



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Predicción integral de epitopes T del parásito intracelular *Babesia bovis*  
mediante herramientas inmunoinformáticas e inmunoproteómicas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área Ciencias Biológicas

Lic. Magali Nicole Valenzano

Director de tesis: Dra. Silvina Wilkowsky

Consejero de estudios: Dr. Guillermo Alonso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hemoparásitos, Instituto de Agrobiotecnología y Biología  
Molecular (IABIMO), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA - CONICET).

Buenos Aires, 2023

## **Predicción integral de epitopes T del parásito intracelular *Babesia bovis* mediante herramientas inmunoinformáticas e inmunoproteómicas**

La Babesiosis bovina es una infección causada por los parásitos protozoarios *Babesia bovis* y *B. bigemina*. Ambas especies son transmitidas por garrapatas que habitan en el NOA y NEA y ocasionan importantes pérdidas económicas al sector ganadero. La infección por *Babesia* sp. puede controlarse a través de la vacunación con cepas atenuadas. Sin embargo, estas vacunas poseen una serie de desventajas en su producción y uso. Como el parásito desarrolla su ciclo vital estrictamente dentro de los eritrocitos, las células presentadoras de antígeno como los macrófagos del bazo fagocitan los eritrocitos parasitados, por lo que sus péptidos son presentados principalmente por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II bovino (codificado principalmente por el gen BoLA-DRB3). Por estas razones, la identificación racional de epitopes B y de epitopes T presentados por las células del hospedador bovino resulta fundamental para su inclusión futura en vacunas de diseño racional como alternativas superadoras a la vacuna viva atenuada. Con este objetivo, en esta tesis se realizó la identificación de epitopes T de *B. bovis* mediante herramientas bioinformáticas y proteómicas. En primer lugar, se realizó una caracterización genética de la diversidad del gen BoLA-DRB3 en las razas bovinas más utilizadas en el norte argentino. Utilizando esta información y la proveniente de la secuenciación del genoma de una cepa virulenta argentina de *B. bovis*, se realizaron predicciones bioinformáticas de epitopes T con su posterior validación experimental, identificando así 7 péptidos T provenientes de 6 proteínas del parásito. Además, ideamos y pusimos a punto un modelo de interacción parásito-célula hospedadora bovina para la identificación de péptidos T de *B. bovis*, que permitió la identificación de 28 péptidos consenso novedosos por una estrategia de inmunopeptidómica. En resumen, este trabajo aportó primer reporte de diversidad del gen BoLA-DRB3 en razas puras y mixtas cebuinas en Argentina, lo cual contribuye no sólo a los esfuerzos continuos de categorizar las frecuencias alélicas del complejo mayor de histocompatibilidad por raza y localidad, sino también al diseño de vacunas a base de péptidos. Además, aportó el diseño novedoso de un flujo de trabajo para realizar predicciones de epitopes T para esta especie. Por último, en este trabajo se desarrolló un modelo experimental original para identificar con éxito péptidos T presentados naturalmente por el bovino.

**Palabras clave:** *Babesia bovis*, vacunas, epitopes T, inmunoinformática, inmunoproteómica.

## Integral prediction of T cell epitopes of the intracellular parasite *Babesia bovis* using immunoinformatic and immunoproteomic strategies

### Abstract

Bovine Babesiosis is an infection caused by the protozoan parasites *Babesia bovis* and *B. bigemina*. Both species are transmitted by ticks that inhabit the Argentine northeast and northwest, and they cause important economic losses to the livestock sector. Infection by *Babesia* sp. can be controlled through vaccination with attenuated strains. However, these vaccines have several disadvantages in their production and use. As the parasite develops its life cycle strictly within erythrocytes, antigen presenting cells such as spleen macrophages phagocytose parasitized erythrocytes, so their peptides are presented mainly by bovine class II major histocompatibility complex molecules (encoded mainly by the BoLA-*DRB3* gene). For these reasons, the rational identification of B-cell epitopes and T- cell epitopes presented by bovine host cells is essential for their future inclusion in rationally designed vaccines as superior alternatives to the live attenuated vaccine. With this objective, in this thesis the identification of *B. bovis* T epitopes were carried out using bioinformatics and proteomic tools. First, a genetic characterization of the diversity of the BoLA-*DRB3* gene was carried out in the most widely used bovine breeds in northern Argentina. Using this information and the information obtained from the sequencing of the genome of a virulent argentinian strain of *B. bovis*, bioinformatic predictions of T epitopes were made with their subsequent experimental validation, thus identifying 7 T- cell peptides from 6 parasite proteins. In addition, we designed and developed a bovine host-cell parasite interaction model for the identification of *B. bovis* T-peptides, which aided in the identification of 28 novel consensus peptides by an immunopeptidomics strategy. In summary, this work provided the first report on the diversity of the BoLA-*DRB3* gene in purebred and mixed Zebu breeds in Argentina, which contributes not only to the ongoing efforts to categorize the allele frequencies of the major histocompatibility complex by breed and locality, but also to the design of peptide-based vaccines. In addition, this work provided the novel design of a workflow to perform T epitope predictions for this species. Finally, we presented an original experimental model to successfully identify the T peptides naturally presented by the bovines.

**Keywords:** *Babesia bovis*, vaccines, T cell epitopes, immunoinformatics, immunoproteomics.

## Agradecimientos

Los que me conocen saben que esta es la parte más difícil de escribir para mí, porque soy muy mala poniendo emociones en palabras. Y sobre todo porque creo que es la parte más importante de la tesis, porque sin todos ustedes esto sería un sueño imposible de haber logrado.

Quiero agradecer a INTA, a CONICET, a la ANPCyT y a la UBA por darme la posibilidad de formarme como profesional.

A Silvina, mi directora, no tengo palabras para agradecerte. Las veces que las cosas salían mal, como la gran descongelada del freezer de -80°C, me impulsaste a arrancar de nuevo, aunque implique sentarse al lado mio a planificar todo. Las veces que las cosas salían bien, felicitándome y haciéndome sentir que podía hacer cualquier técnica nueva. Siempre que necesité algo preguntaba “¿Sil, podes reunirse ahora?” y la respuesta era siempre un sí. Y ni hablar del increíble viaje a Oxford que compartimos con los paseos (y la gripe). Gracias por la paciencia y la confianza.

A Marisa, que me abrió las puertas del laboratorio y se preocupó por mí siempre, no sólo por el trabajo, sino también por lo personal. Gracias por todo el aguante.

¡A mis queridos hemos! ¿¿Que hubiera hecho sin ustedes?? Con ustedes aprendí lo genial que es el trabajo en equipo, ayudarse y acompañarse. Marti cortándome la frutillita antiestrés, los abrazos de Agus, Vale siempre dispuesta a ayudarme en todo, Eli un gran apoyo emocional, Sofi siempre presente, Pepe, aunque solo compartimos unos meses en el laboratorio, siempre ayudándome con sus audios de 10 minutos. Las risas, las charlas interminaaables de todos los días, Cristian Castro de los viernes, las juntadas que, aunque son cada tanto, siempre la pasamos tan bien, ¡¡los quiero tanto!!

