separados.

Se observó una correspondencia entre la topología de los dominios MACPF y la topología de referencia del árbol de las especies (Figura 42 y Figura 3 de la Introducción de este trabajo). Sin embargo, en los nodos más profundos los soportes no fueron elevados y pueden ser considerados como no resueltos, colapsándolos en una politomía.

El clado siguiente con un soporte de 0,84 esta formado por dos clados, uno de ellos contiene a los dominios PLPE_3 y PLP H de Piropasmida que parecerían ser co-ortólogos de la PLP1 de Haemosporida. Esta relación filogenética fue soportada por un valor de SH-LRT de 0,819. Lo mismo se observó con los dominios PLPA y PLPC con un soporte de rama de 0,777. Adicionalmente, los dominios PLPA y C habrían surgido a partir de un evento de duplicación en Piropasmida. El otro clado soportado por un valor de SH-LRT de 0,865 lo componen las PLP 2, PLP4 y PLP5 de Haemosporida co-ortólogas a la PLPF, PLPE_1/E y PLPE_2/G.

En cuanto a los tres dominios MACPF de la BboPLPE y TaPLPE es posible deducir que los dos primeros dominios de la proteína (E_1 y E_2) se generaron a partir de una duplicación ya

que poseen un ancestro común apoyado por SH-LRT de 0,857 (circulo verde en la Figura 41), mientras que el tercer dominio (E3) se encuentra en otro clado. Por lo tanto, esos dominios no son exclusivos de Piroplasmida aunque aparecen recientemente formando parte de una única PLP.

El análisis de estos resultados con el criterio de parsimonia nos permitió postular dos hipótesis evolutivas que podrían explicar el origen de las proteínas con más de un dominio MACPF:

a) La fusión de dominios MACPF ocurrió en el ancestro de Piroplasmida (evento 1) y se observaron dos sucesos independientes de separación (evento 2 en *B. bigemina* y 3 en *T. parva*)

b) Las PLPs con un solo dominio son más frecuentes en Haemosporidia y Piroplasmida y hubo eventos independientes de fusión de dominios MACPF en *B. bovis* y *T. annulata* (eventos 1 y 2).

Siguiendo un criterio parsimonioso sugerimos que haya ocurrido el camino b. La adquisición en forma repetida y paralela de más de un dominio en *B. bovis* y *T. annulata* implicaría que estas proteínas multidominio cumplirían algún rol específico en estos parásitos.

2. 2. 4. 3. Reconstrucción filogenética de la familia de las PLPs en Haemosporida y Piroplasmida

Perforinas ancestrales:

La topología del árbol obtenido en el análisis filogenético de los dominios MACPF dirigió la búsqueda del estado ancestral que pudiese explicar la filogenia con el menor número de pérdidas y duplicaciones génicas subsiguientes. En la figura simplificada del árbol (Figura 43) el clado rojo y nombrado con el número 1, esta formado por perforinas co-ortólogas entre Haemosporida y Piroplasmida lo que sugiere que este clado podría descender de una única perforina en su último ancestro común. A su vez, más recientemente, dentro de Haemosporida y Piroplasmida, esta perforina sufrió duplicaciones (un evento dentro de Haemosporida y dos en Piroplasmida).

El clado verde oscuro y nombrado con el número 2, presenta ortólogos en Haemosporida y Piroplasmida, por lo cual el ancestro debería ser el común a Piroplasmida y Haemosporida.

El clado verde claro, nombrado con el número 3, parecería ser una duplicación del ancestro del clado número 2, también anterior a la separación de los linajes de Haemosporida y Piroplasmida. En este caso, inferimos la pérdida de la perforina en la rama de Haemosporida, posterior a su separación de Piroplasmida.

Los clados representados en diferentes tonos de azules, nombrados con el número 4, no fueron resueltos en un único clado en la topología. En consecuencia para estos genes se puede postular al menos un único gen ancestral previo a la divergencia Haemosporidia-Piroplasmida, condición que nuevamente favorecemos en un contexto de parsimonia. En conclusión, es probable que hayan existido al menos cuatro perforinas en el ancestro común de Haemosporida y Piroplasmida, habiéndose producido a lo largo de la evolución varios eventos de pérdida y duplicación linaje-específicas que dieron origen a las cinco PLPs de Haemosporida, las seis de *B. bovis* y *T. annulata* y las ocho de *B. bigemina* y *T. parva*.

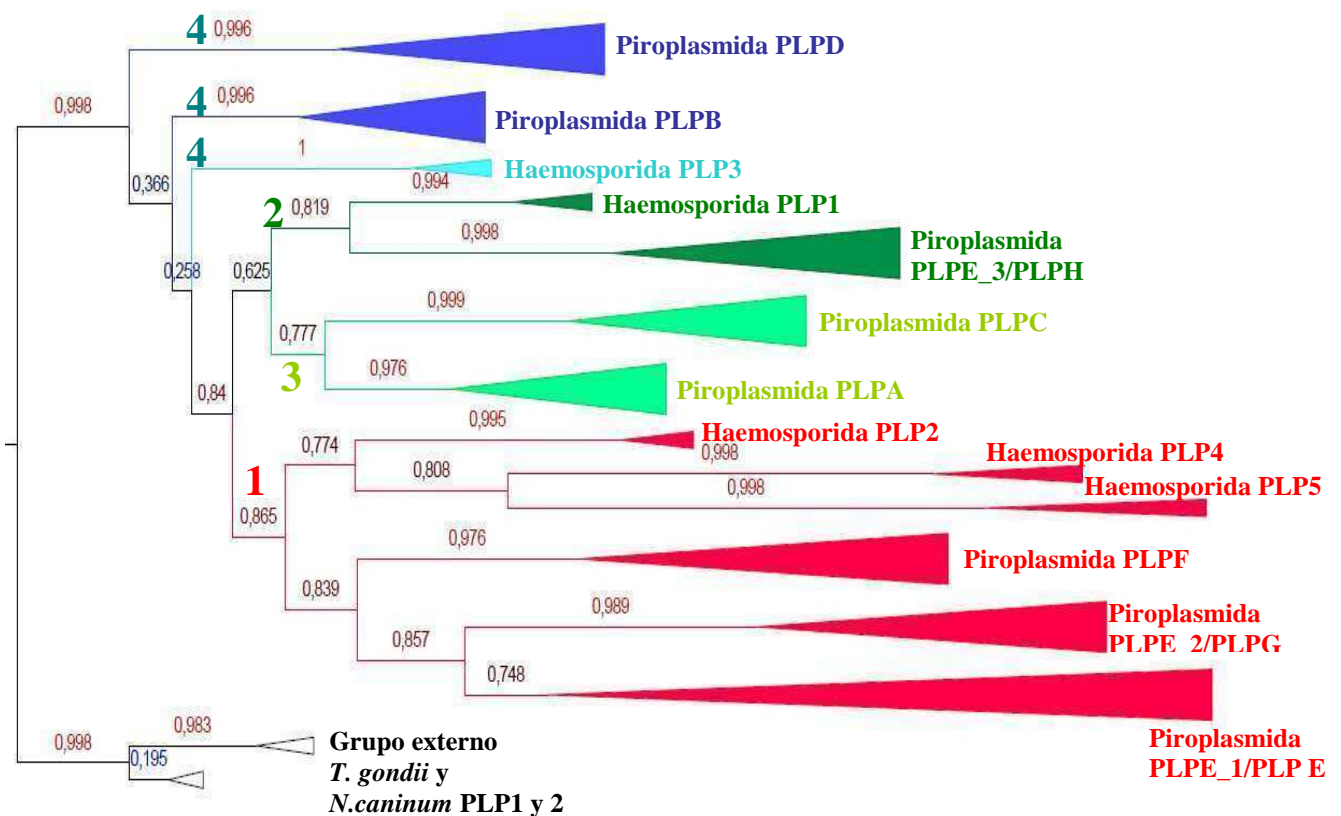


Figura 43. Reconstrucción filogenética de las PLPs ancestrales en los órdenes Haemosporida y Piroplasmida.

El estudio evolutivo de las PLPs realizado en este trabajo demostró que estas proteínas ya estaban presentes en el ancestro común del phylum y que durante la diversificación del mismo, los diferentes linajes fueron adquiriendo nuevas variantes por duplicación o recombinación genética (como en el caso de Piroplasmida) al mismo tiempo que perdían otros genes, particularmente en *Plasmodium*.

2. 2. 5. Transcripción de los genes *plp*

Las evidencias del análisis proteómico y transcriptómico en *Plasmodium* spp. han demostrado la expresión diferencial de los genes *plp* en cada estadio evolutivo del parásito (Ishino y col., 2005; Florens y col., 2002; Lasonder y col., 2002; Hall y col., 2005; Raibaud y col., 2006; Ecker y col., 2007). Dependiendo de cada estadio cada uno de los genes *plp* codifican para proteínas que cumplen roles característicos de ese estadio, tales como la migración a través de las células hepáticas del esporozoíto, la invasión del ookinete a las células del intestino medio del mosquito (Kadota y col., 2004; Ishino y col., 2005; Ecker y col., 2007) y el egreso de los parásitos del eritrocito (Ecker y col., 2007).

Con el fin de aportar más evidencias sobre la transcripción de los genes *plp* en apicomplejos, realizamos un análisis transcripcional de los genes *plp* en *B. bigemina* y *B. bovis* en el estadio intraeritrocitario.

2. 2. 5. 1. Transcripción en el estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* y *B. bovis*

Durante la fase del ciclo de vida en el hospedador bovino, los esporozoítos infectivos invaden los eritrocitos diferenciándose a trofozoítos en el lumen para luego convertirse en dos merozoítos por fisión binaria (formas pares) y particularmente en *B. bigemina* se ha identificado un tipo de merozoíto de forma ovoide denominado precursor gamonte (Bock, 2004).

En este trabajo, se estudió la transcripción de todos los genes de la familia *plp* en el estadio intraeritrocitario de *B. bovis* y *B. bigemina* amplificando un fragmento específico de cada gen *plp* correspondiente al dominio MACPF

A través de un ensayo de RT-PCR de punto final pudimos demostrar la amplificación de todos los fragmentos específicos de cada gen *plp* para todos los transcritos en ambos parásitos. Asimismo, demostramos que los tres dominios MACPF de el gen *plpe* de *B. bovis* se transcriben (Figura 44). Los fragmentos amplificados de un tamaño entre 100 y 200 pb de la mayoría de los genes *plp* no poseen intrones por lo que el tamaño del producto esperado para el ADN genómico y el ADN copia resultó ser el mismo, excepto en el casos de los genes *plpc*, *e* y *f* de *B. bovis* que poseen intrones y por ende en los resultados de la RT-PCR presentaron tamaños diferentes entre el ADN genómico y el ADN copia.

El transcripto *plpb* presentó un producto de mayor intensidad en *B. bigemina* y *B. bovis* y particularmente en *B. bigemina* el transcripto correspondiente a *plpe* también resultó tener una intensidad aumentada con respecto a los otros transcritos.

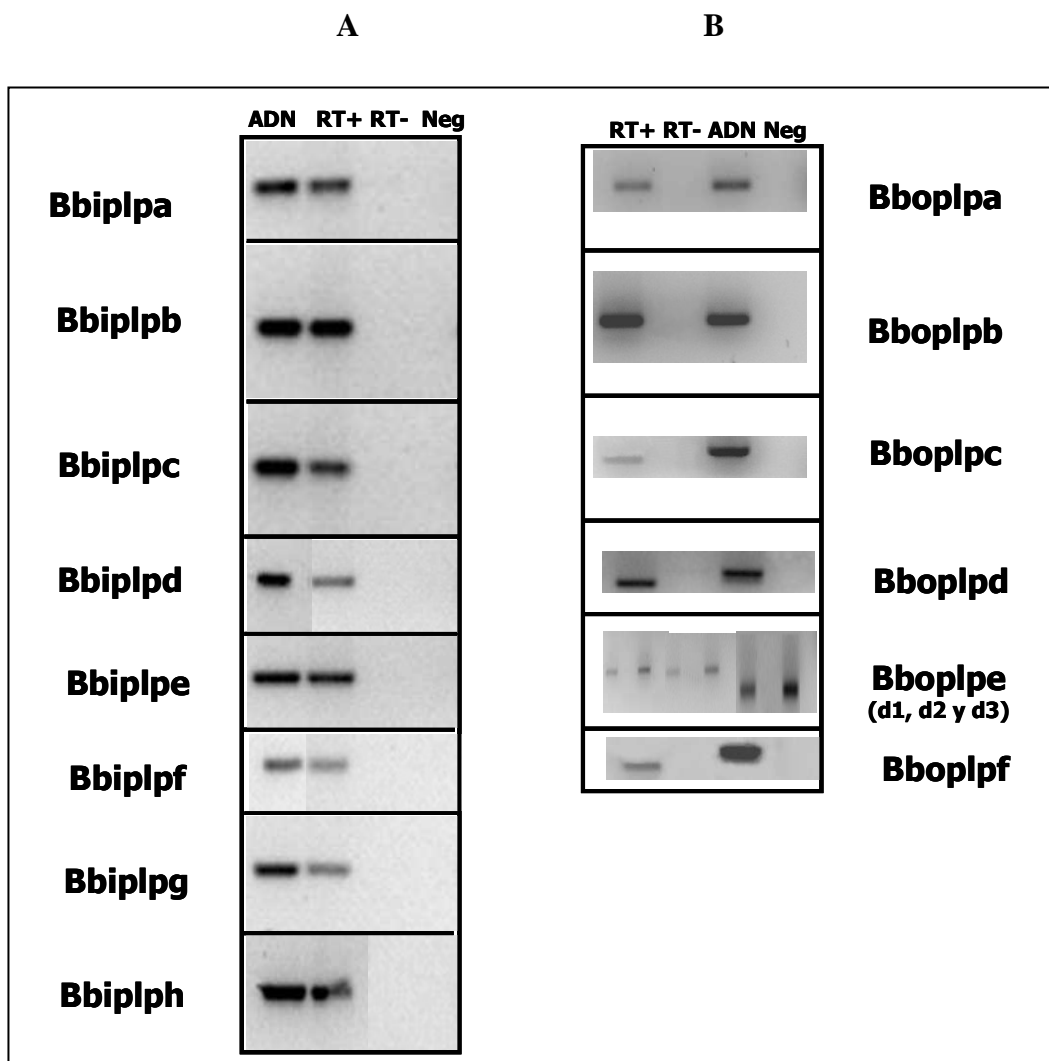


Figura 44. Transcripción de los fragmentos de entre 100 y 200 pb correspondientes al dominio MACPF de los genes *plp* por RT-PCR de punto final, **A.** *B. bigemina* (BbiS2P) y **B.** *B. bovis* (BboS2P). En los dos casos RT+: síntesis de ADNc a partir de ARN con la enzima transcriptasa reversa, RT-: control sin enzima transcriptasa reversa para observar contaminación con ADN, ADN: control positivo de la PCR con cada oligonucleótido específico y Neg: control negativo de la PCR.

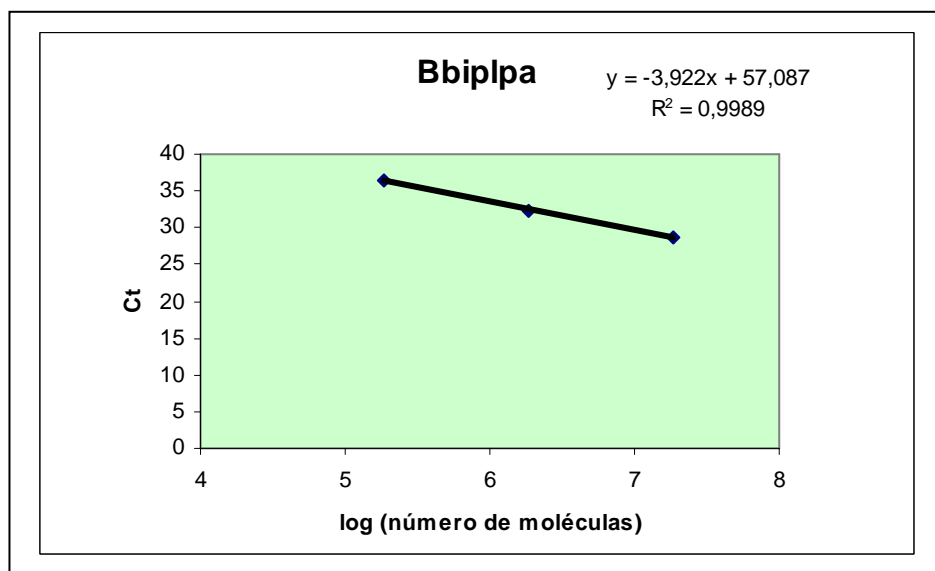
Los resultados de la RT-PCR de punto final demostraron que en *B. bigemina* y *B. bovis* todos los genes *plp* se transcriben y dado que en este ensayo pudimos visualizar transcripción diferencial, se diseñó un ensayo de transcripción cuantitativa para validar el resultado observado.