A la gente del campo experimental, especialmente a Diego Franco y Vero Maldonado, siempre dispuestos a dar una mano. A Diego en particular, que compartimos mil mañanas en el campo, gracias por estar siempre, aunque sea domingo 8 am. Y perdón por siempre comerme la mitad de los bizcochitos antes de que lleguen a tus manos jaja.

A la Lic. Beatriz Valentini, que me envió todos los cultivos de *Babesia* desde Rafaela y se ocupó de que en lo posible llegaran a tiempo. A Nicola, Robert y Annalisa que me recibieron tan cálidamente en Oxford y me enseñaron todo con mucha paciencia. Al Dr. Morten Nielsen por todo el entrenamiento brindado.

A toda la gente del IABIMO, que aportaron cada uno desde su lugar a este trabajo de tesis, dado que en algún momento me ayudaron de una u otra manera, ya sea facilitándome un reactivo, enseñándome alguna técnica o brindándome algún consejo. En este momento se me ocurren Yami siempre dispuesta a ayudarme con los ELISAs, Majo con su infinita paciencia y apoyo en la citometría, Mica, Nati y Andre, pero sé que fueron muchos más. Mil gracias a todos.

A mi familia, que siempre confiaron en mí. A mis abuelos que se lo felices que estarían. A mi mama, que siempre me pregunta e intenta entender lo que le cuento de la tesis, aunque cueste. A Domi, que alegra todos mis días, sos lo mejor. A mis perrhijos, que se pasaron horas pegaditos mientras escribía.

A Nico, mi compañero de vida, que me bancó cada vez que volvía triste porque no me salió un experimento bien, aunque al final sí haya salido bien y sólo sea drama. Que me cebó mates y musicalizó las horas que pasé escribiendo. Que me banca siempre en todas.

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas".

Marie Curie

## TABLA DE CONTENIDOS

---

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1-La babesiosis .....	11
2- La babesiosis bovina.....	12
3- Etiología: <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina</i> .....	13
4- Proceso de invasión y egreso .....	14
5-Ciclo biológico .....	16
6-Genoma.....	18
7- Vector transmisor .....	19
8- Prevalencia e importancia económica .....	22
8.1 Razas bovinas utilizadas para la producción ganadera en la zona enzoótica de la enfermedad.....	26
9- Signos clínicos .....	27
10-Patogenia y lesiones.....	29
11- Diagnóstico.....	29
12- Tratamiento .....	31
13-Inmunología .....	32
13.1 Respuesta inmune innata.....	32
13.2 Respuesta inmune adaptativa.....	32
14-Vacunación.....	34
15-Búsqueda de nuevos candidatos vacunales .....	37
15.1- Predicción de epitopes.....	38
16-Complejo mayor de histocompatibilidad.....	39
16.1- Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA) .....	40
17- El estudio del inmunopeptidoma de <i>Babesia bovis</i> asociado al BoLAII .....	42
17.1- Inmunoinformática .....	43
17.2 Inmunopeptidómica .....	46
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
Objetivo general.....	50

Objetivos específicos.....	50
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1- Bovinos.....	51
2- Electroforesis en geles de agarosa.....	51
3- Tipificación de <i>BoLA-DRB3.2</i> .....	51
3.1 Extracción de ADN genómico bovino.....	51
3.2 Reacciones de PCR .....	51
3.3 Secuenciación capilar .....	52
3.4 Análisis de secuencias y determinación de haplotipos .....	52
4- Cultivos de <i>B. bovis</i> cepa S2P .....	53
5- Cultivo de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos.....	53
6- Ensayos de fagocitosis.....	54
7-Obtención de lisados de merozoítos de <i>Babesia bovis</i> .....	56
8- Infección de bovinos con <i>Babesia bovis</i> .....	56
8.1 Reacciones de PCR .....	56
8.2 Determinación del hematocrito.....	57
8.3 Infecciones con <i>Babesia bovis</i> .....	57
9- Medición de variabilidad genética.....	58
9.1 Alineamientos de secuencias .....	58
9.2 Variabilidad genotípica.....	58
9.3 Mediciones de coeficientes de endogamia.....	58
9.4 Variabilidad nucleotídica.....	58
9.5 Evaluación de desviaciones de la neutralidad.....	58
9.6 Cálculos de tasas de sustitución de bases.....	58
9.7 Análisis de distribución de alelos .....	59
9.8 Análisis funcional del PBR .....	59
9.9 Análisis AMOVA.....	60
9.10 Medidas de diferenciación entre razas .....	60
10- Secuenciación, ensamblado y anotación del genoma de <i>Babesia bovis</i> .....	61
10.1 Extracción y purificación de ADN genómico de <i>Babesia bovis</i> .....	61
10.2 Preparación de bibliotecas y secuenciación.....	61
10.3 Análisis de calidad de lecturas y filtrado .....	62

10.4 Ensamblado .....	62
10.5 Anotación funcional .....	62
11- Predicciones de péptidos T mediante bioinformática .....	63
11.1 Análisis funcional de los alelos <i>BoLA-DRB3</i> .....	63
11.2 Selección de genes candidato para las predicciones .....	63
11.3 Predicción de péptidos T a partir de los genes seleccionados .....	64
12- Obtención de péptidos T por inmunopeptidómica.....	65
12.1 Estrategia general.....	65
12.2 Confirmación de la expresión de BoLAII .....	65
12.3 Experimentos de inmunoprecipitación .....	66
12.3.1 Preparación de las columnas para la inmunoprecipitación .....	66
13-Validación experimental de péptidos T .....	70
13.1 ELISA .....	70
13.2 Citometría de flujo .....	70
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
1- Identificación y caracterización los alelos del gen <i>DRB3.2</i> de alta frecuencia en las razas de bovinos presentes en el NOA y NEA.....	72
1.1-Distribución de alelos <i>BoLA-DRB3.2</i> entre razas.....	72
1.2-Diversidad genética del gen <i>BoLA-DRB3</i> .....	77
1.3-Análisis de similitud de PBR .....	78
1.4-Frecuencias genotípicas de los alelos <i>BoLA-DRB3</i> y estructuración poblacional .....	83
1.5-Relaciones poblacionales basadas en frecuencias de alelos <i>BoLA-DRB3.2</i> .....	83
1.6-Análisis filogenético .....	85
2- Predicción e identificación de epitopes T de <i>Babesia bovis</i> mediante análisis inmunoinformáticos.....	88
2.1- Análisis inmunoinformáticos.....	88
2.2- Validación experimental de los péptidos predichos .....	95
3- Identificación de epitopes T de <i>Babesia bovis</i> mediante inmunopeptidómica .....	102
3.1 Ensayos de fagocitosis.....	102
3.2 Expresión de BoLAII en macrófagos .....	103
3.3 Identificación de epitopes T de <i>B. bovis</i> .....	104
3.4- Análisis de las proteínas correspondientes a los péptidos T identificados.....	112