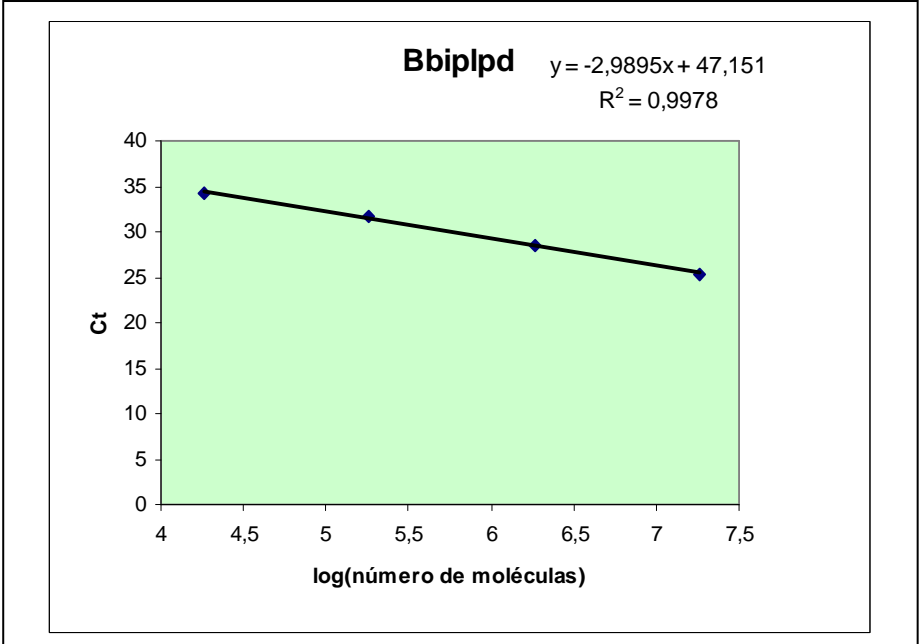
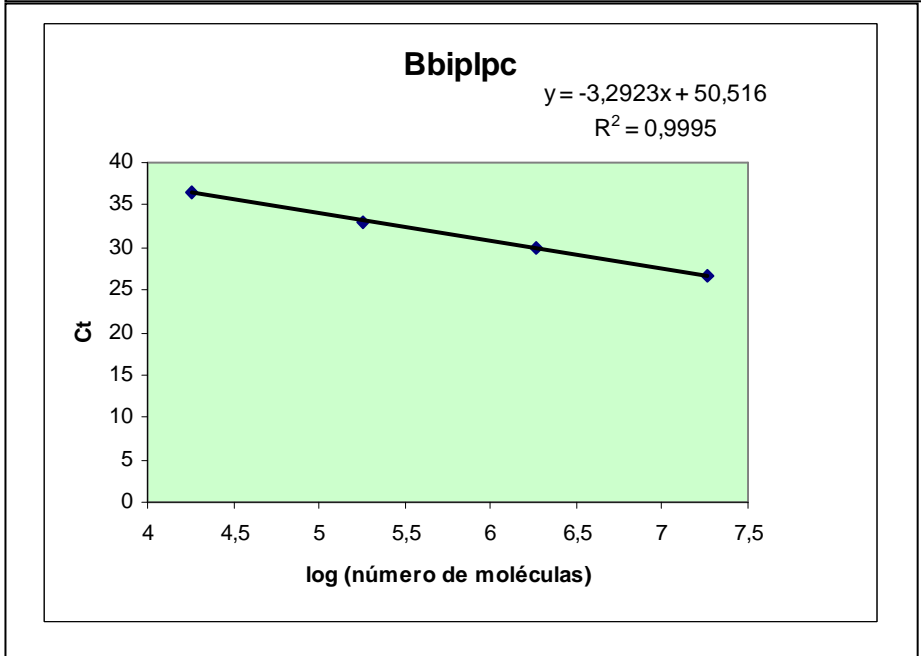
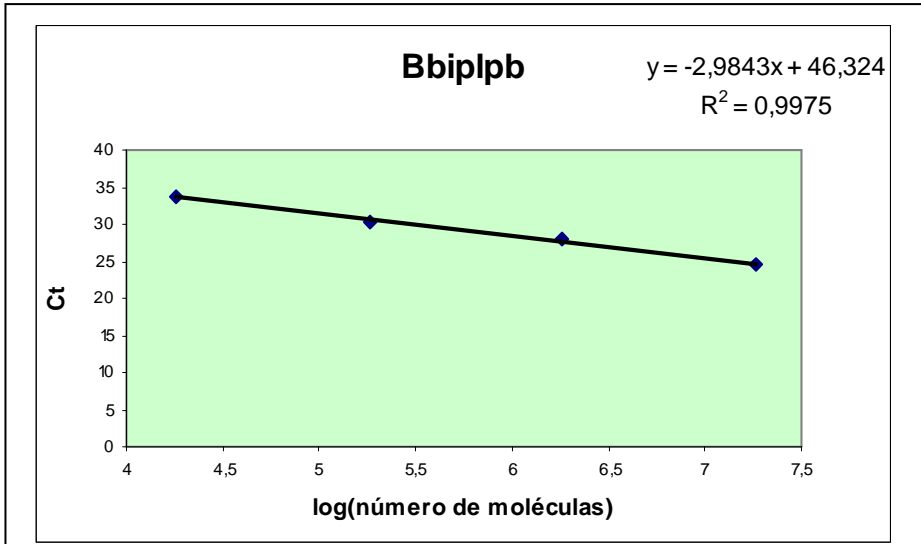
2. 2. 5. 2. Transcripción diferencial de los genes *plp* en el estadio intraeritrocitario

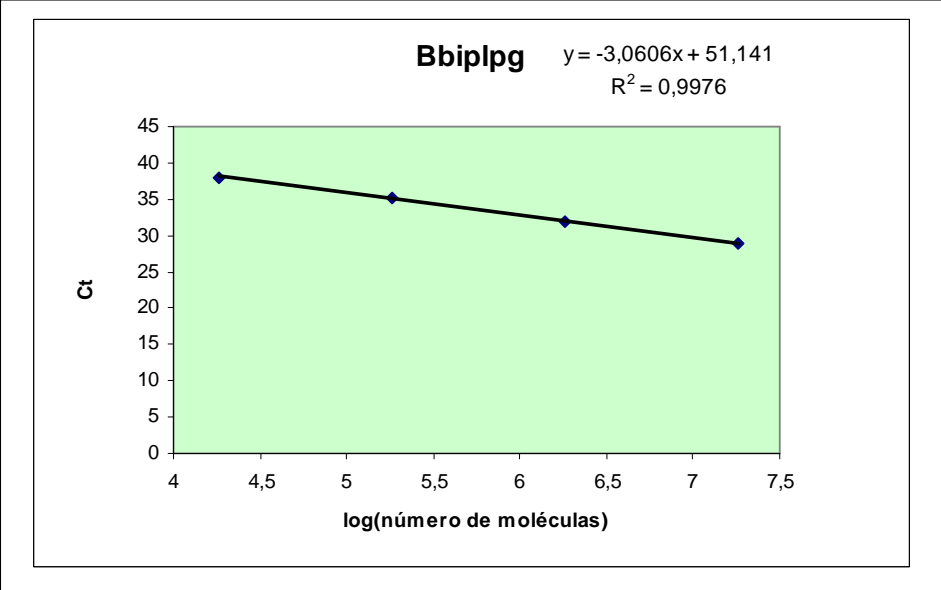
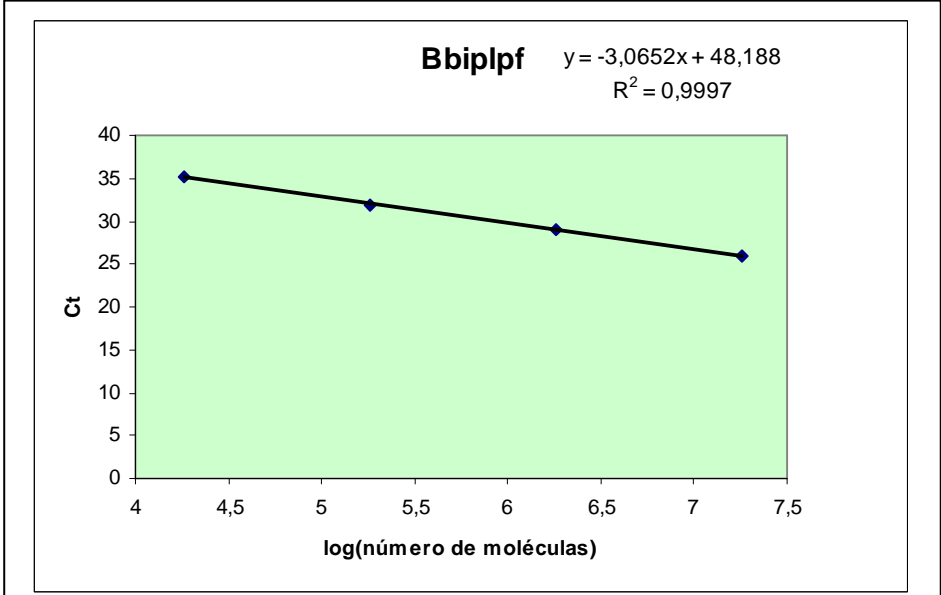
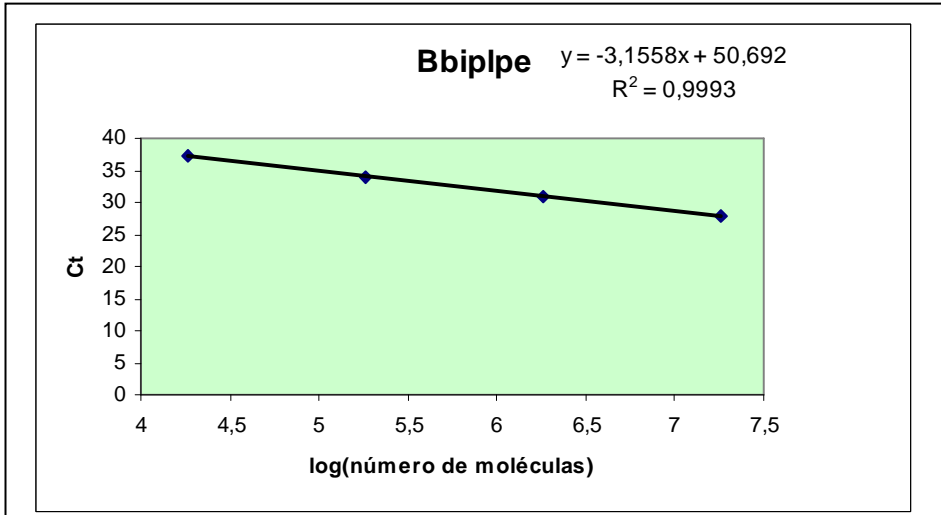
Construcción de la curva estándar

La determinación del número de copias de ARN mensajero de cada *plp* en el estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* se realizó por RT-PCR cuantitativa. Se seleccionó la concentración de los oligonucleótidos específicos analizando la curva de *melting* en el rango de temperatura entre 70°C y 90°C. Por otra parte, al observarse una única temperatura de *melting* para cada uno de los genes estudiados se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos

Con el fin de calcular la eficiencia de cada par de oligonucleótidos se construyó una curva estándar con cuatro diluciones seriadas al décimo con ADN genómico de BbiS2P de concentración conocida y sus mediciones de Ct. Para la construcción de la recta se convirtió el valor de concentración a su equivalente en número de moléculas, teniendo en cuenta el tamaño del genoma de acuerdo a lo reportado por Ray y col., en el año 1992. El logaritmo de la concentración del estándar y el valor de Ct son inversamente proporcionales respondiendo a una línea recta que para cada uno de los pares de oligonucleótidos fue construida por regresión lineal (Figura 45).







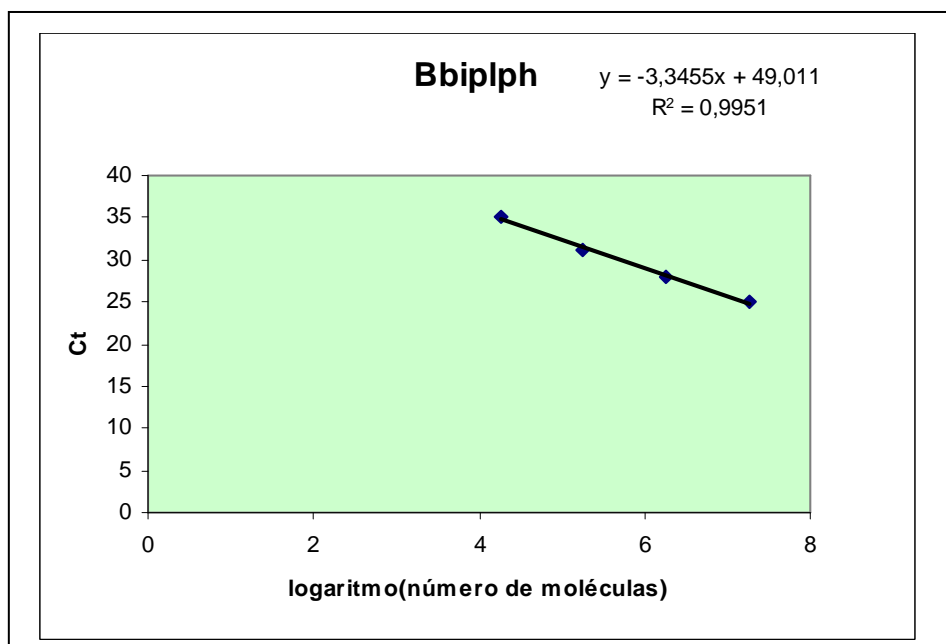


Figura 45. Curva estándar para cada uno de los genes específicos. En el eje de las abscisas se encuentra el logaritmo del número de moléculas de ADN genómico de la cepa BbiS2P y en el eje de las ordenada se observa el promedio de los valores de Ct realizados por duplicado. En cada uno de los gráficos se representa la ecuación de la recta producto de la regresión lineal de los puntos de la curva. Se indica el coeficiente de correlación R2 de la regresión lineal.

Eficiencia de amplificación de los transcritos de interés

La eficiencia de la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés se calculó a partir de la pendiente de la recta de regresión de la curva estándar realizada para cada par de oligonucleótidos. Una pendiente de $-3,32$ con un coeficiente de correlación R2 mayor a 0,99, indica una eficiencia de amplificación de la PCR óptima del 100% (Pfaffl, 2004) Los resultados de las pendientes de las curvas estándar con cada par de oligonucleótidos oscilaron entre $-2,98$ y $-3,9$. En consecuencia, las eficiencias calculadas partir de la fórmula $E = [10^{(-1/S)} - 1]$ (S es la pendiente de la recta) para cada uno de los genes de mostró valores entre 0,798 (eficiencia del 78,8%) para *plpa* y 1,163 para *plpb*. Se consideran eficiencias válidas aquellas que se encuentran entre 0,9 y 1,2. La eficiencia de la amplificación del gen *plpa*, fue de 0,798 (79,8%) (Tabla 13) y además en la curva estándar se observó una baja sensibilidad de estos oligonucleótidos para amplificar bajas cantidades de templado (Figura 45). Considerando los resultados obtenidos, el gen *plpa* fue excluido del análisis transcripcional.

Gen	Pendiente	Eficiencia
<i>Bbiplpa</i>	-3,922	0,798
<i>Bbiplpb</i>	-2,9843	1,163
<i>Bbiplpc</i>	-3,2923	1,013
<i>Bbiplpd</i>	-2,9895	1,160
<i>Bbiplpe</i>	-3,1558	1,07
<i>Bbiplpf</i>	-3,0652	1,12
<i>Bbiplpg</i>	-3,0606	1,122
<i>Bbiplph</i>	-3,3455	0,99

Tabla 13. Pendiente de la curva estándar y eficiencia de la amplificación de los genes de interés.

Cuantificación de los transcritos de los genes *plp* a partir de ADN copia de *B. bigemina*

Se analizó la transcripción de los genes *plp* a partir de ARN total extraído a partir de dos un cultivo *in vitro* de la cepa BbiS2P : Se realizaron tres síntesis independientes de ADNc,. La eficiencia de la transcripción se verificó a través de la amplificación del gen *rap -1a*, que su vez se utilizó como control para descartar contaminación con ADN (Figura 46).

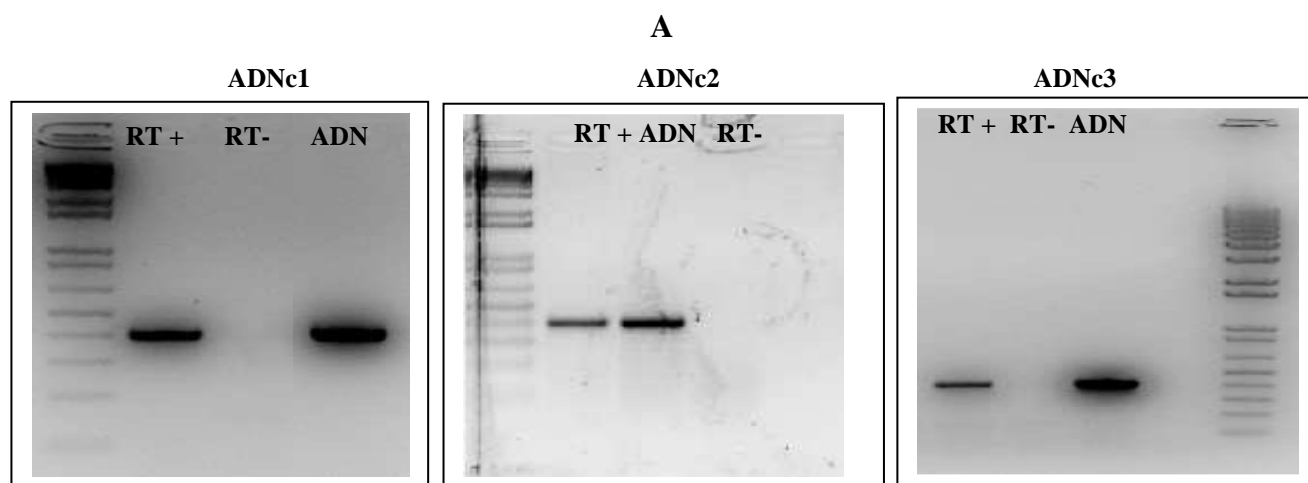


Figura 46. Amplificación del transcripto *rap-1a* para verificar la calidad de los ADNc sintetizados a partir de cada una de las muestras de ARN

Para cada uno de los ADNc se realizó una PCR cuantitativa con los oligonucleótidos específicos obteniendo los calores de Ct para cada fragmento amplificado en cada ADNc. Los valores de Ct fueron extrapolados en cada caso en las curvas estándar a partir de la fórmula de la

recta para obtener el logaritmo del número de moléculas y luego el número de moléculas. Para evitar las variaciones inherentes a cada ADNc se relativizó la expresión de los genes *plp* a un gen de referencia calculando un índice de expresión relativa de todos los genes en cada ADNc, (Número de moléculas del gen de interés/número de moléculas del gen de referencia). El gen de referencia seleccionado en este trabajo codifica para la enzima fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, enzima clave en el metabolismo de los carbohidratos. En el genoma *B. bovis* se encuentra en una sola copia (*locus tag*: BBOV_IV000790) y debido a la alta conservación de este tipo de genes a lo largo de escala evolutiva asumimos que en *B. bigemina* es de copia única por lo cual fue seleccionado para este estudio.