3.4.1 Análisis de Ontología Genética .....	113
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>155</b>

## INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para tipificar el gen BoLA- <i>DRB3.2</i> .....	52
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico de <i>B. bovis</i> .....	56
Tabla 3: Frecuencias del gen BoLA- <i>DRB3.2</i> en razas índicas y Criollo del norte argentino. ....	73
Tabla 4: Alelos exclusivos en las diferentes razas bovinas analizadas. ....	75
Tabla 5: Información sobre las razas sudamericanas incluidas en este estudio.....	76
Tabla 6: Medidas de variabilidad genética.....	77
Tabla 7: Diversidad genética a nivel nucleótidos. ....	78
Tabla 8: Análisis de identidad y similitud en la secuencia de aminoácidos de BoLA- <i>DRB3.2</i> completo y en el PBR para cada raza .....	79
Tabla 9: Correlación de Pearson entre razas.....	79
Tabla 10: Genes seleccionados para la predicción de péptidos T.....	91
Tabla 11: Péptidos seleccionados por análisis inmunoinformáticos. ....	93
Tabla 12: Monitoreo de animales infectados experimentalmente con <i>B. bovis</i> . ....	96
Tabla 13: Tipificación de los bovinos utilizados para el gen BoLA- <i>DRB3</i> . ....	96
Tabla 14: Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de ELISA para validar pools de péptidos. .....	97
Tabla 15: Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de ELISA para validar péptidos individualmente. ....	98
Tabla 16: Listado de péptidos T inductores de liberación de IFN- $\gamma$ . ....	99
Tabla 17: Predicción de afinidad de unión de los péptidos T identificads a diferentes alelos del BoLA- <i>DRB3</i> . ....	102
Tabla 18: Péptidos específicos de <i>Babesia bovis</i> presentados por el BoLAII. ....	105
Tabla 19: Ejemplo de péptidos T solapados correspondientes a la proteína L- lactato deshidrogenasa. ....	110
Tabla 20: Péptidos consenso generados.....	110

## INDICE DE FIGURAS

---

Figura 1: Esquema de la estructura de un parásito representativo del phylum Apicomplexa .....	12
Figura 2: Representación esquemática de los distintos estadios de <i>Babesia</i> sp. en el huésped bovino.....	13
Figura 3: Microfotografías de eritrocitos bovinos infectados con <i>B. bovis</i> (izquierda) y con <i>B. bigemina</i> (derecha) .	14
Figura 4: Representación esquemática del mecanismo de motilidad por deslizamiento en el phylum Apicomplexa.....	15
Figura 5: Fases principales del proceso de invasión de los merozoítos al eritrocito. ....	16
Figura 6: Ciclo biológico de <i>Babesia</i> sp. en el hospedero bovino y en su vector .....	18
Figura 7: Ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i> . ....	20
Figura 8: Distribución a nivel mundial de <i>R. microplus</i> . ....	22
Figura 9: Estimados de prevalencia de babesiosis bovina a nivel mundial.....	22
Figura 10: Áreas de aptitud ecológica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en Argentina. ....	24
Figura 11: Zonificación del país según la Ley N° 12566.....	26
Figura 12: Razas bovinas frecuentemente utilizadas en el noreste argentino. ....	27
Figura 13: Mecanismos de respuesta inmune innata (A) y adaptativa (B) frente a <i>Babesia</i> sp.. ....	34
Figura 14. Principales mecanismos celulares involucrados en el procesamiento de antígenos.....	39
Figura 15: Estructura de las moléculas del CMH (azul) unidos a su péptido (rojo). ....	40
Figura 16: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II bovino . ....	41
Figura 17: Detalle de la conformación espacial del surco de unión del péptido. ....	42
Figura 18: Flujo de trabajo para purificación de péptidos T asociados al CMH.....	49
Figura 19: Microfotografías de ensayos de fagocitosis de eritrocitos infectados con <i>B. bovis</i> .. ....	55
Figura 20: Esquema del ensayo de infección de bovinos.....	57
Figura 21: Esquema de selección de genes sobre los cuales se realizó la predicción de epitopes T. ....	64
Figura 22: Estrategia general de los experimentos de inmunopeptidómica realizados.. ....	65
Figura 23: Esquema que resume el procedimiento realizado para identificar los epitopes T de <i>Babesia bovis</i> .....	69
Figura 24: Diagramas de Venn que muestran la distribución del alelo BoLA-DRB3 entre las razas de ganado según su tipo principal: razas taurinas, cebuinas y mixtas.....	76
Figura 25: MDS basado en la variabilidad del PBR entre razas. ....	80
Figura 26: Logos del PBR. ....	81
Figura 27: Análisis de funcionalidad de alelos BoLA- DRB3 más prevalentes en el NOA y NEA. ....	82
Figura 28: Estructuración y relaciones de las poblaciones. ....	85
Figura 29: Análisis filogenético entre alelos BoLA-DRB3.. ....	87
Figura 30: Puntajes de calidad a lo largo de la secuencia obtenida, utilizando FastQC. ....	89
Figura 31: Esquema para ilustrar la secuencia de análisis utilizada para la predicción de péptidos T de <i>B. bovis</i> . ....	91
Figura 32: Secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2c .....	93
Figura 33: PCR para verificar la presencia de <i>B. bovis</i> . ....	96

Figura 34: Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$ por parte de los linfocitos T CD4+ en el bovino 473	100
Figura 35: Citometría de flujo para confirmar la expresión del BoLAII..	104
Figura 36: Motivos de unión a los alelos BoLA-DRB3 *018:01 y *026:01 generados a partir de los datos obtenidos por inmunopeptidómica.	105
Figura 37: Secuencia de aminoácidos de la proteína RAP-1.	111
Figura 38: Esquema que señala los péptidos identificados en las 3 proteínas con mayor cobertura.	112
Figura 39: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes de acuerdo con su localización celular.	114
Figura 40: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes de acuerdo al proceso biológico del cual participa..	115
Figura 41: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes su función molecular.	116

## ABREVIATURAS

---

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxiribonucleico.

AMA: antígeno de membrana apical de *B. bovis*.

AMOVA: análisis de la varianza molecular.

BoLA: sigla en inglés del Antígeno Leucocitario Bovino.

BS: buffer staining.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Con A: concanavalina A.

CPA: Célula Presentadora de Antígenos.

DMSO: dimetilsulfóxido.

Dn: número medio de sustituciones nucleotídicas no sinónimas.

Ds: número medio de sustituciones nucleotídicas sinónimas.

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.

Eta: número total de mutaciones.

FDR: tasa de descubrimientos falsos.

FNT: Factor de Necrosis Tumoral.

G: fuerza g.

g: gramo.

GO: Ontología Genética.

GR: Glóbulo Rojo.

h: número de haplotipos.

Hd: diversidad de haplotipos.

He: heterocigocidad esperada.

Ho: heterocigocidad observada.

HWE: Equilibrio Hardy- Weinberg.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleuquina.

INF: interferon.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

K: número promedio de diferencias de nucleótidos.

Kpb: kilopares de bases.

M: molar.

MDS: análisis de escalamiento multidimensional.

mg: miligramo.

Min: minutos.

ML: arbol de máxima verosimilitud.

ml: mililitros.

mM: milimolar.

MOI: multiplicidad de infección.

Mpb: megapares de bases.

MVA: virus vaccinia Ankara modificado.

MWCO: filtro de separación por peso molecular.

Mz: Merozoitos.

Ne: número efectivo de alelos.

NEA: noreste argentino.

NK: linfocito *natural killer*.

No: número de alelos observado.

NOA: noroeste argentino.

ON: *over night*.

ON: óxido nítrico.

pb: pares de bases.

PBMC: células polimorfonucleares de sangre periférica.

PBR: surco de unión del MHC al péptido.

PCC: Coeficiente de Correlación de Pearson.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RAP: proteína asociada a las roptrias.

S: número de sitios de segregación.

TRAP: proteína anónima relacionada con la trombospondina.

ug: microgramo.

ul: microlitros.

uM : micromolar.

VC: volúmenes de columna.

$\Pi$ : diversidad de nucleótidos.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1-La babesiosis

La babesiosis, también conocida como babesiasis, piroplasmosis o fiebre hematúrica, es una enfermedad causada por un protozoo intraeritrocitario parásito del género *Babesia* que infecta una amplia gama de animales domésticos y salvajes, como los bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos ocasionalmente incluso existen especies que infectan al ser humano. Está distribuída a nivel mundial y es transmitida únicamente por garrapatas.

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en 1888 por Viktor Babes en Rumania (Babes, 1888), quien identificó al parásito tras analizar muestras sanguíneas de bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria. Babes observó al microscopio parásitos intraeritrocíticos en sangre de ovinos y bovinos. Posteriormente en 1891, Smith y Killborne señalaron a *Babesia sp.* como causante de una enfermedad bovina denominada fiebre de Texas. Estos mismos autores demostraron el papel transmisor de las garrapatas (Smith y col., 1893).

Todas las babesias que se han estudiado hasta la actualidad son transmitidas por garrapatas de la familia *Ixodidae* (Kuttler, 1988). En este sentido, la distribución de la babesiosis está relacionada estrictamente con la presencia del vector, la cual está relacionada con condiciones ecológicas y ambientales que favorece su persistencia.

El mayor impacto económico de la babesiosis está en la industria ganadera (Bock y col., 2004) aunque en salud humana comienza a cobrar mayor importancia debido al aumento poblacional, la construcción de viviendas cerca de áreas boscosas donde abundan las garrapatas, y el aumento de la distribución de las mismas debido al cambio climático (Kumar y col., 2021). Principalmente afecta a individuos inmunocomprometidos y a aquellos pacientes que adquieren la infección por transfusiones sanguíneas, de los cuales 1 de cada 5 casos resultan fatales (Krause, 2018).

Las distintas especies del género *Babesia* pertenecen al phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Piroplasmorina* and familia *Babesiidae*. El phylum *Apicomplexa* agrupa a los organismos protozoarios que poseen el denominado Complejo Apical, un conjunto de organelas que se encuentra en la región anterior del protozoo, y que en su conjunto participan activamente del proceso de invasión del eritrocito. En el género *Babesia*, el Complejo Apical se encuentra formado por las roptrias, micronemas y cuerpos esféricos (Figura 1) los cuales contienen una serie de proteínas involucradas en el proceso de invasión. Otra de las organelas características

de los integrantes del phylum Apicomplexa es el apicoplasto, que tiene una presencia ancestral dentro del mismo. Esta organela multimembranas es homóloga a los cloroplastos de las plantas y como tal posee una cierta autonomía por contener su propio genoma circular y su propia maquinaria de expresión. Si bien se comprobó que esta organela es esencial para la supervivencia del parásito, su rol exacto no se conoce completamente, pero se cree que está involucrada en la síntesis de lípidos e isoprenoides (Ross y Fadden, 2005).

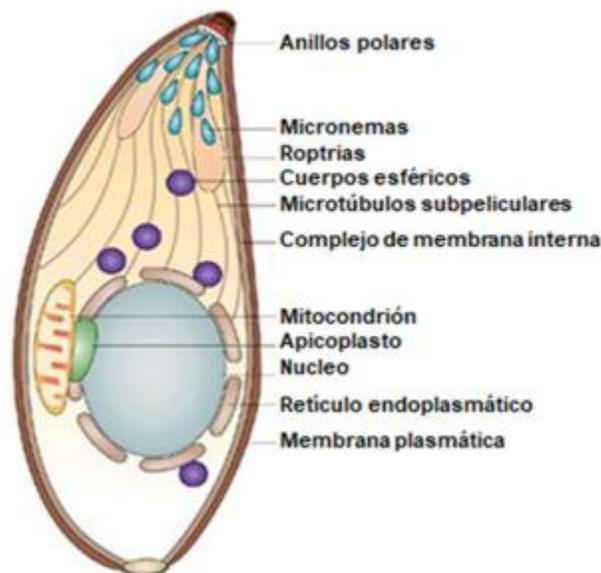


Figura 1: Esquema de la estructura de un parásito representativo del phylum Apicomplexa. Los gránulos densos son llamados cuerpos esféricos en *Babesia* (<http://parasitologiajmv-hilda.blogspot.com.ar>).

## 2- La babesiosis bovina

La babesiosis bovina es una infección causada principalmente por los parásitos *B. divergens*, *B. bovis* y *B. bigemina*, siendo estas últimas dos especies las únicas que se encuentran presentes en nuestro país y en el resto de América. También existen otras especies del género *Babesia* que pueden infectar al ganado bovino. Entre ellas se incluyen *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* y *B. jakimovi*. Estas especies no remarcan importancia a nivel económico o están restringidas a otros países (World Organisation of Animal Health, 2021, <https://www.woah.org/en/disease/bovine-babesiosis/>).

### 3- Etiología: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*

Los parásitos *B. bovis* y *B. bigemina*, junto con la infección provocada por la rickettsia *Anaplasma marginale* causan el síndrome conocido en Argentina como el Complejo Tristeza Bovina (CTB). En nuestro país, estos tres patógenos son transmitidos exclusivamente por la garrapata *Rhipicephalus (antes Boophilus) microplus*, en la cual cumplen parte de su ciclo de vida. *B. bovis* es transmitida exclusivamente por las larvas de *Rhipicephalus microplus*, mientras que *B. bigemina* es transmitida por las ninfas y los adultos y posiblemente por machos de *R. microplus* (Bock y col., 2004).