Los resultados de la cuantificación relativa de la transcripción de los genes *plp* demostraron la presencia de una mayor cantidad de transcripto correspondiente al gen *plpe* y *plpb* en todos los ADNc analizados observándose que en la mayoría de los ADNc habría una mayor abundancia del transcripto correspondiente al gen *plpe* (Figura 47).

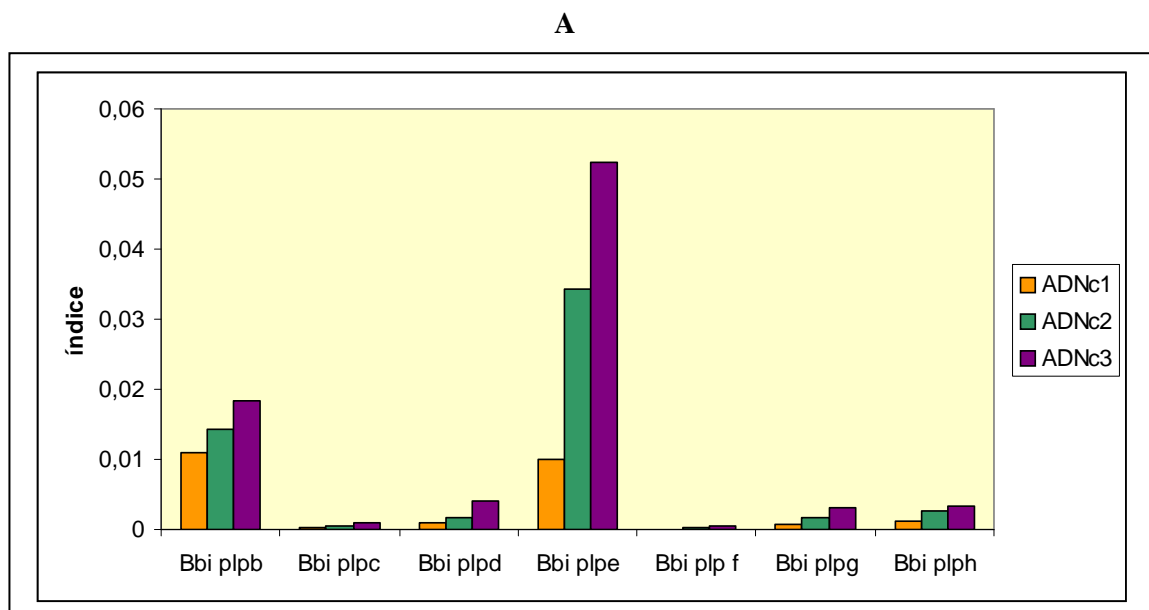


Figura 47. Transcripción relativa de los genes *plp* de *B. bigemina* teniendo en cuenta la transcripción del gen de referencia fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (índice=Número de moléculas de gen *plp*/Número de moléculas gen de referencia). A., Comparación de los índices de los tres ADNc por separado.

Las diferencias en los índices de transcripción de todos los transcritos se mantienen en todos los ADNc aunque con el ADNc1 encontramos diferencias en la tendencia de que los niveles de transcripción de gen *plpe* son mayores que los del gen *plpb*. Es probable que estas diferencias se deban a un error técnico en el experimento realizado con el ADNc.

Para validar estadísticamente los resultados analizando la interacción de cada ADNc en la variación de los niveles transcripcionales de cada gen *plp*, en primer lugar se realizó un análisis gráfico del logaritmo del número de moléculas para cada gen y se corroboraron las distribuciones simétricas en todos los ADNc (Figura 48).

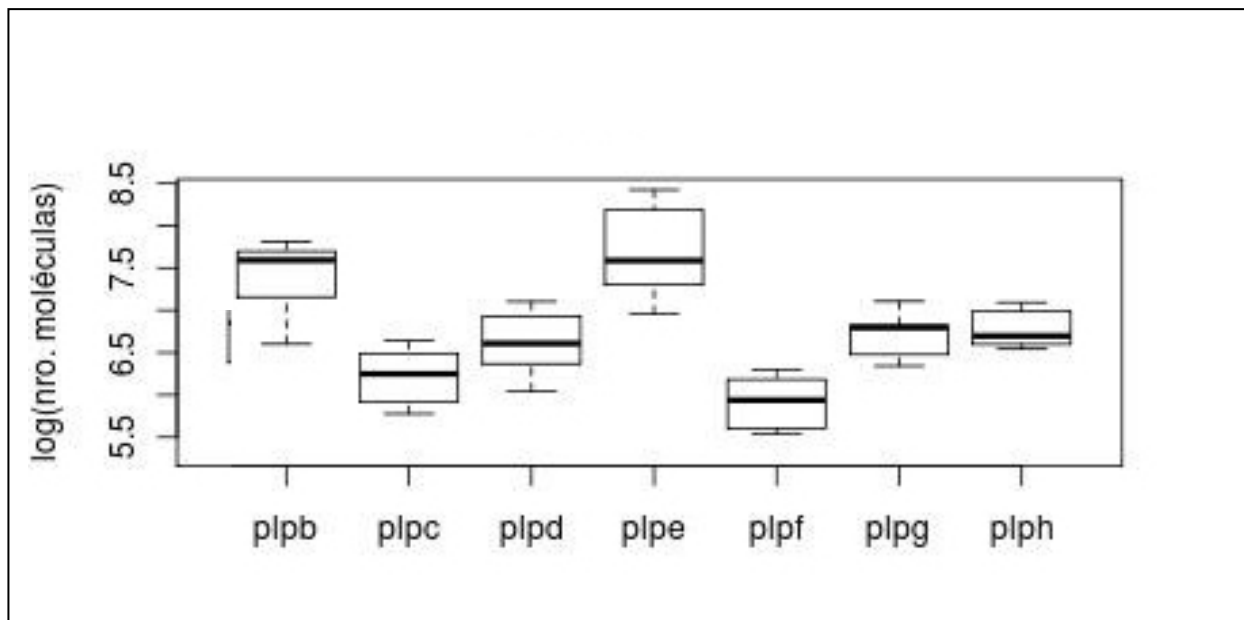


Figura 48. Gráfico de cajas (Boxplot) realizado con el programa R versión 2.12 para observar la distribución de los valores del logaritmo del número de moléculas de los genes *plp* obtenidos en el análisis de cada ADNc correspondiente al ARN . Se observan la barras de error.

Por otro lado, el Análisis de la Varianza de los datos logarítmicos de abundancia en función del gen analizado y del lote de ADNc utilizados indicaron la existencia de diferencias altamente significativas entre genes y entre ADNc habiendo una fuerte interacción entre ambos, lo que indicaría que las respuestas de los genes variaron según la fuente de ADNc aunque los perfiles de expresión en cada ADNc resultaron similares (Figura 49).

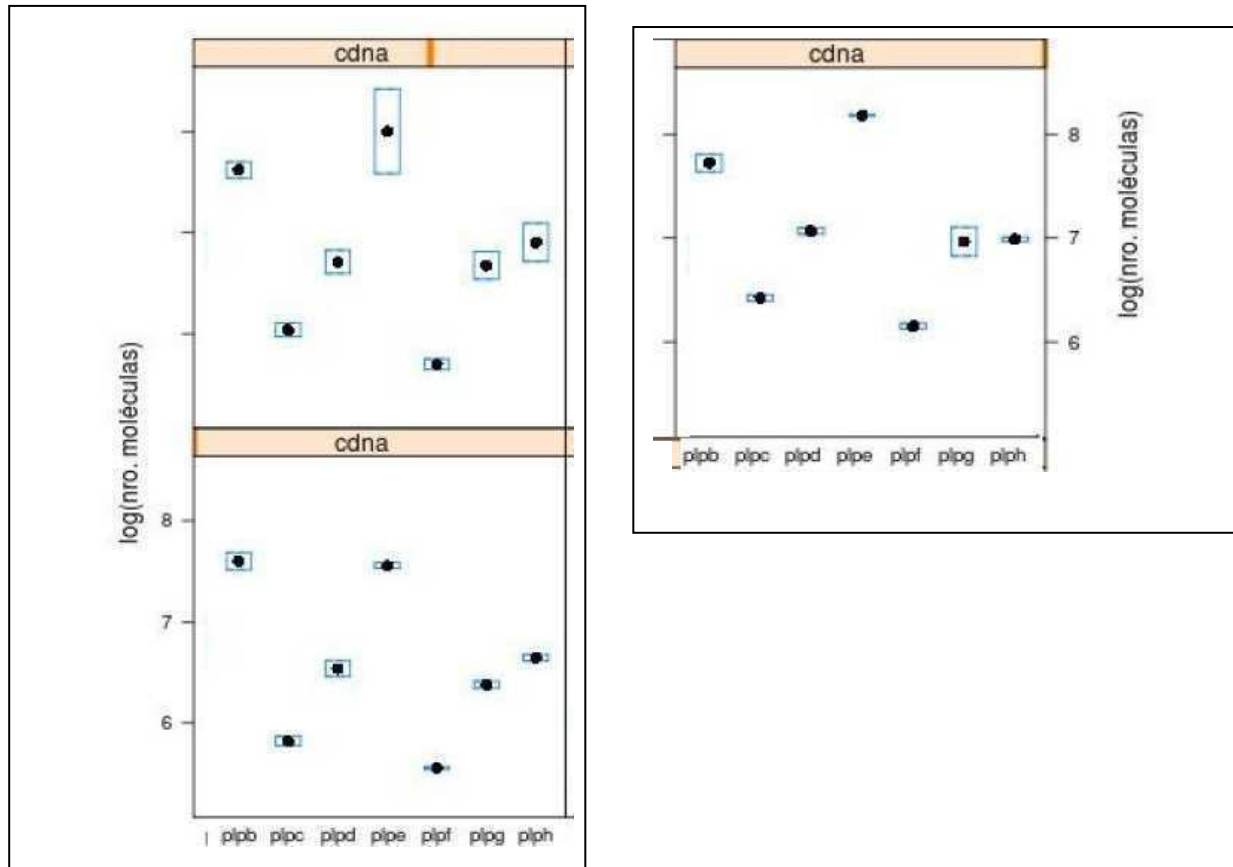


Figura 49. Análisis de la Varianza de los niveles de transcripción de los genes *plp* en cada ADNc.

Para determinar los contrastes entre genes se realizó un test de Tukey, que permite incluir la interacción del modelo. Los resultados de este análisis mostraron que el transcrito correspondiente al gen *plpe* resultó ser significativamente más abundante que los otros transcritos, excepto el correspondiente a *plpb*. En este caso si bien se observó una mayor cantidad del transcrito *plpe* con respecto al *plpb* las diferencias no fueron significativas (Tabla 11).

Genes	Diferencia	lím.inferior	lím.sup	p ajustado
plpc-plpb	-1.55494790	-1.88203771	-1.22785808	0.0000000
plpd-plpb	-0.87666064	-1.20375046	-0.54957082	0.0000001
plpe-plpb	0.26473720	-0.06235262	0.59182702	0.1768337
plpf-plpb	-1.84746123	-2.17455104	-1.52037141	0.0000000
plpg-plpb	-0.97562051	-1.30271033	-0.64853070	0.0000000
plph-plpb	-0.80355826	-1.13064808	-0.47646844	0.0000006
plpd-plpc	0.67828725	0.35119744	1.00537707	0.0000104
plpe-plpc	1.81968510	1.49259528	2.14677491	0.0000000
plpf-plpc	-0.29251333	-0.61960315	0.03457649	0.1034953
plpg-plpc	0.57932738	0.25223756	0.90641720	0.0001125
plph-plpc	0.75138964	0.42429982	1.07847946	0.0000019
plpe-plpd	1.14139784	0.81430802	1.46848766	0.0000000
plpf-plpd	-0.97080058	-1.29789040	-0.64371076	0.0000000
plpg-plpd	-0.09895987	-0.42604969	0.22812995	0.9696569
plph-plpd	0.07310239	-0.25398743	0.40019220	0.9946518
plpf-plpe	-2.11219843	-2.43928824	-1.78510861	0.0000000
plpg-plpe	-1.24035771	-1.56744753	-0.91326790	0.0000000
plph-plpe	-1.06829546	-1.39538528	-0.74120564	0.0000000
plpg-plpf	0.87184071	0.54475089	1.19893053	0.0000001
plph-plpf	1.04390297	0.71681315	1.37099279	0.0000000
plph-plpg	0.17206226	-0.15502756	0.49915208	0.6616190

Tabla 14. Resultados obtenidos del análisis de contrastes con el Test de Tukey. En amarillo se observa la comparación del gen *plpe* con el resto de los genes. Los valores p indican la significancia de estas diferencias (p ajustado a múltiples comparaciones < 0,05). Lím, inferior y lím. Sup corresponden a los límites del intervalo de confianza del 95%

Con el fin de complementar los análisis anteriores y verificar que los genes *plpe* y *plpb* se transcriben mayoritariamente se realizaron contrastes comparando todos los genes contra uno de ellos usando el test de Dunnet. Se seleccionó para la comparación el gen *plpe* debido a lo observada en los resultados presentados anteriormente que sugieren una mayor transcripción del gen *plpe*. La comparación de todos los genes con el gen *plpe* mostró resultados comparables a los del test de Tukey. Por lo tanto, la abundancia del transcripto correspondiente al gen *plpe* es significativamente mayor que la los otros genes, exceptuando *plpb* (Tabla 15).

	Estimación	Error std	valor de t	Pr(<t)	
plpb-plpe >= 0	0.04577	0.17106	0.268	0.929623	
plpc-plpe >= 0	-1.73468	0.17106	-10.141	< 1e-04	***
plpd-plpe >= 0	-1.01830	0.17106	-5.953	< 1e-04	***
plpf-plpe >= 0	-2.00160	0.17106	-11.701	< 1e-04	***
plpg-plpe >= 0	-1.17821	0.17106	-6.888	< 1e-04	***
plph-plpe >= 0	-0.91171	0.17106	-5.330	< 1e-04	***

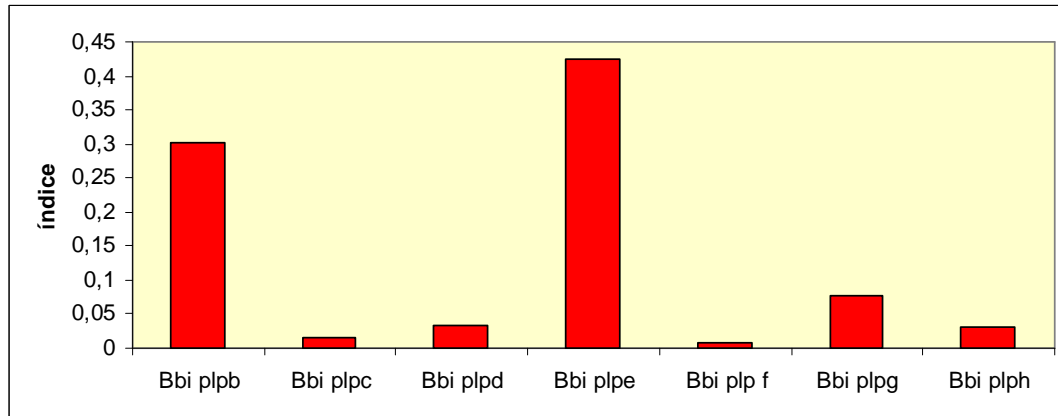
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
(Adjusted p values reported -- single-step method)					

Tabla 15. Resultados obtenidos del análisis de contrastes con el Test de Dunnett, comparación de todos los genes contra el gen *plpe*. En amarillo se muestran las comparaciones significativas ($p < 0,05$), sin resaltar la comparación entre el gen *plpe* y el gen *plpb* cuyas diferencias no resultaron significativas

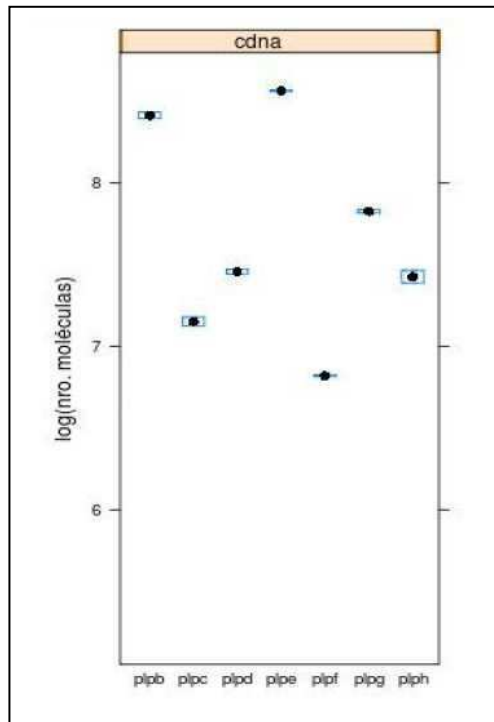
Los resultados obtenidos en el análisis del ARN procedente del cultivo *in vitro* con glóbulos rojos infectados con la cepa BbiS2P expandido en un determinado momento, demostraron que los parásitos intraeritrocitarios poseen un mayor nivel de transcripción de los genes *plpe* y *plpb* con respecto al resto de los genes aunque no pudimos demostrar estadísticamente que el gen *plpe* se transcribe más que el gen *plpb*.

Considerando que el cultivo de *B. bigemina* no está sincronizado y por lo tanto la proporción de los estadios intraeritrocitario (trofozoítos, formas pares) en cada cultivo es variable, realizamos un análisis preliminar de la transcripción de un solo ADNc sintetizado a partir de un ARN proveniente de un cultivo de la misma cepa pero expandido en otro momento. Los resultados de la PCR cuantitativa resultaron ser similares a los obtenidos con el ARN 1. Los genes *plpe* y *plpb* se transcriben más que el resto (Figura 50).

A



B



C

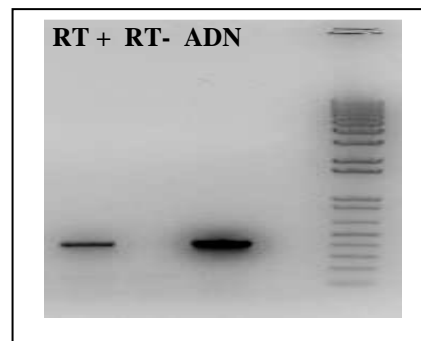


Figura 50. A. Análisis de los índices de transcripción relativo al gen de referencia *fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa* (número de moléculas gen *plp*/número de moléculas gen de referencia. **B.** Análisis de la Varianza de los niveles de transcripción de los genes *plp* en el ADNc. **C.** Amplificación del transcripto *rap-1a* para verificar la calidad del ADNc.

Finalmente, estos resultados fueron validados por *Northern Blot* con ARN total de *B. bigemina* utilizando sondas específicas para los dominios MACPF de los genes *plpa*, *plpb*, *plpc*, *plpg* y *plph*. Se observó la presencia de los transcritos correspondientes al gen *plpb* al igual que en *B. bovis* (Figura 51) y *plph* (Figura 52) en *B. bigemina*. En los demás casos, no se observaron bandas claramente definidas con el peso molecular esperado.

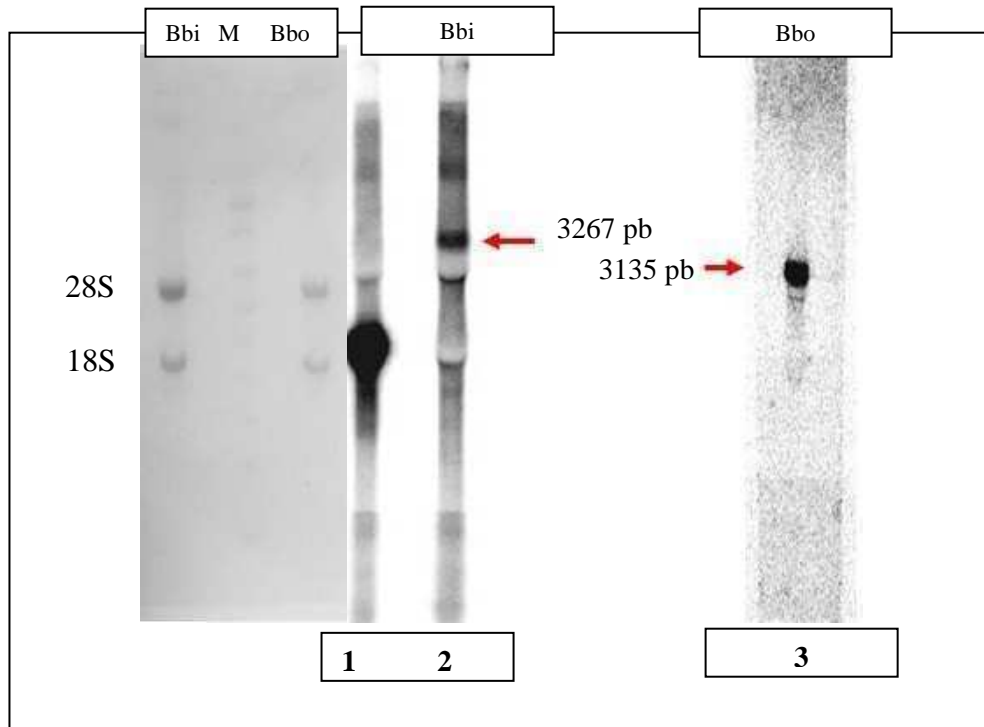


Figura 51. *Northern Blot* para verificar la transcripción de los genes *Bbiplpb* y *Bboplpb*. **A.** Gel MOPS 1.2% Agarosa de ARN de *BbiS2P* y *BboS2P* y M: marcador RNA ladder (Promega) **B.** Membrana hibridada con la sonda correspondiente a un fragmento de 200 pb del dominio MACPF de *Bbiplpb* (2) y *Bboplpb*: 1500 pb (3). Sonda control de la transcripción *Bbirap1a* (1). Todas las sondas fueron marcadas con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP.

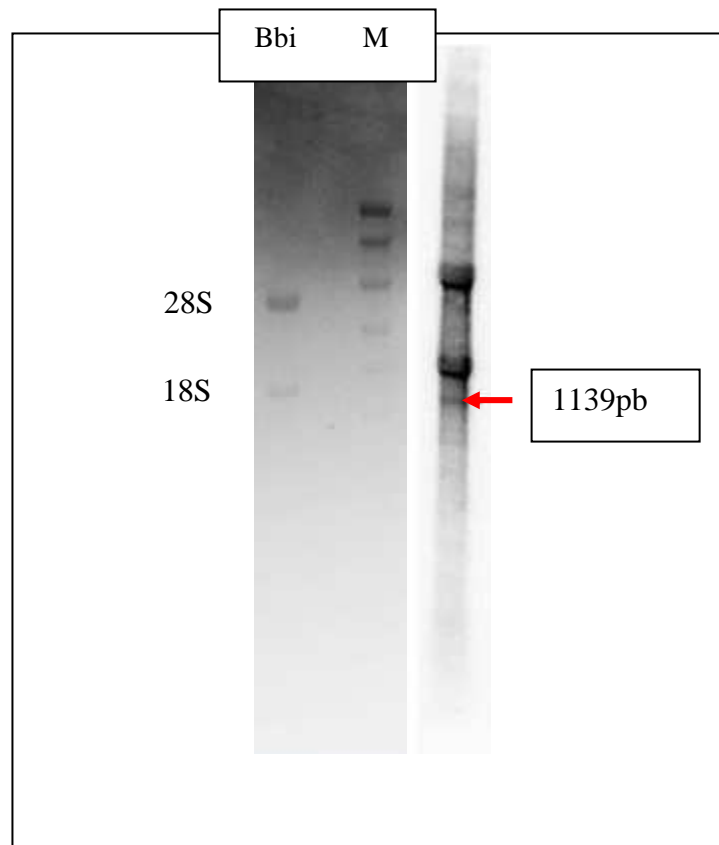


Figura 52. Northern Blot para verificar la transcripción del gen *Bbiplph* **A.** Gel MOPS 1.2% Agarosa de ARN de BbiS2P y M= marcador RNA ladder (Promega) **B.** Membrana hibridada con la sonda correspondiente a un fragmento de 200 pb del dominio MACPF de *Bbiplph*. La sonda fue marcada con [α - 32 P] dCTP.

Tal como se describió en el punto 2. 3. 2 del objetivo 2 de este trabajo de tesis, existe una diferencia en cuanto a la anotación del gen *plpe* de *B. bovis* y los genes *plpe*, *g* y *h* de *B. bigemina*. En *B. bovis* el gen *plpe*, anotado en la base de datos de genes de referencia Refseq del NCBI, posee tres dominios MACPF, mientras que en este trabajo se anotaron en *B. bigemina* tres genes separados cuyos dominios resultaron ser ortólogos a cada dominio del gen *Bboplpe* (Figura 53).

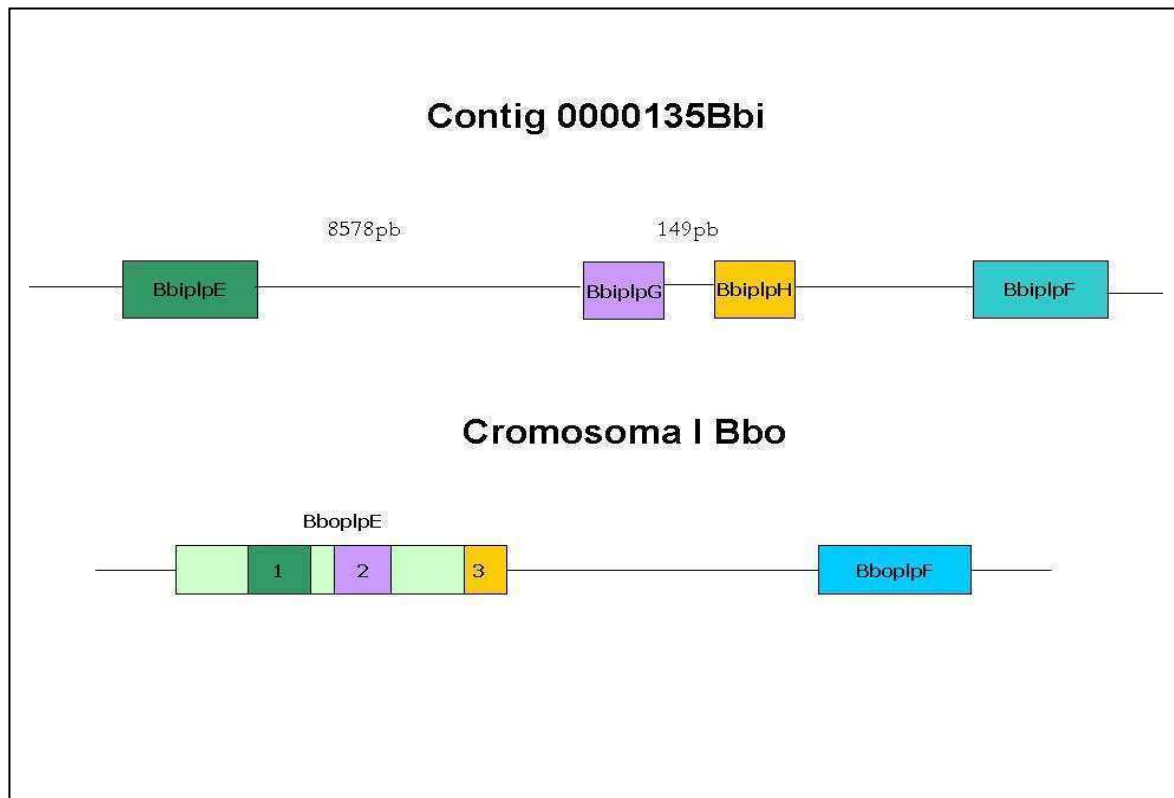


Figura 53. Esquema del *contig* 00000135 de *B. bigemina* y del cromosoma I de *B. bovis* donde están representados los genes *plpe*, *g*, *h* y *f* de *B. bigemina* y *plpe* y *f* de *B. bovis*. Los colores representan la ortología que hay entre los genes de *B. bigemina* y *B. bovis*

Los resultados de los estudios transcripcionales demostraron la transcripción individual de los genes *plpe*, *g* y *h* de *B. bigemina* lo cual confirma la anotación sugiriendo la existencia de un fenómeno de separación o fusión de genes en *Babesia* spp.

2. 2. 6. Caracterización de la proteína PLPA de *B. bigemina*

Las proteínas del tipo perforinas son proteínas secretorias y en apicomplejos existen evidencias de que éstas se localizan en micronemas (Kaiser y col., 2004; Kafsack y col., 2009). Estas organelas secretan proteínas durante la invasión del parásito a la célula hospedadora (Preiser y col., 2000), por lo tanto es probable que algunas de las proteínas secretadas por los micronemas estén expuestas al sistema inmunológico del hospedador. En este trabajo se seleccionó la proteína PLPA que posee la secuencia de exportación de la proteína hacia la membrana y además contiene una región altamente repetitiva que resultó variable en distintas cepas de *B. bigemina*. Se ha reportado que estas repeticiones podrían jugar un rol importante en la interacción patógeno-hospedador, tales como la adhesión a células del hospedador o la evasión del sistema inmune (Depledge y col., 2007; Fankhauser y col., 2007).

2. 2. 6. 1. Producción de BbiPLPA recombinante (BbiplpAr)

Debido a que la región amino terminal de esta proteína posee las repeticiones en tándem que resultaron polimórficas en distintas cepas de *B. bigemina*, se clonó la región conservada que contiene el dominio MACPF (Figura 54) en un vector de expresión procariota que permite la fusión del gen en estudio a una etiqueta de Histinas para la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad.

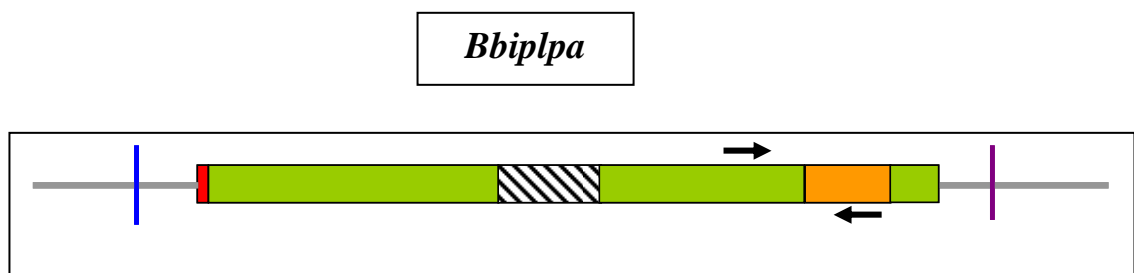


Figura 54. Esquema del gen *Bbiplpa* correspondiente a la anotación realizada en este trabajo. La región con barras oblicuas corresponde a las repeticiones y el dominio MACPF se encuentra marcado en naranja. Las flechas corresponden a los oligonucleótidos específicos con los cuales se amplificó el fragmento de 1140 pb para ser clonado.

Las bacterias BL21pLys de *Escherichia coli* expresaron efectivamente la proteína BbiplpAr y luego de la ruptura en condiciones nativas observamos que la proteína resultó insoluble quedando en cuerpos de inclusión en el *pellet* mientras que no se observó la proteína recombinante en el sobrenadante (Figura 55A).

La proteína purificada fue reconocida por el anticuerpo reactiva contra las Histidinas observándose en el Western Blot una banda específica del tamaño esperado (Figura 55B)

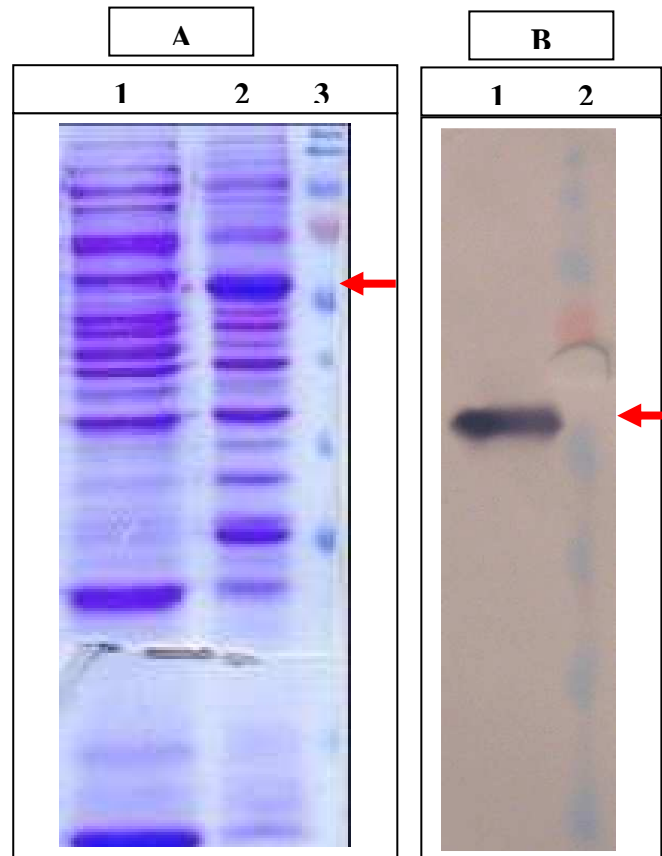


Figura 55. A. BbiPLPAr expresada en *E. coli* Las calles corresponden al sobrenadante (1), *pellet* (2) y marcador de peso molecular (Fermentas). **B.** *Western Blot* utilizando anticuerpo anti-histidina. La flecha marca la BbPLPAr con el tamaño predicho de 55 KDa.