La otra parte de su ciclo de vida ocurre en el bovino, donde *B. bovis* y *B. bigemina* son parásitos intraeritrocitarios obligados (Figura 2). *B. bovis* en general es más patógena que *B. bigemina*, su mayor virulencia resulta del secuestro de los eritrocitos parasitados al endotelio microcapilar de órganos vitales, generando anemia hemolítica, daños neurológicos y renales, shock respiratorio y altas tasas de mortalidad en animales adultos. De acuerdo con su morfología, estos parásitos se agrupan como babesias pequeñas, como *B. bovis* (los merozoítos miden alrededor de  $2 \times 1,5 \mu\text{m}$ ) y babesias grandes, como *B. bigemina* que puede abarcar el diámetro total del eritrocito (los merozoítos miden alrededor de  $4,5 \times 2 \mu\text{m}$ ) (Figura 3).

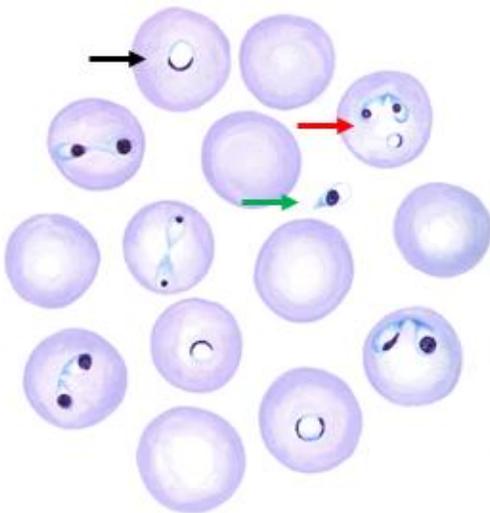


Figura 2: Representación esquemática de los distintos estadios de *Babesia* sp. en el huésped bovino. Se observan merozoítos libres (flecha verde), trofozoítos (flecha negra) y formas pares (flecha roja). Imagen tomada de la página: *Genome Annotation Research and Development. The Broad Institute. Cambridge Center.* <http://www.broadinstitute.org/>

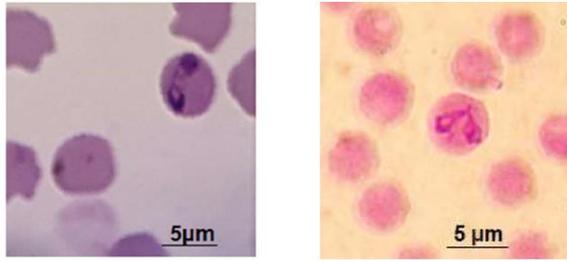


Figura 3: Microfotografías de eritrocitos bovinos infectados con *B. bovis* (izquierda) y con *B. bigemina* (derecha) (Valeria Montenegro, tesis doctoral).

#### 4- Proceso de invasión y egreso

El proceso de invasión al eritrocito por *Babesia spp.* es similar al de otros parásitos del phylum Apicomplexa y se caracteriza por cuatro etapas: adhesión, reorientación, unión estrecha e invasión. La etapa de adhesión consiste en el anclaje de los parásitos al eritrocito del hospedador. Luego se produce una reorientación, para ubicar la zona del complejo apical cerca de la interfase de anclaje. Posteriormente ocurre una unión estrecha o unión en movimiento, en donde se une la membrana del parásito con la del eritrocito. Finalmente, ocurre la invasión propiamente dicha, en la cual se propicia la penetración de la membrana del eritrocito a través de varias interacciones moleculares de los ligandos del protozoario con los receptores blanco de la superficie celular del hospedero (residuos de ácido siálico, glicosaminoglicanos sulfatados y proteínas sensibles a tripsina o  $\alpha$ -quimotripsina), concluyendo este proceso con la internalización del parásito en el eritrocito (Dubremetz y col., 1998; Soldati y col., 2001; Yokoyama y col., 2006) (Figura 4).

Desde el primer anclaje hasta la internalización completa, los parásitos de este phylum liberan proteínas de sus organelas apicales (roptrias, micronemas y los cuerpos esféricos) las cuales son translocadas hacia la membrana del merozoíto donde pueden funcionar como factores de reconocimiento del hospedero. Estas proteínas pueden ser secretadas en el medio fuera del parásito o dirigidas al punto de la invaginación de la membrana con el fin de hacer uniones estrechas con los eritrocitos del hospedero y lograr su penetración e internalización en el eritrocito (Sam-Yellowe, 1996; Preiser y col., 2000; Yokoyama y col., 2006). Algunas de estas proteínas han sido ampliamente caracterizadas: las proteínas 1, 2 y 3 del cuerpo esférico (SBP1, 2 y 3), la proteína 1 asociada a las roptrias (RAP-1), el antígeno 1 de la membrana apical (AMA-1), y la proteína anónima relacionada con la trombospondina (TRAP) (Ruef y col., 2000; Suarez y col., 1994, 2000; Gaffar y col., 2004; Salama y col., 2013; Montenegro y col., 2020).

Está reportado que el proceso de invasión *in vitro* de *B. bovis* a los eritrocitos también es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mossaad y col., 2015) y requiere de la presencia de un motor basado en actina-miosina (Asada y col., 2012), siguiendo así el patrón de invasión de otros apicomplejos relacionados como *Plasmodium* y *Toxoplasma*.

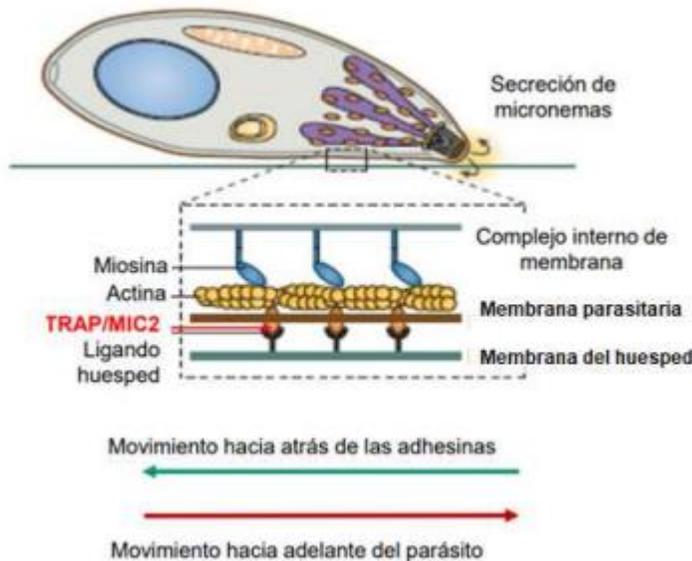


Figura 4: Representación esquemática del mecanismo de motilidad por deslizamiento en el phylum Apicomplexa. La exocitosis del contenido de los micronemas (naranjas) ocurre en el polo apical del parásito. Durante este proceso las adhesinas que están incrustadas en la membrana del micronema se insertan en la membrana plasmática del parásito, donde interactúan con los receptores extracelulares en la célula huésped (negros). La motilidad de deslizamiento resulta de la translocación hacia atrás de estos complejos de adhesina-receptor, que funciona con los motores de miosina (azul) a lo largo de los filamentos de actina (amarillo) en el espacio entre el complejo interno de membrana y la membrana plasmática del parásito y la membrana plasmática de la célula huésped (Fréchal y col., 2017).

Los parásitos del género *Babesia* invaden a los eritrocitos en pocos segundos y de forma activa para lo cual emplean la motilidad por deslizamiento o "*gliding motility*" que les permite migrar, ingresar y egresar de la célula huésped sin la necesidad de cilios, flagelos, pseudópodos y sin modificar su forma. Este mecanismo permite el avance por tracción mediante polimerización y despolimerización unidireccional de la actina, el impulso de motores de miosina e interacciones ligando-receptor que generan una fuerza locomotora que propulsa el parásito sobre el sustrato (Figura 5).



Figura 5: Fases principales del proceso de invasión de los merozoítos al eritrocito.

### 5-Ciclo biológico

El ciclo de vida de los parásitos del género *Babesia* es un proceso complejo formado por tres elementos: el vector, el parásito y el huésped mamífero. En *B. bovis* y *B. bigemina*, el ciclo consta de una etapa sexual compleja en la garrapata *R. microplus* y de una etapa asexual en los eritrocitos del bovino. Durante la etapa asexual, los parásitos del género *Babesia* no parasitan otras células de vertebrados que no sean eritrocitos maduros (Bock y col., 2004).

Cuando una larva de garrapata infectada con *Babesia* se alimenta de un bovino a través del hipostoma, inocula esporozoítos que, transportados por la saliva, ingresan directamente al torrente sanguíneo (Hodgson, 1992) (Figura 6 A). Cada esporozoíto coloniza un eritrocito a través de un mecanismo que incluye la selección del eritrocito, adherencia, reorientación e invasión. Como se mencionó anteriormente, esto depende de la integridad del complejo apical para la secreción de adhesinas y otras proteínas que permiten al parásito la adherencia al eritrocito y la rápida invasión. Una vez dentro y ya secretadas las proteínas por el complejo apical, se puede observar al microscopio el trofozoíto como forma de anillo en una tinción con Giemsa (Figura 6 B). Inicialmente el trofozoíto está rodeado por una vacuola parasitófora que se desintegra antes de iniciar la etapa de multiplicación llamada merogonia. Esta división celular asexual finaliza con la formación de dos nuevas formas invasivas denominadas merozoítos (Figura 6 C). Los merozoítos coexisten dentro del eritrocito, y pueden ocupar una gran parte de la célula (*B. bigemina*) o una porción menor (*B. bovis*) (Figura 6 D). Al alcanzar la madurez, los merozoítos se separan y lisan la célula alcanzando el espacio extracelular (Figura 6 E). Allí algunos invadirán otros eritrocitos, evitando colonizar los ya infectados (Scudiero y col., 2018) y repitiendo el ciclo asexual (Figura 6 F).

La etapa sexual del ciclo de vida se inicia en el intestino de las hembras de *R. microplus* después de la ingestión de eritrocitos bovinos infectados con *Babesia*, donde ocurre la segunda etapa de multiplicación llamada gametogonia, que consiste en una división celular por meiosis. Los gamontes

resultantes emergen de los glóbulos rojos, pero aun fuera de él continúan multiplicándose (Figura 6 G) por lo que, en consecuencia, se forman agregados de cuerpos radiados multinucleados. Estos cuerpos se fragmentan posteriormente en unidades haploides llamados cuerpos radiados de un solo núcleo haploide, los cuales se definen como gametas que emergen de los agregados y se fusionan de a pares (singamia) para formar una célula esférica denominada cigoto (Figura 6 H). Este cigoto se convierte en un estadio infectivo y penetra las células intestinales del artrópodo (Figura 6 I) donde se forman cuerpos de fusión (Figura 6 J) desde donde se desarrollan kinetos móviles (Figura 6K). Estos kinetos destruyen las células intestinales, escapan a la hemolinfa e invaden diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo los ovarios (Figura 6 L).

La colonización de los ovarios es una etapa crítica en la transmisión de *Babesia* ya que permite la transmisión del parásito a la próxima generación de garrapatas (Bock y col., 2004) (Figura 6 M). Por este motivo, la oviposición de la garrapata conteniendo los kinetos generará huevos que darán lugar a larvas de vida libre ya infectadas que permanecerán en el ambiente durante meses adheridas a la pastura (de acuerdo con condiciones ambientales favorables) y a la espera de un bovino susceptible para su alimentación posterior.

En la segunda generación de garrapatas, los kinetos de *Babesia* también migran a las glándulas salivales de la larva, donde ocurre la tercera etapa de multiplicación llamada esporogonia, caracterizada por la formación de un esporoblasto (Figura 6 N) del cual emergen miles de esporozoítos (Figura 6 O). Estos esporozoítos maduran en las glándulas salivales de *R. microplus* (Figura 6 P) y serán el estadio infectivo para el hospedador bovino. Una vez que la larva se prende al bovino se necesitan aproximadamente 2-3 días (*B. bovis*) y 9 días (*B. bigemina*) para que se inoculen los esporozoítos infectivos al bovino (Riek, 1966).

En resumen, en el bovino el género *Babesia*, presentados formas invasivas denominadas esporozoítos y merozoítos (Bock y col., 2004). La multiplicación alterna ciclos de invasión/lisis de eritrocitos que ocurren de forma asincrónica, permitiendo observar simultáneamente diferentes estadios del parásito en el torrente sanguíneo (Chauvin y col., 2009).