2. 2. 6. 2. Producción de sueros policlonales específicos contra BbiPLPAr

Se logró producir sueros de ratón policlonales específicos contra la proteína recombinante BbiPLPA. Estos anticuerpos fueron detectables a los 14 días de la inoculación del antígeno y luego de los 21 días posteriores a la aplicación del segundo estímulo. En la figura 56 se muestra

la reacción a la proteína recombinantes de los sueros correspondientes a los 21 días post-estímulo de cinco ratones inoculados con la proteína recombinante.

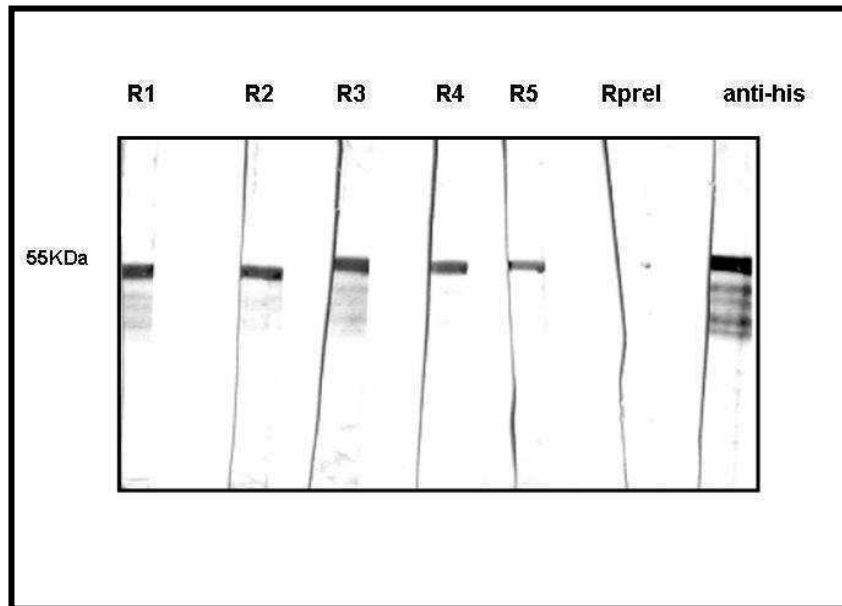
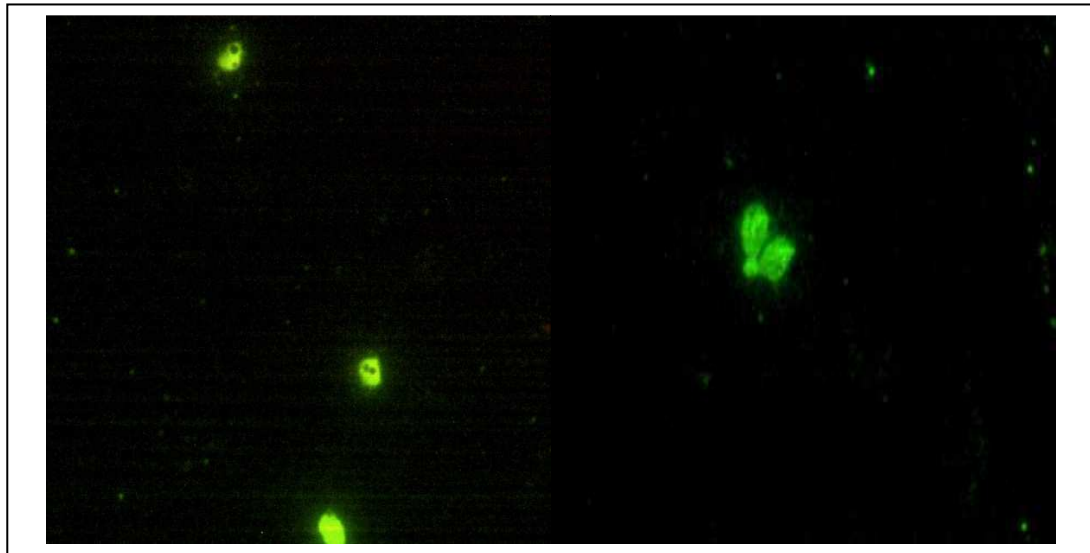


Figura 56. Producción de sueros policlonales de ratón reactivos a la BbiPLP (dil 1/200). R1 a R5 corresponden a diferentes ratones inoculados con la proteína recombinante (día 21 luego del segundo estímulo con la proteína recombinante) RpreI= ratón pre-inmune (control de especificidad del suero de ratón inmunoreactivo contra la BbiplA). Anti-his= anticuerpo anti-histidina. (Control positivo)

2. 2. 6. 3. Expresión de la proteína BbiplA en el estadio intraeritrocitario

Con el objetivo de probar la inmunoreactividad de los sueros de ratón a la proteína PLPA nativa del estadio intraeritrocitario de *B. bigemina*, se realizó una Inmunofluorescencia indirecta utilizando extendidos de sangre infectada con *B. bigemina*. Los resultados demostraron una intensidad de fluorescencia alta para el suero del ratón R2 y el R3 de la magnitud del anticuerpo utilizado como control positivo, mientras que no hubo emisión de fluorescencia con el suero de ratón pre-inmune (Figura 57)



B

C

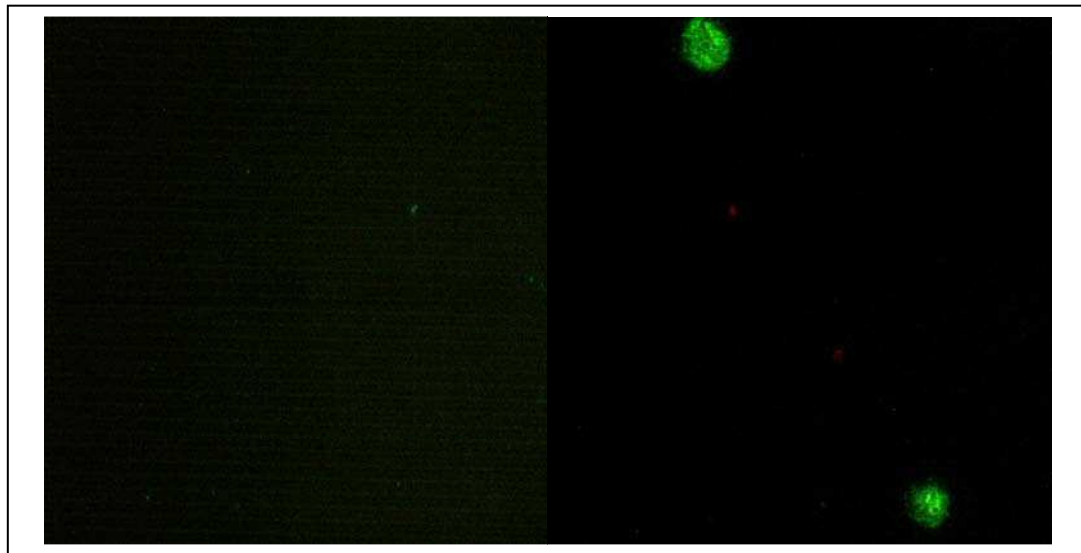


Figura 57. Inmunofluorescencia indirecta. **A.** Suero de ratón ; **B.** Suero pre-inmune **C.** Control positivo de la técnica: anticuerpo monoclonal anti-IgM de la superficie del eritrocito infectado con *B. bigemina* (Echaide y col., 1998)

Pudimos comprobar que los sueros de ratón inmunoreactivos a la proteína recombinante reconocen la proteína BbiPLPA en su forma nativa.

Por otro lado, estos resultados demostraron que la proteína BbiPLPA se expresa en el estadio intraeritrocítico y como se observa en la figura 57A existe expresión de la proteína en el estadio de merozoíto luego de la división celular por fisión binaria que da lugar a las formas pares las cuales están listas para egresar del eritrocito e infectar nuevos. Esta evidencia resulta

importante teniendo en cuenta el rol que cumplen las proteínas del tipo perforina en otros apicomplejos en el egreso del parásito de la célula hospedadora. Esto podría ser un indicio de la función de la BbiplpA.

2. 2. 6. 4. Reconocimiento de la proteína recombinante BbiplpAr por sueros bovinos

Se estudió la reactividad inmunológica de la proteína recombinante frente a sueros de bovinos naturalmente infectados (Figura 58). Se observó reconocimiento de la proteína recombinante por parte de los sueros bovinos provenientes de zona donde la babesiosis es enzoótica (positivos para el ELISA indirecta utilizado como diagnóstico de referencia). No hubo reconocimiento con el suero bovino de un bovino no infectado.

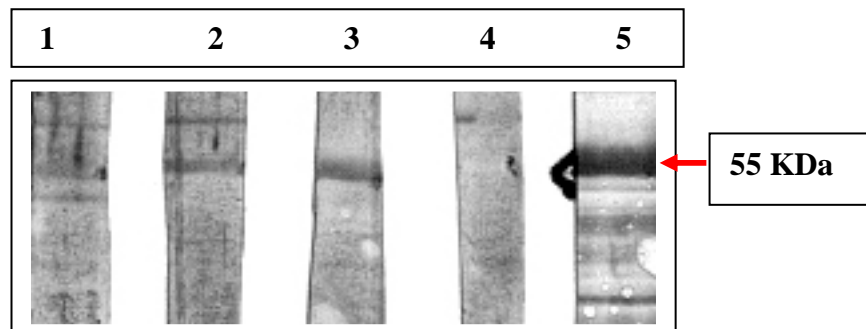


Figura 58. *Western blot* con PLP recombinante. Primer anticuerpo= 1 a 3: sueros bovinos de diferentes animales de campo; 4: suero bovino negativo; 5: control positivo anticuerpo monoclonal anti-Histidina.

Los resultados sugieren que esta proteína podría ser un antígeno capaz de despertar una respuesta inmune específica en bovinos.

Discusión

Los avances en el campo de la biología molecular, permiten desarrollar nuevos métodos de identificación de posibles genes y proteínas candidatas para su utilización en el diagnóstico de la babesiosis bovina y el desarrollo de vacunas para evitar la enfermedad en los bovinos que habitan en áreas enzoóticas.

En cuanto al diagnóstico de la babesiosis, en la actualidad existen métodos de detección del parásito (detección directa) y métodos de detección de anticuerpos contra el parásito (detección indirecta). Estos últimos comprenden pruebas serológicas tales como el ELISA indirecto y la Inmunofluorescencia indirecta los cuales solo permiten diferenciar a los animales de acuerdo a su estado inmunológico con respecto a la enfermedad, en consecuencia estas pruebas no siempre se correlacionan con la presencia del parásito en sangre. Es por eso que el método ampliamente utilizado para la detección directa es la observación por microscopía óptica de extendidos de sangre bovina aunque una de las desventajas de este método es que posee una baja sensibilidad pudiendo solo detectar parásitos en sangre proveniente de animales en la etapa aguda de la enfermedad (Bösse y col., 1995).

En este trabajo de tesis, se desarrolló una técnica de detección molecular de *B. bigemina* basada en la amplificación de un fragmento correspondiente a la región conservada de las cinco copias del gen *rap-1a: a1* (en dos copias), $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ cuyo locus fue descrito detalladamente por Suarez y col. (2003). La amplificación de una región específica de 412 pb de este gen nos permitió detectar solo las cepas de *Babesia bigemina* estudiadas en este trabajo, mientras que las cepas de *B. bovis* y *A. marginale* no fueron detectadas. La alta especificidad del método para detectar *B. bigemina* sumado a que esta PCR consiste en un solo paso con un bajo límite de detección permitiendo detectar muestras de sangre con parasitemia de 0,00002% de eritrocitos parasitados, indetectable al microscopio óptico., resultan ser características valiosas para un método de detección del parásito

Si bien se han reportado varios métodos de detección molecular de *B. bigemina* altamente sensibles, su aplicación resulta laboriosa y económicamente costosa debido a que se basan en una PCR en dos pasos (PCR-anidada) y en reacciones de PCR con la subsiguiente hibridación del producto con sondas específicas (Oliveira-Sequeira y col., 2005; Figueroa y col., 1992; Gubbels y col., 1992).

Por otro lado, la sensibilidad de este método fue demostrada en la detección del parásito en muestras de sangre provenientes de bovinos de un área donde la enfermedad es enzoótica. Asimismo, los resultados de la PCR para estas muestras realizadas en dos laboratorios distantes

sujetos a variables técnicas características de cada operador y de cada lugar, demostraron una concordancia del 97% (índice kappa 0,94) en la detección de *B. bigemina* en estas muestras demostrando la robustez de este método de detección molecular de *B. bigemina*

Por lo descripto anteriormente, podemos afirmar que la técnica de detección molecular de *B. bigemina* desarrollada en este trabajo de tesis, resulta ser una herramienta valiosa para el estudio epidemiológico de la babesiosis bovina en animales portadores de este hemoparásito calculando tasas de infección por *B. bigemina* en áreas enzoóticas. Además resultó ser una herramienta útil para la detección del parásito en todas las muestras utilizadas en este trabajo de tesis.

Otros intereses, para mejorar el diagnóstico y la prevención de la babesiosis, están dirigidos a la búsqueda de nuevos antígenos *B. bigemina* (Wright y col., 1992; Shompole y col., 1994; Norimine y col., 2002, entre otros). Esta búsqueda se ha focalizado principalmente en las proteínas de superficie del merozoíto (Wilkowsky y col., 2003), las roptrias (Wright y col., 1992) y antígenos de la membrana de eritrocitos (Shompole y col., 1994) pero a pesar de ello, pocos antígenos han sido reportados.

En la actualidad uno de los abordajes más utilizados para la identificación de antígenos de manera sensible y específica es el análisis proteómico utilizando geles en dos dimensiones combinado con la técnica de *Western Blot* con sueros inmunoreactivos (Klade., 2002). En apicomplejos varios análisis de geles de dos dimensiones han identificado antígenos nuevos (Geibler y col, 1999; Shin y col., 2005; Orlandi-Pradines y col., 2007). En *Babesia* spp. no existen antecedentes en cuanto a la aplicación de estas técnicas para la identificación de antígenos. En este trabajo, logramos aplicar técnicas de proteómica para identificar antígenos solubles de merozoítos de *B. bigemina*, optimizando la purificación de parásitos, la extracción de proteínas y la separación de ellas por electroforesis en dos dimensiones. El protocolo que nos permitió obtener la mayor cantidad de proteínas solubles y una separación en el gel de dos dimensiones más eficiente fue el utilizado para extraer proteínas solubles de *Mycobacterium Smegmatis* (Echeverría y Xolalpa, comunicación oral). Con la separación de las proteínas solubles de merozoítos de *B. bigemina* optimizada, el análisis por *Western Blot* utilizando sueros bovinos infectados nos permitió detectar proteínas inmunoreactivas. Cabe destacar que los sueros utilizados fueron obtenidos en distintas condiciones de inmunización, uno de ellos proveniente de una inoculación experimental inoculando con un extracto de antígenos solubles de una cepa venezolana y antígenos vivos de una cepa mexicana (FAO) (Guglielmone y col., 1997), otro producto de una inoculación con antígenos solubles y un tercer suero fue extraído de un animal infectado naturalmente proveniente de la zona enzoótica para la babesiosis. De esta manera se

puede concluir que los antígenos identificados por inmunoproteómica son inmunodominantes en el bovino durante la infección. Estudios posteriores deberán dirigirse a la secuenciación por MALDI-TOF de estas proteínas aunque la mayoría no se pudo identificar en el gel teñido con Coomassie coloidal. En consecuencia otras proteínas no reconocidas por los sueros bovinos hiper-inmunes podrían ser candidatos más efectivos para la vacunación. Es probable que estos antígenos subdominantes sean esenciales para la supervivencia del parásito explicando el motivo por el cual las infecciones con *Babesia* spp persisten en el bovino a pesar de la fuerte respuesta inmune contra el parásito (Brown y col., 2006)

Por otro lado se observó que las proteínas inmunoreactivas a los sueros bovinos resultaron ser ácidas con puntos isoeléctricos (pI) menores a 6,5. Este hallazgo es consistente con los reportes de varios autores acerca de la importancia de los residuos polares en el reconocimiento antígeno-anticuerpo (Davies, Sheriff y Padlan 1988; Getzoff y col., 1988; Berzofsky y Berkower 1989; Mian, Bradwell y Olson 1991; Davies y Cohen 1996).

La observación de la distribución de las proteínas de *B. bigemina* según su punto isoeléctrico mostró una distribución en el rango de 4,75 a 8,25 de la misma manera la predicción del pI realizada *in silico* de las proteínas de *B. bovis* demostró que la mayoría se ubicaron en este mismo rango mostrando una distribución trimodal. Este tipo de distribuciones se han observado en la mayoría de los proteomas de otros eucariotas (Kiraga y col., 2007) y además fue corroborada en este trabajo analizando los proteomas de *Theileria parva* y *Plasmodium falciparum*.

A través del desarrollo de técnicas proteómicas en *B. bigemina*, pudimos obtener más información acerca del repertorio de proteínas en un determinado estadio del parásito. Estos hallazgos junto con los estudios realizados utilizando el proteoma de organismos relacionados resulta ser complementario contribuyendo al conocimiento de la biología y la interacción del parásito en estudio con su hospedador.

Por otra parte, si bien la búsqueda de antígenos a través de un análisis proteómico resulta más trabajosa debido a que implica la optimización de la extracción de proteínas del parásito, la separación de las mismas en geles de dos dimensiones y la inmunodetección de antígenos utilizando sueros reactivos, permite disponer del proteoma completo del estadio del parásito en estudio y seleccionar al mismo tiempo varios antígenos.