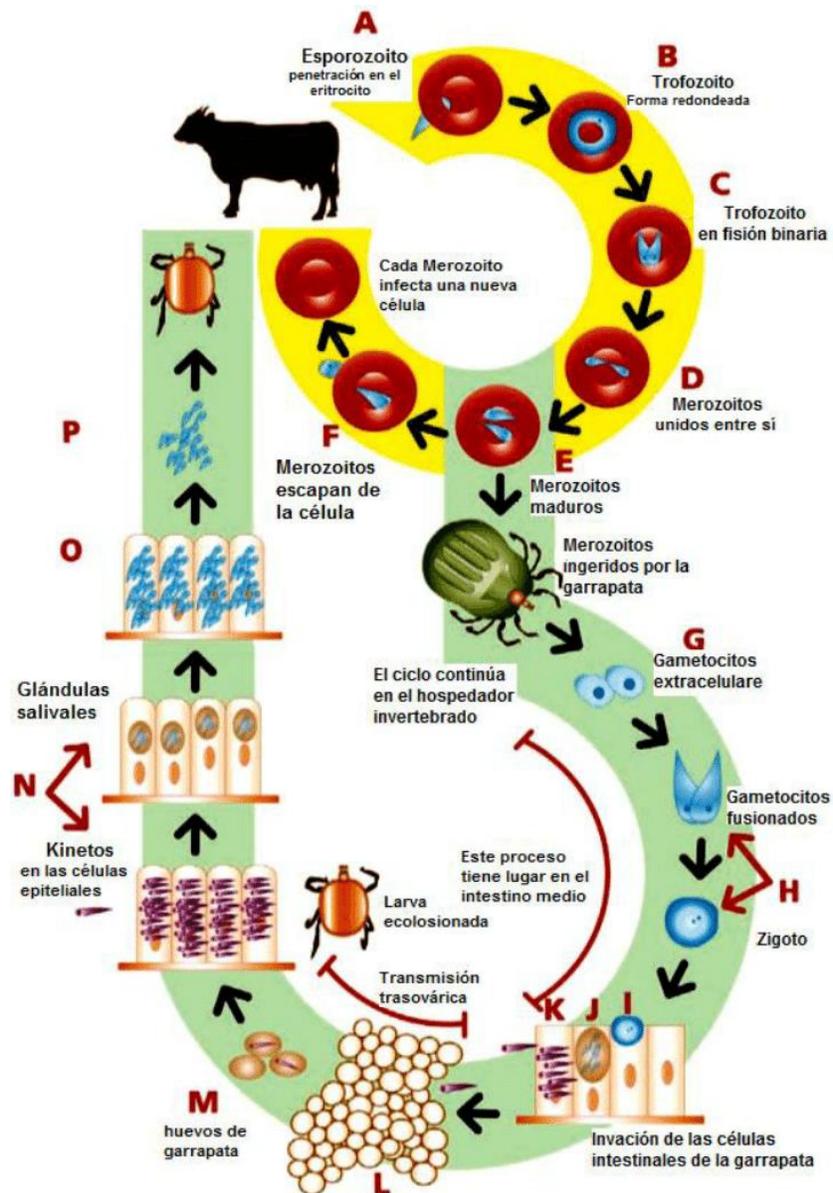


Figura 6: Ciclo biológico de *Babesia* sp. en el hospedero bovino y en su vector (Mosqueda y col., 2012).

## 6-Genoma

El primer genoma de *B. bovis* secuenciado fue el de la cepa de Texas T2B (Brayton y col., 2007) por el método de secuenciación aleatoria del genoma completo. Con un tamaño de 8,2 Mpb, el genoma de *B. bovis* es similar en tamaño al de otros hemoparásitos bovinos transmitidos por garrapata como *T. parva* (8.3 Mpb) (Gardner MJ y col., 2005) y *T. annulata* (8.35 Mpb) (Pain y col., 2005), los genomas apicomplejos más pequeños secuenciados hasta la fecha.

*B. bovis* posee 4 cromosomas de 2.62, 2.59, 1.73, y 1.25 Mpb de largo, respectivamente. Cada cromosoma contiene una región rica en A-T de aproximadamente 3 Kpb de longitud que sería el

centrómero, basado en características similares a las descritas para el centrómero putativo en el cromosoma 3 de *P. falciparum* (Bowman y col., 1999). Tres de los cromosomas son acrocéntricos, mientras que el cromosoma 4 es submetacéntrico. A partir de los datos de secuenciación se puede predecir que el genoma contiene un total de 3.887 genes codificantes de proteínas nucleares. Además del genoma nuclear, el parásito contiene dos genomas extracromosómicos ricos en A-T: el genoma del apicoplasto, circular, de 33 Kpb y el genoma mitocondrial, lineal, de 6 kpb.

Además de los datos genómicos disponibles, se realizaron también estudios de transcriptómica diferencial en merozoítos (bovino) y kinetos (garrapata) del parásito (Ueti y col., 2020). En este trabajo además repitieron la secuenciación del genoma por la técnica PacBio y se determinó que un total de 3.973 genes se transcriben en estadios sanguíneos o kinetos de *B. bovis*. Aproximadamente la mitad de los genes no mostraron una transcripción diferencial entre los 2 estadios, mientras que aproximadamente un 30% de los genes tienen aumentada su transcripción en la etapa sanguínea o en kinetos.

En el caso de *B. bigemina*, el genoma fue secuenciado en el año 2021 (Sachman-Ruiz, 2021) a partir de una cepa virulenta aislada de un caso clínico en México y su versión atenuada a través de pasajes por cultivo *in vitro*. Los tamaños de los genomas obtenidos fueron de 9,1 Mpb para la cepa virulenta y de 11.8 Mpb para la cepa atenuada. Se encontraron diferencias entre los genes presentes en ambas cepas, que fueron relacionados con la virulencia y el conjunto de estos genes fue denominado viruloma. Aún no se encuentran publicados datos de transcriptómica.

## 7- Vector transmisor

*B. bovis* y *B. bigemina* son parásitos obligados que sólo pueden ser transmitidos entre los bovinos a través de la garrapata *R. microplus*. Este vector, conocido como la garrapata común del bovino, es un ectoparásito hematófago asociado principalmente a los bovinos, aunque también se la puede encontrar en caballos, cabras, ovejas, asnos, perros, cerdos y algunos mamíferos silvestres y pertenece al phylum Arthropoda, clase Arachnida, subclase Acari, orden Ixodida, familia Ixodidae, género *Rhipicephalus*, subgénero *Boophilus*, especie *microplus*.

*R. microplus* se caracteriza por ser un ectoparásito obligado de un solo hospedador, donde los tres estadios parasitarios, larvas, ninfas y adultos (machos y hembras), se alimentan, mudan y copulan sobre el mismo individuo.

El ciclo de *R. microplus* se divide en dos fases: una parasitaria, en la cual la garrapata se desarrolla sobre el bovino, y otra no parasitaria o de vida libre, que se cumple fuera del hospedador, en las

pasturas. La fase no parasitaria comienza cuando las hembras ingurgitadas (teleoginas) se desprenden del bovino y caen al suelo para poner sus huevos. La postura se produce en sitios protegidos de las radiaciones solares directas y da lugar a entre 2.000 y 3.000 huevos. Entre 25 y 45 días luego de la oviposición nacen las larvas. Las mismas son pequeñas, de color marrón, provistas de 3 pares de patas con un pequeño escudo en la parte dorsal del cuerpo. Cuando las larvas que se encuentran en la vegetación acceden a un bovino, comienza la fase parasitaria del ciclo biológico, que, a diferencia de la fase no parasitaria, es escasamente influida por las condiciones ambientales. Esta fase se desarrolla íntegramente sobre el hospedador, y tiene una duración normal de 23 días. Una vez sobre el bovino, las larvas comienzan a alimentarse para mudar al estado siguiente de ninfa. Estas tienen 4 pares de patas, son de color marrón claro, y hacia el día 12 aproximadamente, se ingurgitan completamente con sangre (metaninfa). Las ninfas mudan sobre el hospedador dando lugar a adultos (machos y hembras), estos copulan, las hembras se ingurgitan con sangre (teleoginas) y finalmente caen al suelo para desovar.