Con el advenimiento de la era post-genómica la información aportada por los genomas completos de organismos pertenecientes al phylum Apicomplexa tales como *Theileria parva*, *Theileria annulata* y *Plasmodium falciparum* (Pain y col., 2005; Gardner y col., 2005; Gardner y col., 2002) ha contribuido a la identificación de nuevas proteínas. Asimismo, la secuenciación del

genoma completo de *B. bovis* y la publicación de los ESTs generaron la anotación de un sin número de proteínas, pero muchas con función desconocida (hipotéticas) (de Vries y col., 2006 y col., Brayton y col., 2007).

Por otro lado, la comparación de las secuencias de los genomas de *B. bovis*, *T. parva*, *T. annulata* y *P. falciparum* reveló que solo se le puede asignar una función al 30-38% de las proteínas predichas, sugiriendo que la mayoría de las proteínas de estos organismos son nuevas y características del phylum (Gardner y col., 2002; Gardner y col., 2005)

En la actualidad existen pocas proteínas anotadas de *B. bigemina* en el *National Center for Biotechnology Information* y el ensamblado del genoma está siendo finalizado. Sin embargo, la información disponible en la página del proyecto genoma del *Wellcome Trust Sanger Institute*, nos permitió hacer búsquedas de secuencias homólogas en los contigs aún no ensamblados utilizando algoritmos bioinformáticos.

En la búsqueda de nuevos antígenos surge la necesidad de dirigirla a procesos fundamentales para el desarrollo del parásito y su relación con su hospedador. El conocimiento de estos mecanismos genera información útil para el desarrollo de estrategias de control de la babesiosis.

Uno de los mecanismos fundamentales en el ciclo de vida de *Babesia* es el de la invasión del merozoíto a las células del hospedador mamífero y del vector artópodo. En la actualidad aún no han sido comprendidos en su totalidad. Asimismo, han sido descritas pocas proteínas involucradas en los mecanismos de invasión de *Babesia* (Goff y col., 1988; Mosqueda y col., 2002; Gaffar y col., 2004 a y b).

En este trabajo de tesis, se identificó en *B. bigemina* una nueva familia de genes que codifican para proteínas con dominio de ataque a membrana (MACPF) del tipo perforinas previamente estudiada en *Plasmodium* y *Toxoplasma* como una proteína involucrada en los mecanismos de invasión y salida del parásito de la célula hospedadora. Con la información de los genomas anotados y la utilización de algoritmos y servidores desarrollados para su análisis y anotación de genes hemos anotado una familia de ocho genes que codifican para proteínas con dominio MACPF en *B. bigemina* ortólogos a los seis genes *plp* definidos en este. La información de la anotación de los genes *plp* de *B. bovis* junto con los genes de *P. falciparum* nos permitieron predecir la estructura génica y la secuencia codificante de cada una de las secuencias extraídas del genoma de *B. bigemina*. Los ocho genes obtenidos con sus secuencias codificantes poseen el dominio MACPF y en su mayoría una secuencia de exportación a membrana. El análisis comparativo de la estructura de los genes predichos de *B. bigemina* y los anotados de *B. bovis* nos permitió establecer similitudes y diferencias en esta familia. La estructura del gen *plpa* y *plpb* no

presentó intrones y además ambos genes ortólogos *plpa* presentaron una región de repeticiones en tándem río arriba del dominio MACPF. Las diferencias son muy importantes, la familia en *B. bigemina* posee dos genes adicionales a los seis que existen en *B. bovis*, pero la diferencia principal es la aparición en *B. bovis* de una proteína con tres dominios MACPF (BboPLPE). Pudimos verificar que cada uno de esos dominios denominados BboPLPE1, BboPLPE2 y BboPLPE3 es ortólogo a los dominios únicos de las proteínas BbiPLPE, BbiPLPG y BbiPLPH. Esto podría estar indicando un proceso de fusión en *B. bovis* o separación en *B. bigemina* con el fin de cumplir algún rol importante para los mecanismos de invasión o egreso de estos parásitos.

Todos los dominios MACPF de *Babesia* presentaron los elementos fundamentales para la formación del poro compartidos, con distinto grado de similitud secuencial, con los dominios MACPF de mamíferos, bacterias y otros apicomplejos.

En este trabajo, demostramos que el motivo característico de todos los dominios MACPF (Y/W)-X₆-(F/Y)GTH(F/Y)-X₆-GG está conservado en todos los dominios de las proteínas del tipo perforinas de *Babesia* spp. En cuanto a la estructura secundaria, tanto en los dominios de *B. bovis* y *B. bigemina*, están conservadas las alfa hélices que conforman los dos grupos de hélices alfa característicos (CH1 y CH2), que alternan residuos hidrofóbicos e hidrofílicos con habilidad de convertirse las horquillas beta anfipáticas que atraviesan la membrana durante la inserción del poro (Peitsch y col., 1990). Asimismo, la conservación en los dominios MACPF de *Babesia* de una región rica en láminas beta hacia el carboxilo terminal juega un rol en la unión a la membrana (Shatursky y col., 1999). Finalmente, el modelo tridimensional predicho por homología a las dominios MACPF de proteínas cristalizadas del complemento humano (C8-MACPF) y la bacteria *Photorhabdus luminiscens* (Plu-MACPF) resultó en una gran conservación del plegamiento observándose en esta estructura la disposición espacial conservada de los dos grupos de hélices alfa y la región central rica en láminas beta de los dominios de las proteínas PLPA y PLPB de *B. bigemina*. La superposición estructural entre el modelo predicho y los templados fue estadísticamente significativa. Esto demostró la importancia de la conservación de la estructura a lo largo de la evolución para cumplir con la función característica del dominio MACPF.

Una característica propia que observamos en la familia de perforinas tanto de *B. bigemina* como de *B. bovis* es la presencia en la PLPA de un dominio de repeticiones en tándem con un patrón diferente para cada ortólogo. La evaluación de ambas repeticiones por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar esta región en diferentes cepas de referencia patógenas y atenuadas para cada parásito, mostró un polimorfismo en los tamaños de los productos obtenidos para cada cepa. En el caso de *B. bigemina* estas diferencias en los tamaños

resultó ser más notoria. Además, el análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados reveló diferencias en el número de unidades repetitivas y algunas variantes en el tipo de aminoácidos que componen la repetición. A su vez, generando un patrón numérico con cada variante de unidad repetitiva, pudimos asignar un patrón característico de las cepas atenuadas y por otro lado distintos patrones para las cepas patógenas. Se ha reportado este mismo fenómeno en una familia de genes del tipo BspA de *Trichomonas vaginalis* involucrados en la invasión de las células de la mucosa del hospedador. Estas proteínas poseen un dominio repetitivo que presenta variaciones en distintos aislamientos clínico. Por lo tanto, las repeticiones de la PLPA en *B. bigemina* podrían ejercer un rol en la interacción patógeno-hospedador bajo la presión del sistema inmune del hospedador (Noël y col., 2010).

En *B. bovis* las repeticiones analizadas son muy diferentes a las de *B. bigemina*, estas no presentaron grandes variaciones de tamaño entre cepas aunque si variaron a nivel de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Estas variaciones generaron dos grupos de acuerdo al aminoácido resultante, en uno de ellos se encuentran las cepas extranjeras y en otro las cepas argentinas.

Las repeticiones en tándem en proteínas, no son únicas de parásitos eucariotas, pero la magnitud del fenómeno en estos organismos sugiere que representan un caso especial. En *Plasmodium* spp. las repeticiones están extendidas entre proteínas de distintos estadios evolutivos, con distintos tipos de organización celular y aparentemente funciones divergentes. Una de las teorías acerca de la función de las repeticiones en *Plasmodium* spp., propone que estas regiones actúan como ligandos de estructuras del hospedador tales como receptores de eritrocitos y hepatocitos (Nussenzweig y Nussenzweig; 1989). Esta función podría ser la adecuada para explicar la presencia de las repeticiones en la perforinas de *Babesia* spp. debido a que su rol en la invasión del parásito al eritrocito bovino podría depender de la interacción de estas regiones de la proteína con un receptor del eritrocito. Otras proteínas polimórficas con repeticiones en tándem involucradas en los mecanismos de invasión, apoyan esta hipótesis. En nuestro laboratorio, se describió una región repetitiva de la proteína TRAP de *B. bovis*. A su vez, al igual que la PLPA esta resultó ser polimórfica entre distintas cepas del parásito (Wilkowsky y col., 2009). Otro posible rol de estos dominios repetitivos tiene que ver con los mecanismos que poseen estos parásitos para evadir el sistema inmune. Se ha demostrado que la proteína del circunsporozoíto (CS) de *Plasmodium* spp posee regiones repetitivas que inducen la producción de anticuerpos que no son protectivos (Schofield, 1991). Estos mecanismos, dirigen la respuesta inmune hacia mecanismos menos eficientes como la respuesta de tipo T- independiente, modulando de esta manera la respuesta inmune al parásito y favoreciendo la invasión del parásito a células nuevas (Galinski y col., 1987; di Giovanni y col., 1990).

Otra característica de la familia de proteínas del tipo perforinas en *Babesia*, resulta ser la expansión en cuanto al número integrantes de la familia y en cuanto a la cantidad de dominios que estas presentaron. Esto podría ser importante para adaptar las funciones de estas proteínas a su rol en el hospedador mamífero y en el vector artrópodo.

El número de dominios MACPF presentes en proteínas del Phylum Apicomplexa varía desde ninguno en *Cryptosporidium*, a dos o tres en la familia Coccidiae (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Eimeria*), cinco en Haemosporida (*Plasmodium*) y ocho en Piroplasmida (*Babesia* y *Theileria*) (Kafsack y Carruthers, 2010).

En este trabajo reportamos una nueva disposición de dominios MACPF en el orden Piroplasmida, demostrando la presencia en de una proteína de tres dominios en *B. bovis* y *T. annulata* y dos proteínas adicionales con dominio único en *B. bigemina* y *T. parva*. Además, cada uno de los dominios de las proteínas separadas es ortólogo a uno de los dominios en la proteína multidominio.

El análisis filogenético de los dominios de las PLPs de Haemosporida y Piroplasmida realizado en este trabajo nos permitió profundizar acerca de la historia evolutiva de este dominio en Apicomplexa estableciendo que dominios estuvieron presentes en el ancestro común de estos dos órdenes relacionados.

Se pudo demostrar que la evolución de la familia en Apicomplexa fue paralela a la evolución de las especies de este phylum ya que el la topología del árbol filogenético de los dominios MACPF se corresponde con el árbol de especie.

La reconstrucción filogenética de los dominios MACPF permitió plantear como hipótesis evolutiva la existencia de cuatro proteínas del tipo perforinas en el ancestro común a Haemosporida y Piroplasmida habiéndose producido a lo largo de la evolución varios eventos de pérdida y duplicación linaje-específicas que dieron origen a las cinco PLPs de Haemosporida, las seis de *B. bovis* y *T. annulata* y las ocho de *B. bigemina* y *T. parva*.

Un hallazgo importante fue la presencia de los tres dominios en la proteína PLPE en el ancestro común a Piroplasmida-Haemosporida, demostrando que estos dominios no son exclusivos de Piroplasmida aunque su fusión apareció recientemente formando parte de una única PLP. Por otro lado, las PLPs con un solo dominio MACPF son más frecuentes en Haemosporida, lo que señala que hubo dos eventos independientes de fusión de dominios en *B. bovis* y *T. annulata*. La adquisición de más de un dominio en *B. bovis* y *T. annulata* implicaría que estas proteínas multidominio cumplirían algún rol específico de estos parásitos. A través de la observación del árbol filogenético podemos deducir que existió una duplicación en Piroplasmida que dio origen a los genes *plpe/plpe1* y *plpg/e2* que poseen un ancestro en común y

probablemente estos se fusionaron en *B. bovis* y en *T. annulata*. El tercer dominio deriva de otro ancestro por lo que podemos inferir que este se fusionó en otro evento independiente.

Mientras la caracterización funcional de las PLPs en *Plasmodium* spp. implica un rol en el recorrido del ookinete a través del epitelio del intestino medio del mosquito (PLP3 y PLP5) o en el recorrido del esporozoíto (PLP1), posiblemente otras PLPs podrían estar involucradas en el egreso del parásito de la célula como ocurre en *T. gondii* (Kafsack y col., 2009). Estudios recientes indican la expresión de la PLP1 y PLP2 de *Plasmodium* en el estadio intraeritrocítico y de la PLP5 en gametocitos (Lasonder y col., 2002; Florens y col., 2002). Ninguno de estos estadios necesita atravesar barreras celulares, pero la salida del parásito de la vacuola parasitófora y de la célula, es fundamental para el desarrollo del ciclo de vida. En el caso de los organismos del orden Piroplasmida, estos se escapan rápidamente de la vacuola parasitófora luego de la invasión y replicación.

A partir de este análisis transcripcional de los genes de la familia *plp* podemos concluir que todos estos genes se transcriben tanto en *B. bovis* como en *B. bigemina*, estos resultados podrían complementarse con los resultados del análisis de perfiles de expresión de todos los genes durante el ciclo de vida de *P. falciparum* y *P. berghei* que han demostrado que la mayoría de los marcos de lectura abiertos (*ORFs*) se transcriben durante el estadio intraeritrocitario (Bozdech y col., 2003; Le Roch y col., 2003). Sin embargo, se ha descrito la acumulación de ARN mensajero de genes relacionados sugiriendo un modelo de control de la transcripción de acuerdo a la demanda fisiológica del parásito donde se activan los genes cuya función fisiológica se convierte en necesaria para el parásito (Gomez y col., 2010). En tal sentido, el análisis cuantitativo de la transcripción de los genes *plp* en el estadio intraeritrocitario de un cultivo de *B. bigemina* mostró diferentes niveles de transcripción con una abundancia estadísticamente significativa de los transcritos correspondientes a los genes *plpe* y *plpb*. Además los resultados del *Northern Blot* demostrarán la alta transcripción del gen *plpb* apoyadas por las evidencias obtenidas en las bases de *ESTs* de sus genes ortólogos que demuestran la transcripción del gen *plpb*, en *Theileria parva*. En *B. bovis* se encuentra representado en los *ESTs* del estadio intraeritrocitario solo el gen *plpb*. No obstante, el proyecto del *Wellcome trust Sanger institute* de secuenciación de los *ESTs* de *B. bovis* aún no ha sido finalizado por lo que la cobertura no es total (16%). Esto podría explicar la falta de representación en los *ESTs* de las otras perforinas.

Debido a que el cultivo de *B. bigemina* no está sincronizado y por lo tanto diferentes cultivos de la misma cepa podrían experimentar diferentes niveles de transcripción de los genes de acuerdo a la proporción de trofozoítos y formas pares dentro del eritrocito se analizaron los

niveles de transcripción de los genes *plp* en un cultivo expandido en otro momento. Los resultados indicaron la misma tendencia en cuanto a la transcripción diferencial de estos genes observándose un aumento en la transcripción de los genes *plpe* y *b*. Esto indicaría en principio que no hay diferencias en cuanto a la proporción de los estadios intraeritrocitarios sugiriendo que los genes *plpe* y *b* se transcriben en todos los estadios dentro del eritrocito lo cual destaca una función importante de las proteínas correspondientes cuando el parásito se encuentra dentro del eritrocito. Sin embargo el análisis transcripcional debería extenderse a otros cultivos de *B. bigemina* para demostrar la estabilidad de esta expresión diferencial en el estadio intraeritrocitario.

Por otra parte el análisis transcripcional confirmó la anotación de los genes *plpe*, *plpg* y *plph* de *B. bigemina* como genes individuales con un solo dominio MACPF presentando niveles de transcripción diferentes entre si con el transcripto *plpe* y *plph* más representados que el *plpg*.

Basados en la reconstrucción de la historia evolutiva de las proteínas de Piroplasmida y Haemosporida que comparten un ancestro en común y los resultados del análisis transcripcional las proteínas PLPB y PLPE podrían cumplir un rol importante en el egreso rápido del parásito de la vacuola parasitófora luego de la invasión o la posterior salida del parásito del eritrocito para infectar nuevos.

Adicionalmente, se observó la expresión de la proteína PLPA en el estadio intraeritrocitario de *B. bigemina* por medio de una Inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos de ratones inmunizado con la proteína recombinante producida durante este trabajo. Estos resultados sumados al reconocimiento de esta proteínas por parte de los sueros bovinos provenientes del área enzoótica para la babesiosis, a la presencia del péptido señal en su secuencia y a identificación de repeticiones en tándem variables en distintas cepas del parásito diferenciándose entre cepas atenuadas y patógenas según el patrón repetitivo, sugieren que esta proteína es exportada a la membrana del parásito para formar el poro a través del dominio MACPF donde el sistema inmunológico la reconocería. La presencia de repeticiones variables entre cepas podría estar derivando la respuesta inmune hacia una respuesta ineficaz T-independiente evitando la generación de una alta respuesta inmunológica contra el dominio conservado MACPF cuya función sería importante para la invasión del parásito a nuevos eritrocitos. Esto nos conduce a proponerlo como potencial antígeno aunque estudio posteriores serán requeridos para corroborarlo.

Si bien los mecanismos de formación del poro por proteínas con dominio MACPF han sido ampliamente descritos, el estudio de estas proteínas en Apicomplexa provee nuevos conceptos que definen nuevos roles en la interacción del parásito con su hospedador y con el

vector transmisor. Los rearrreglos inusuales de dominio en *B. bovis* y *T. annulata* podrían representar un nuevo giro estructural en la utilización del dominio MACPF. De esta manera, los resultados generados en este trabajo de tesis son un gran aporte para comprender estas nuevas funciones.

En este trabajo demostramos que la utilización de la información brindada por los genomas y las herramientas bioinformáticas permite realizar un estudio integral de nuevas proteínas. Estos estudios *in silico* incluyen la localización y el número de genes parálogos en el genoma, la estructura génica de cada uno en cuanto a número de intrones y exones, regiones intergénicas y secuencias señales de exportación al exterior o a alguna organela y la predicción de la región codificante. Por otro lado, el análisis de las secuencias aminoacídicas de estas proteínas aporta información acerca de presencia de dominios y su estructura secundaria y terciaria que aportan información válida para la predicción de la función de cada una de las proteínas. Con toda la información obtenida es posible realizar un análisis filogenético de las proteínas para comprender la historia evolutiva de las proteínas en estudio.

Durante la última década, la comprensión de la biología de los parásitos del Phylum Apicomplexa ha aumentado notablemente, particularmente en el caso del parásito causante de la malaria. Una gran parte de esa comprensión se debe a la disponibilidad del genoma completo, a los perfiles transcriptómicos y proteómicos y al establecimiento de nuevas técnicas de transfección *in vitro* de los estadios asexuales del parásito. A pesar de su importancia económica los parásitos transmisores de la babesiosis bovina, han sido relativamente ignorados. Este trabajo de tesis es un aporte para desentrañar los mecanismos moleculares que subyacen en la patogenia de la babesiosis y destacan algunas oportunidades y desafíos que quedan por delante.

Referencias bibliográficas

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, et al. (20 coauthors). (2004) Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* **304**: 441–445.

Aikawa M, Miller LH, Rabbege J, Epstein N. (1981) Freeze-fracture study of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J Cell Biol* **99**: 55-62.

Ajioka James W., Boothroyd John C., Brunk Brian P, et al. Sequences. (1998) Restricted to the Apicomplexa Gene Discovery by EST Sequencing in *Toxoplasma gondii* Reveals. *Genome Res.* **8**: 18-28

Almeria S., Castellà J., Ferrer D., Ortuño A., Estrada-Peña A., Gutiérrez J.F. (2001) Bovine piroplasm in Minorca (Balearic Island Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Ve Parasitol.* **99**:249-259.

Artículo I. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I. (2009) Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res*105(1):249-54

Babes, V. (1888) Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *C. R : acad. Sci.*, 107, 692,

Artículo II. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340(4)**:783-95.

Benson G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **Vol. 27**, No. 2, pp. 573-580.

Berzofsky, J. A., and I. J. Berkower. (1989) Immunogenicity and antigen structure. W. E. PAUL, ed. *Fundamental immunology*. Raven Press, New York. . Pp. 169–208

Boonchit S, Alhassan A, Chan B, Xuan X, Yokoyama N, Ooshiro M, Goff WL, Waghela SD, Wagner G, Igarashi I. (2006) Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* **137(1-2)**: 28-35

Bösse R., Jorgensen W.K., Dalglish R.J., Friedhoff K.T., de Vos A.J. (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* **57**: 61-74

Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. (2003) The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*; **1(1)**:E5.

Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JM, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith RK Jr, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles DP Jr, McElwain TF, Nene VM. (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotezoa. *PLoS Pathog*; **3(10)**:1401-13.

Brown, W. C. & Logan K. S. (1992) *Babesia bovis*: bovine helper T cell lines reactive with soluble and membrane antigens of merozoites. *Experimental Parasitology*; **74**, 188–199.

Brown, W. C., Logan, K. S., Wagner, G. G. & Tetzlaff, C. L.(1991) Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infection and Immunity*; **59**, 2418–2426.

Brown WC, McElwain TF, Hotzel I, Suarez CE, Palmer GH. (1998) Helper T-cell epitopes encoded by the *Babesia bigemina rap-1* gene family in the constant and variant domains are conserved among parasite strains. *Infect Immun* **66**:1561–9.

Brown WC, McElwain TF, Palmer GH, Chantler SE, Estes DM. (1999) Bovine CD4(+) T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infect Immun* **67(1)**:155-64.

Brown W. C., Norimine J, Goff W. L., Suarez C. E. & McElwain T. F. (2006) Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunology*. **28**, 315–327.

Brown WC, Palmer GH. (1999) Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today* **15**:275–81

Brown, W.C; Ruef, B.J; Norimine, J; Kegerreis, K.A; Suarez, C.E; Conley, P.G; Stich, R.W; Carson, K.H, Rice-Ficht A.C. (2001) A novel 20-kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B.bigemina* stimulates memory CD4+ T lymphocyte responses in *B.bovis*-immune cattle. *Mol Biochem Parasit.* **118** p.97-109.

Brown, W. C., Zhao, S., Woods, V.M., Dobbelaere, D. A. & Rice-Ficht, A. C. (1993) *Babesia bovis*-specific CD4+ T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. *Revue D'Elevage et De Medecine Veterinaire Des Pays Tropicaux*; **46**, 65–69.

Bru Catherine, Courcelle Emmanuel, Carrère Sébastien, Beausse Yoann, Dalmar Sandrine, and Kahn Daniel. (2005) The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. *Nucleic Acids Res.* **33**: D212-D215

Callow, L. L. (1984). Piroplasms. *In Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*, vol. 5. Animal Health in Australia, pp. 121–160. Canberra, Australian Bureau of Animal Health, AGPS.

Callow, L. L. (1977). Vaccination against bovine babesiosis. *In Immunity to Blood Parasites of Man and Animals* (ed. Miller, L. H., Pino, J. A. & McKelvey Jr., J. J.), pp. 121–149. New York, Plenum Press.

Callow, L. L., Dalglish, R. J. & de Vos, A. J. (1997) Development of effective living vaccines against bovine babesiosis – the longest field trial ?. *Int J Parasitol* **27** (7): 747–767.

Callow L.L., Macgavin M.D. (1963) Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. *Australian Veterinary Journal* **v.39**, p.15-21.

Callow, L. L., Rogers, R. J. & De Vos, A. J. (1993) Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. *In Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases* (ed. Corner, L. A. & Bagust, T. J.), pp. 1–16. East Melbourne, CSIRO Information Services

Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. (2009) trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*; **25**(15):1972-3

Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, Barrell BG, Parkhill J and Rajandream MA. (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* (Oxford, England) **23**:2672-6

Cesbron-Delauw MF. (1994) Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* **10(8)**: 293-6.

Chih-Horng Kuo, John P. Wares, and Jessica C. Kissinger. (2008) The Apicomplexan Whole-Genome Phylogeny: An Analysis of Incongruence among Gene Trees. *Mol Biol Evol.* **25(12)**: 2689-98.

Cole Christian, Barber Jonathan D. and Barton Geoffrey J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* **Vol. 36**, No. suppl_2 W197-W201

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*. *International Journal for Parasitology* **31**, 29–37.

Dalgliesh, R. J., Molloy, J. B., Jorgensen, W. K. & Bock, R. E. (1995). Do parasite antigens on erythrocytes determine host–parasite relationships in *Babesia* infections in cattle ? Lessons from Malaria. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Tick-borne Pathogens at the Host–vector Interface: A Global perspective* (ed. Coons, L. & Rothchild, M.). Berg-en-dal, South Africa, United Litho.

Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, Dimmock CM, Gale KR, Boese R, et al. (1993) Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol Biochem Parasitol* **57**:181–92.

Davies, D. R., and G. H. Cohen (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **93**:7–12.

Davies, D. R., S. Sheriff, and E. A. Padlan. (1988). Antibody antigen complexes. *J. Biol. Chem.* **263**:10541–10544.

Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat Rev Genet* **6**:361–375.

Depledge DP, Lower RP, Smith DF. (2007) RepSeq--a database of amino acid repeats present in lower eukaryotic pathogens. *BMC Bioinformatics* **8**:122.

De Vos, A.J.; Bock, R.E. (2002) Vaccination against bovine babesiosis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **916**: 540-545

De Vos, A. J. & Jorgensen, W. K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. *In Tick Vector Biology, Medical and Veterinary Aspects* (ed. Fivaz, B. H., Petney, T. N. & Horak, I. G.), pp. 159–174. London, Springer Verlag.

De Vos, A. J., Jorgensen, W. K. & Molloy, J. B. (2000). Bovine babesiosis. *In Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, Fourth Edition, pp. 412–422. Paris, Office International des Epizootic

De Vos, A. J. & Potgieter, F. T. (1994). Bovine babesiosis. *In Infectious Diseases of Livestock* (ed. Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R. & Tustin, R. C.), pp. 278–294. Capetown, Oxford University Press.

De Vries E, Corton C, Harris B, Cornelissen AW, Berriman M. (2006) Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* **138(1-2)**: 61-74.

Di Giovanni L, Cochrane AH, Enea V. (1990) On the evolutionary history of the circumsporozoite protein in plasmodia. *Exp Parasitol* **70(4)**:373-81.

Artículo III. Dowling SC, Perryman LE, Jasmer DP. (1996) A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infect Immun* **64(7)**:2618-26

Artículo IV. Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, Fourmaux MN. (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* **28(7)**:1007-13.

Dunnett, C. W. (1980) Pairwise multiple comparisons in the homogeneous variance, unequal sample size case. *J. Amer. Stat. Assn.* **75**: 789-795

Echaide I.E., de Echaide S.T. and Guglielmone.A.A. (1993) Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology* **511**; 235-40

Echaide IE, Hines SA, McElwain TF, Suarez CE, McGuire TC, Palmer GH. (1998) In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. *Infect Immun.* **66(6)**:2922-7.

Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC, Sinden RE. (2007) *Plasmodium berghei*: Plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Exp Parasitol* **116**:504-8.

Figueroa JV, Buening GM, Mishra V, McElwain TF. (1992) Screening of a *Babesia bigemina* cDNA library with monoclonal antibodies directed to surface antigens. *Ann N Y Acad Sci.* **653**:122-30.

Figueroa JV, Precigout E, Carcy B, Gorenflot A. (2004) Identification of a coronin-like protein in *Babesia* species. *Ann N Y Acad Sci*; **1026**:125-38.

Figueroa JV, Precigout E, Carcy B, Gorenflot A. (2006) Identification of common antigens in *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *B. divergens*. *Ann N Y Acad Sci.* **1081**:382-96.

Fisher TG, McElwain TF, Palmer GH. (2001) Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infect Immun.* **69(6)**:3782-90.

Fitzpatrick JE, Kennedy CC, McGeown MG, Oreopoulos DG, Robertson JH, Soyannwo MA. (1968) Human case of piroplasmiasis (babesiosis). *Nature.* **217(5131)**:861-2.

Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. (2002) A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* **419**:520-6

Fankhauser N, Nguyen-Ha TM, Adler J, Mäser P. (2007) Surface antigens and potential virulence factors from parasites detected by comparative genomics of perfect amino acid repeats. *Proteome Sci* **5**:20.

Franssen FF, Gaffar FR, Yatsuda AP, de Vries E. (2003) Characterisation of erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites efficiently released from their host cell after high-voltage pulsing. *Microbes Infect* (**5**):365-72.

Friedhoff, K. T. (1988) Transmission of *Babesia*. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.), pp. 23–52. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.

Gaffar, F.R., Franssen, F.F., 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. *Int J Parasitol.* **33(14)**:1595-603.

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) A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **136**: 25–34.

Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, et al. (2008) ToxoDB: An integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Res* **36**:553-6.

Galinski MR, Arnot DE, Cochrane AH, Barnwell JW, Nussenzweig RS, Enea V.(1987) The circumsporozoite gene of the *Plasmodium cynomolgi* complex. *Cell* **48(2)**:311-9.

Gardner MJ, Bishop R, Shah T, et al. (44 co-authors). (2005) Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* **309**:134–137

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498–511.

Geibler S, Sokolowska-Köhler W, Bollmann R., Jungblut P.R, Presber W. (1999) *Toxoplasma gondii* infection: analysis of serological response by 2-DE immunoblotting *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **25**:299-311

Artículo V. Gelhaus C, Fritsch J, Krause E, Leippe M. (2005) Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics* **5(16)**:4213-22

Getzoff, E. D., J. A. Tainer, R. A. Lerner, and H. M. Geysen (1988) The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv. Immunol.* **43**:1–98.

Artículo VI. Giavalisco P, Nordhoff E, Kreitler T, Klöppel KD, Lehrach H, Klose J, Gobom J. (2005) Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **5(7)**:1902-13

Goff WL, Davis WC, Palmer GH, McElwain TF, Johnson WC, Bailey JF, McGuire TC. (1988) Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect Immun* **56(9)**:2363-8.

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-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunology* **23**, 463–471.

Goff, W.L., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Davis, W.C. and McGuire, T.C. (1989) Development of ELISA diagnostic tests for *Babesia* infection using highly immunogenic, species-specific and strain common surface glycoproteins. In: R.J. Hidalgo (Editor), *Proc. of 8th National Veterinary Haemoparasite*.

Goff, W. L., Wagner, G. G. & Craig, T.M. (1984) Increased activity of bovine ADCC effector cells during acute *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology* **16**, 5–15.

Goff, W. L., Wagner, G. G., Craig, T.M. & Long, R. F. (1982) The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection: serological studies of isolated immunoglobulins. *Veterinary Parasitology* **11**, 109–120

Gohil S, Kats LM, Sturm A, Cooke BM. (2010) Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin' forward. *Trends Parasitol*; **26(12)**:591-9.

Gomez C. E, Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA (2010) Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol.*; **72**: 60-45

Goodger, B. V., Wright, I. G. & Mahoney, D. F. (1981) Initial characterization of cryoprecipitates in cattle recovering from acute *Babesia bovis* (Argentina) infection. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **59**, 521–529

Goodger, B. V., Wright, I. G. & Waltisbuhl, D. J. (1985) *Babesia bovis*: the effect of acute inflammation and isoantibody production in the detection of babesial antigens. *Experientia* **41** 1577–1579

Gray, J. S., Langley, R. J., Brophy, P. O. & Gannon, P. (1989) Vaccination against bovine babesiosis with drug-controlled live parasites [published erratum appears in *Veterinary Record* 23–30; **125(26–27)**: 646]. *Veterinary Record* **125**, 369–372.

Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F. (1999) Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *J Clin Microbiol* **37(6)**:1782-9.

Guerrero FD, Bendele KG, Davey RB, George JE. (2007) Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in south Texas. *Vet Parasitol* **145(1-2)**:156-63.

Guglielmone, A.A; Echaide, S.T; Mangold, A.J; Echaide, I.E; Abdala, A.A; Anziani, O.S; Aguirre, D.H; Montenegro- James, S; Patarroyo, J; Alonso, M; Camus, E; Cordoves, C; Kessler, R.H; Martins, J.R; Nari, A; Solari M.A; Toro, M; Vega y Murguía, C; Arellano-Sota, C. (1997)

Production of referente sera against *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* and negatives sera. (Santiago de Chile) *Ser. Gan.* (52) 17pp

Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5):696-704.

Hadders, M.A., Beringer, D.X., Gros, P. (2007) Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science* 317: 1552-1554

Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M, et al. (2005) A comprehensive survey of the plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic and proteomic analyses. *Science* 307:82-6.

Hall Tomm. (1997- 2005) BioEdit (Biological sequence alignment editor). copyright © Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA 92008

Halos L., Jamal T., Vial L., Maillard R., Suau A., Le Menach A., Boulouis H.J., Vayssier-Taussat M. (2004) Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res* 35: 709–713

Higuchi, R. (1989) Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications* 2: 1–3.

Hiller, K.; Grote, A.; Maneck, M.; Münch, R.; Jahn, D. (2006) JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics*, , 22: 2441-2443.

Hines, S.A., McElwain, T.F., Buening, G.M. and Palmer, G.H.. (1989) Molecular characterisation of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 37: 1- 10.

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

- Hodgson, J.L; Stiller, D.; Jasmer, D.P; Buening, G.M; Wagner, G.G and McGuire, T.C. (1992) *Babesia bigemina*: quantitation of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using a DNA probe. *Exp Parasitol* **74**: 117-126.
- Hötzel I, Suarez CE, McElwain TF, Palmer GH. (1997) Genetic variation in the dimorphic regions of RAP-1 genes and *rap-1* loci of *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol* **90(2)**:479-89.
- Howell, S.A., Well, I., Fleck, S.L., Kettleborough, C., Collins, C.R., Blackman, M.J. (2003) A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *J Biol Chem* **278**: 23890–23898.
- Hoyte, H.M. (1961) Initial development of infectious *Babesia bigemina*. *Australian Veterinary Journal* **8**, 462–466.
- Igarashi, I., Aikawa, M., Kreier, J. (1988) Host cell–parasite interactions in babesiosis. In Ristic, M. _Ed., *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 54–65.
- Ishino T, Chinzei Y, Yuda M. (2005) A plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol* **7**:199-208.
- Jacobson, R. H., Parrodi, F., Wright, I. G., Fitzgerald, C. J. & Dobson, C. (1993) *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens. *Parasitol Res* **79**: 221–226.
- Jaroszewski L, Rychlewski L, Li Z, Li W, Godzik A. (2005) FFAS03: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue):W284-8.
- Jasmer DP, Reduker DW, Hines SA, Perryman LE, McGuire TC. 1992 Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol Biochem Parasitol*. 55(1-2):75-83
- Johnson, W. C., Cluff, C.W., Goff, W. L. & Wyatt, C. R. (1996) Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesiacidal *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* **791**, 136–147

- Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M. (2004) Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:16310-5.
- Kafsack BF and Carruthers VB. (2010) Apicomplexan perforin-like proteins. *Commun Integr Biol* **3(1)**:18-23.
- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **323(5913)**:530-3
- Kaiser K, Camargo N, Coppens I, Morrissey JM, Vaidya AB, Kappe SH. (2004) A member of a conserved *Plasmodium* protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **133(1)**:15-26.
- Kania, S.A., Allred, D.R., Barbet, A.F., (1995) *Babesia bigemina*: host factors affecting the invasion of erythrocytes. *Exp. Parasitol.* **80**:76–84.
- Keane T. M, Creevey C. J, Pentony M. M, Naughton T. J and McInerney J. O. (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified, *BMC Evolutionary Biology*, **6**:29
- Kelley LA and Sternberg MJE. (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**:363 - 371
- Kessler, R.H. et al. (1983) Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babés 1888 Starcovici 1893) em bezerros no Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **v.18**, p.931-935.
- Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, Smolarczyk K, Dudek MR, Cebrat S. (2007) The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms *BMC Genomics* **8**:163
- Klade, C.S. (2002) Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4**: 216–223

Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (Lond.); **227**:680-685.

Langsley G, van Noort V, Carret C, Meissner M, de Villiers EP, Bishop R, Pain A. (2008) Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. *Microbes Infect* **10**(5):462-70.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England), **23** (21) :2947-8.

Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, et al. (2002) Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature* **419**:537-42.

Artículo VII. Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ, Winzeler EA (2003) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. **301**(5639):1503-8.

Artículo VIII. Letunic I, Doerks T, Bork P. (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* D229-32

Levine ND. (1988) Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J Eukaryot Microbiol* **35**: 518–520.

Artículo IX. Li JD, Carroll J, Ellar DJ. (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**(6347):815-21.

Liu CC, Walsh CM, Young JD. (1995) Perforin: structure and function. *Immunol Today* **16**:194–201.

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

Mahoney, D. F. (1972) Immune responses to hemoprotozoa II. *Babesia* spp. In *Immunity to Animal Parasites* (ed. Soulsby, E. J. L.), pp. 301–341. New York, Academic Press.

Mahoney, D. F. (1986) Studies on the protection of cattle against *Babesia bovis* infection. In *The Ruminant Immune System in Health and Disease* (ed. Morrison, W. I.), pp. 539–544. Cambridge, Cambridge University Press.

Mahoney, D. F., Kerr, J. D., Goodger, B. V. & Wright, I. G. (1979) The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. *International Journal for Parasitology* **9**:297–306.

McCosker, P. J (1981). The global importance of babesiosis. In Babesiosis (ed. Ristic, M. & Kreier, J.P. *New York, Academic Press.*, pp.1-24

McElwain, T.F., Palmer, G.H., Goff, W.L. and McGuire, T.C. (1988) Identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoite proteins with isolate- and species-common epitopes recognised by antibodies in bovine immune sera. *Infect. Immun.* **56**:1658-1660

McElwain, T. F., L. E. Perryman, A. J. Musoke, and T. C. McGuire. (1991) Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol.* **47**:213–222.

McElwain, T. F., L. E. Perryman, W. C. Davis, and T. C. McGuire. (1987) Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J Immunol* **138**: 2298–2304.

McGuire, T. C., Musoke, A. J. & Kurtti, T. (1979) Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* **38**: 249–256

Medjahed, D.; Smythers, G.W.; Powell, D.A.; Stephens, R.M.; Lemkin, P.F. & Munroe, D.J. (2003) VIRTUAL2D: A web-accessible predictive database for proteomics analysis. *Proteomics* **3**:129-38

Mehlhorn, H. & Shein, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology* **23**, 37–103.

Mian, S., A. R. Bradwell, and A. J. Olson (1991). Structure,function and properties of antibody binding sites. *J. Mol.Biol.* 217:133–151

Mishra, V. S., T. F. McElwain, J. B. Dame, and E. B. Stephens. (1992) Isolation, sequence, and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol* **53**:149–158.

Mishra, V. S., E. B. Stephens, J. B. Dame, L. E. Perryman, T. C. McGuire, and T. F. McElwain. (1991) Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p58: a neutralization-sensitive, antigenically conserved *Babesia bigemina* merozoite surface protein. *Mol Biochem Parasitol* **47**: 207–212.

Montenegro-James S, James MA, Ristic M. (1983) Localization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens in the infected erythrocyte. *Vet Parasitol.***13(4)**:311-6.

Montoya JG, Liesenfeld O. (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* **363**:1965–1976.

Morgan BP. (1999) Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol* **19**:173–98.

Mosqueda J, Falcon A, Antonio Alvarez J, Alberto Ramos J, Oropeza-Hernandez LF, Figueroa JV. (2004) *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *Int J Parasitol* **34(11)**:1229

Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH. (2002) *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(3)**:1599-603.

Mosqueda J, Ramos JA, Falcon A, Alvarez JA, Aragon V, Figueroa JV. (2004) *Babesia bigemina*: sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. *Ann N Y Acad Sci* **1026**:222-31

Newman A. M and Cooper J. B. (2007) XSTREAM: A practical algorithm for identification and architecture modeling of tandem repeats in protein sequences. *BMC Bioinformatics*, **8**:382

Noël CJ, Diaz N, Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, Tang P, Fiori PL, Hirt RP. (2010) *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* **11**: 99.

Núñez J. L., Muñoz Cobeñas, M. E., Moltedo H. L. (1987) *Boophilus microplus* La garrapata común del ganado vacuno. *Editorial hemisferios Sur*.

Nussenzweig V, Nussenzweig RS. (1989) Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. *Adv Immunol.* **45**: 283-334.

Oliveira-Sequeira TC, Oliveira MC, Araujo JP Jr, Amarante AF. (2005) PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol* **35(1)**:105-11.

Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoué F, Villard C, Cornélie S, Penhoat K, Pascual A, Bourgoignie C, Fontenille D, Bonnet J, Corre-Catelin N, Reiter P, Pagés F, Laffite D, Boulanger D, Simondon F, Pradines B, Fusaï T, Rogier C. (2007) Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect.* **9(12-13)**:1454-62

Pain A, Renauld H, Berriman M, et al. (50 co-authors). (2005) Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* **309**:131–133.

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. and McGuire, T.C., 1991) (Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect. Immun.*, 59: 3340-3342.

Passos L.M.F, Bell-Sakyi L., Brown C.G.D. (1998) Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*,**76**: 239–249

Patarroyo JH, Vargas MI, Bicudo PL. (1982) Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. *Vet Parasitol* **11**:301-308.

Peitsch MC, Amiguet P, Guy R, Brunner J, Maizel JV Jr, Tschopp J. (1990) Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol* **27(7)**:589-602

Pfaffl,M.W. (2004) Quantification Strategies in Real-Time PCR. *In: A-Z of Quantitative PCR S.A.Bustin, editor. International University Line.La Jolla*, p. 87-120.

Petrich R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R, Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I, de Echaide ST, Farber M. (2008) Improved molecular tools for detection of *Babesia bigemina*. *Ann N Y Acad Sci* **1149**:155-7.

Philippe H, Delsuc F, Brinkmann H, Lartillot N. (2005) Phylogenomics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **36**:541–562.

Pipkin ME, Lieberman J. (2007) Delivering the kiss of death: Progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* **19**:301-8.

Artículo X. Polekhina G, Giddings KS, Tweten RK, Parker MW. (2005) Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102(3)**:600-5.

Ponting CP. (1999) Chlamydial homologues of the MACPF (MAC/perforin) domain. *Curr Biol* **9(24)**:R911-3

Posada D and Crandall KA. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14 (9)**: 817-818.

Potgieter, F. T. (1977) The life cycle of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in ticks and in cattle in South Africa. *PhD thesis*, Rand Afrikaans University.

Potgieter, F. T., and H. J. Els. (1979) An electron microscopic study of intraerythrocytic stages of *Babesia bovis* in the brain capillaries of infected splenectomized calves. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **46**:41–49

Potgieter, F. T. & Els, H. J. (1976) Light and electron microscopic observations on the development of small merozoites of *Babesia bovis* in *Boophilus microplus* larvae. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **43**, 123–128

- Potgieter, F. T. & Els, H. J. (1977) Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **44**, 213–231.
- Preiser P, Kaviratne M, Khan S, Bannister L, Jarra W. (2000) The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* **2(12)**:1461-77.
- Raibaud A, Brahimi K, Roth CW, Brey PT, Faust DM. (2006) Differential gene expression in the ookinete stage of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* **150**:107-13.
- Ray BK, Bailey CW, Jensen JB, Carson CA (1992) Chromosomes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol* **52**: 123–126.
- Riberiro M. F. B. and Patarroyo J. H. S. (1998) Ultrastructure of *Babesia bigemina* gametes obtained in “in vitro” erythrocyte cultures. *Vet Parasitol.* **76(1-2)**:19-25
- Riek, R. F. (1963) Immunity to babesiosis. In *Immunity to Protozoa* (ed. Garnham, P. C. C., Pierce, A. E. & Roitt, I.), pp. 160–179. Oxford, Blackwell.
- Riek, R. F. (1966) The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research* **17**, 247–254.
- Ristic M. (1988) Babesiosis of domestic Animal and Man. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. International Standard Book Lumber 0-8493-4908-7, Library Congress Card Number 87-242556. Printed in United States)
- Rodriguez, S. D., Palmer G. H, McElwain T. F., McGuire T. C., Ruef B. J., Chitko-McKown C. G., and Brown W. C. (1996) CD4+ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein I. *Infect Immun* **64(6)**: 2079-87.
- Rokas A. (2006) Genomics and the tree of life. *Science* **313**:1897–1899.

Rosado CJ, Buckle AM, Law RH, Butcher RE, Kan WT, Bird CH, Ung K, Browne KA, Baran K, Bashtannyk-Puhlovich TA, Faux NG, Wong W, Porter CJ, Pike RN, Ellisdon AM, Pearce MC, Bottomley SP, Emsley J, Smith AI, Rossjohn J, Hartland EL, Voskoboinik I, Trapani JA, Bird PI, Dunstone MA, Whisstock JC. (2007) A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* **317(5844)**:1548-51.

Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, et al (2008) The MACPF/CDC family of pore forming toxins. *Cell Microbiol* **9**:1765-74.

Rudzinska MA, Trager W, Lewengrub SJ, Gubert E. (1976) An electron microscopic study of *Babesia microti* invading erythrocytes. *Cell Tissue Res* **169(3)**:323-34

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**, 1–12.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA and Barrell B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England) **10**: 944-5

Saffer LD, Mercereau-Puijalon O, Dubremetz JF, Schwartzman JD. (1992) Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool* **39(4)**:526-30.

Schnittger L, Yin H, Qi B, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS. (2004) Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting *Parasitol. Res.* **92**: 189–196

Schnupf P, Portnoy DA. (2007) Listeriolysin O: A phagosome-specific lysin. *Microbes Infect.* **9**:1176-87.

Schofield L. (1991) On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today* **7(5)**:99-105.

Schultz Jörg, Milpetz Frank, Bork Peer, and Ponting Chris P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS* **vol. 95** no. 11 5857-5864

Schwartz R, Ting CS, King J (2001) Whole Proteome pI Values Correlate with Subcellular Localizations of Proteins for Organisms within the Three Domains of Life. *Genome Res*, **11**:703-709.

Artículo XI. Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK. (1999) The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* **99**(3):293-9.

Shaw MK, Tilney LG. (1995) The entry of *Theileria parva* merozoites into bovine erythrocytes occurs by a process similar to sporozoite invasion of lymphocytes. *Parasitology* **111** (Pt 4):455-61.

Shin YS, Shin GW, Kim YR, Lee EY, Yang HH, Palaksha KJ, Youn HJ, Kim JH, Kim DY, Marsh AE, Lakritz J, Jung TS. (2005) Comparison of proteome and antigenic proteome between two *Neospora caninum* isolates. *Vet Parasitol* **134**(1-2):41-52

Shmatkov AM, Melikyan AA, Chernousko FL, Borodovsky M.(1999) Glimmer Hm: Finding prokaryotic genes by the 'frame-by-frame' algorithm: targeting gene starts and overlapping genes. *Bioinformatics* **15**(11):874-86.

Shompole S, McElwain TF, Jasmer DP., Hines SA., Katende J., Musoke AJ, Rurangirwa FR., and McGuire TC. 1993. Identification of infected erythrocyte surface antigens with epitopes conserved among geographic strains of *Babesia bigemina*. *Parasite Immunol.* (Oxford) **16**:119–127.

containing epitopes conserved among strains. *Parasite Immunol* **16**(3):119-27.

Shompole S, Perryman LE, Rurangirwa FR, McElwain TF, Jasmer DP, Musoke AJ, Wells CW, McGuire TC. (1995) Monoclonal antibody to a conserved epitope on proteins encoded by *Babesia bigemina* and present on the surface of intact infected erythrocytes. *Infect Immun.* **63**(9):3507-13.

Smith, T. And Kilborne, F. L. (1893) Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever, *Bull. Bur. Anim. Ind. US. Dep. Agric.*, 1, 1.

Späth EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. (1994) Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Terios* **23**:116-119.

Stich, R.W., Shoda, L. K., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T.W. & Brown, W. C. (1998) Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infection and Immunity* **66**, 4130–4136.

Suarez CE, Palmer GH, Florin-Christensen M, Hines SA, Hötzel I, McElwain TF. (2003) Organization, transcription, and expression of rhostry associated protein genes in the *Babesia bigemina rap-1* locus. *Mo. Biochem Parasitol* **127**: 101–112.

Suarez CE, Palmer GH, Jasmer DP, Hines SA, Perryman LE, McElwain TF. (1991) Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol Biochem Parasitol*, **46(1)**:45-52

Subramanian AR, Kaufmann M, Morgenstern B. (2008) DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment.. *Algorithms Mol Biol.* **27**:3:6.

Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., Menard, R. (1997) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell* **90**: 511–522.

Sumathi K, Ananthalakshmi P., Roshan M.N.A.Md. and Sekar K. (2006) 3DSS:3-Dimensional Structural Superposition. *Nucl Acids Res* **34**: W128-W134

Taylor Lacey D., Nelson David E., Dorward David W., Whitmire William M. and Caldwell Harlan D. (2010) Biological Characterization of *Chlamydia trachomatis* Plasticity Zone MACPF Domain Family Protein CT153. *Inf and Imm* **Vol. 78, No. 6** p. 2691–2699

Tebele N, Skilton RA, Katende J, Wells CW, Nene V, McElwain T, Morzaria SP, Musoke AJ. (2000) Cloning, characterization, and expression of a 200-kilodalton diagnostic antigen of *Babesia bigemina*. *J Clin Microbiol* **38(6)**:2240-7.

Tilley SJ, Saibil HR. (2006) The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol* **16(2)**:230-6.

Trueman, K. F. & Blight, G.W. (1978) The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Australian Veterinary Journal*, **54**: 301–305.

Artículo XII. Trybala, E., Svennerholm, B., Bergstrom, T., Olofsson, S., Jeansson, S., Goodman, J.L. (1993) *Herpes simplex* virus type 1-induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate. *J. Virol.* **67**: 1278–1285.

Tukey, J. (1953) The Problem of Multiple Comparisons. *Unpublished manuscript. Princeton University.*

Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson C.A. (1985) *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* **46(2)**:416-20.

Vichido R, Falcon A, Ramos JA, Alvarez A, Figueroa JV, Norimine J, Brown WC, Castro LA, Mosqueda J. (2008) Expression analysis of heat shock protein 20 and rhoptry-associated protein 1a in sexual stages and kinetes of *Babesia bigemina*. *Ann N Y Acad Sci* **1149**: 136-40

Waller R. F. and McFadden G. I. 2005 The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid of Apicomplexan Parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* **7**: 57-80.

Weiland, G. and Reiter, I., (1988) Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: M. Ristic (Editor), *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 143-162.

Wilkowsky SE, Farber M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Zamorano PI, Dominguez M, Suarez CE, Florin-Christensen M. (2003) *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol Biochem Parasitol* **127(2)**:133-41

Artículo XIII. Wilkowsky SE, Moretta R, Mosqueda J, Gil G, Echaide I, Lía V, Falcón A, Florin Christensen M, Farber M. (2009) A new set of molecular markers for the genotyping of *Babesia bovis* isolates. *Vet Parasitol* **161(1-2)**: 9-18

Wright, I.G. (1990) Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, **9**: 345-356.

Wright, I. G. & Goodger, B. V. (1988) Pathogenesis of babesiosis. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.), pp. 99–118. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.

Xiao, L., Yang, C., Patterson, P.S., Udhayakumar, V., Lal, A.A.. (1996) Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect. Immun.* **64**: 1373–1378.

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(10)**:5822-6

Zintl, A., Westbrook, C., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Gray, J.S. (2002) Invasion, and short- and long-term survival of *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa) cultures in non-bovine sera and erythrocytes. *Parasitology* **124**:583–588.

Zlotnic, L. (1953) Cerebral piroplasmiasis in cattle. *Veterinary Record* **40**: 642-643.

Sitios de Internet utilizados

Base de ESTs de *B. bovis*: http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bovis/

ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

DIALING: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>

Eupath DB: <http://eupathdb.org/eupathdb/>

ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/>

FFAS03: <http://ffas.ljcrf.edu/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>

fgenesh: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>

Genoma de *B. bigemina*: http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/

IDT DNA: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Jpred 3: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>

Modelgenerator: <http://bioinf.may.ie/software/modelgenerat>NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PHYRE: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>

Prodom: <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>

Signal P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de/>

Tandem repeat finder: <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>

TITO: http://bioserv.cbs.cnrs.fr/HTML_BIO/frame_tito.html

TrimAl <http://trimal.cgenomics.org> disponible para descargar y puede ser usado en línea en el servidor Phylemon (<http://phylemon2.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/trimAl.cgi>)

XSTREAM <http://jimcooperlab.mcdb.ucsb.edu/xstream/>

JVirGel: <http://www.jvirgel.de/>