La duración relativamente constante de la fase parasitaria de *R. microplus* le confiere capacidad para realizar más de un ciclo anual (Figura 7). El número y la duración de ciclos anuales van a estar determinados por la duración de la fase no parasitaria, la cual es influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad del ambiente. En zonas tropicales, la garrapata común del bovino puede desarrollar hasta 5 ciclos anuales, pero en áreas más meridionales, como el norte de Santa Fe, sólo tiene capacidad para completar entre 2 y 3 ciclos anuales (Núñez y col., 1982; Späth y col., 1994; Nava y col., 2003).

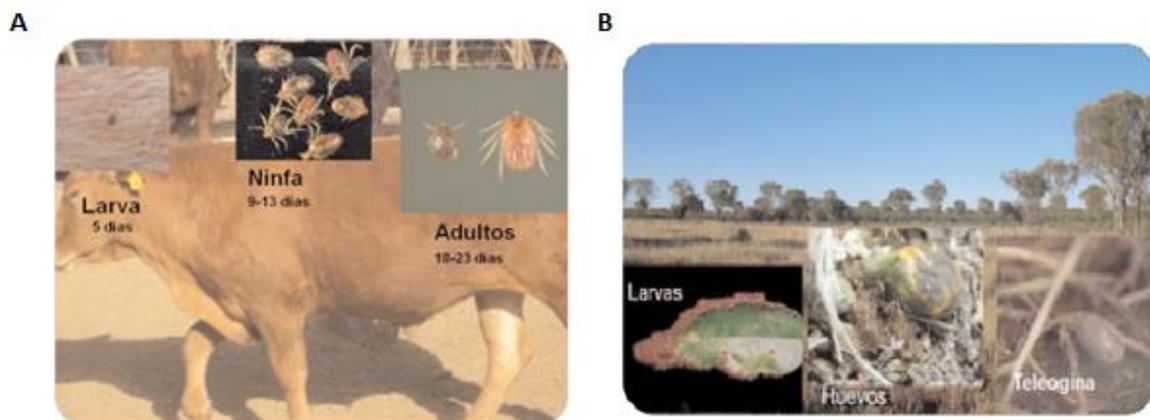


Figura 7: Ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*. A- Fase parasitaria; B- fase no parasitaria (Nava y col., 2003).

La utilización de acaricidas químicos es la principal herramienta disponible en la actualidad para el control de la garrapata común del bovino. La técnica de aplicación más común es el baño de

inmersión que, en ausencia de resistencia a los productos utilizados, constituye un método eficaz y de bajo costo. El manejo incorrecto de los baños (instalaciones deficientes, errores en la preparación del pie de baño y en la reposición, acumulación de costras y sedimentos por mala limpieza, ausencias de controles periódicos del nivel del baño, animales incorrectamente sumergidos) actúa en detrimento de la eficacia de esta herramienta de control. Otros métodos que pueden ser utilizados son los baños de aspersion, la vía tópica (“*pour on*”) y el empleo de inyectables.

Las principales limitantes del empleo de acaricidas químicos son la aparición de resistencia, la contaminación ambiental y las restricciones para el consumo de la carne o leche que imponen los períodos de carencia de determinados principios activos. Existen dos vacunas contra la garrapata común del bovino, una producida en Australia (TickGARD) y la otra en Cuba (GAVAC) (Rodríguez-Mallón, 2016). El enfoque de ambas vacunas ha sido apuntar al antígeno Bm86, un “antígeno oculto” asociado con el intestino del vector, el que generalmente no es reconocido por el hospedador durante la infestación natural; sin embargo, cuando se usa como antígeno vacunal, los anticuerpos del hospedador atacan el intestino de la garrapata, interrumpiendo el ciclo de vida. Ninguna de las dos vacunas se utiliza comercialmente en Argentina, y en el caso de GAVAC, su uso quedo restringido al país de origen, principalmente porque se necesitan de 3 a 4 aplicaciones anuales y porque se encontró que la respuesta protectora disminuye notablemente en varios países como México, Estados Unidos, Brasil y Argentina en comparación al país de origen (De la Fuente y col., 1999).

La distribución de la babesiosis está dada por la distribución del vector y está relacionada con condiciones ecológicas y ambientales, habitando regiones tropicales y subtropicales del mundo. A nivel mundial, según cifras estimativas, unos 400 millones de cabezas de ganado habitan en las zonas de distribución de *R. microplus* (Figura 8; Echaide y col., 2008). Estudios más recientes sugieren que el cambio climático que afecta el planeta podría incluso aumentar las zonas de distribución del vector en los próximos años, afectando nuevas zonas de alta producción ganadera (Marques y col., 2020).

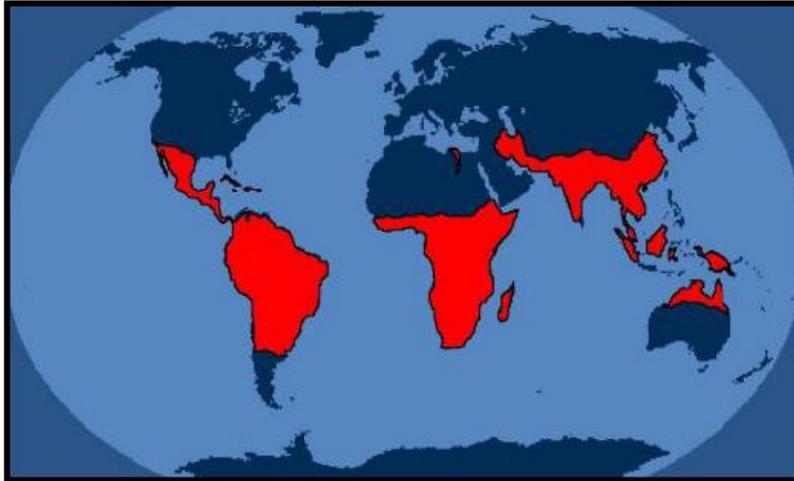


Figura 8: Distribución a nivel mundial de *R. microplus*.

### 8- Prevalencia e importancia económica

La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial ha sido calculada mediante un meta-análisis serológico en un estudio reciente (Figura 9) (Jacob y col., 2020) donde se observaron valores variables entre 64 y 22 % según la zona continental. Se estima que causa pérdidas económicas anuales de aproximadamente 2,5 billones de dólares en el mundo.

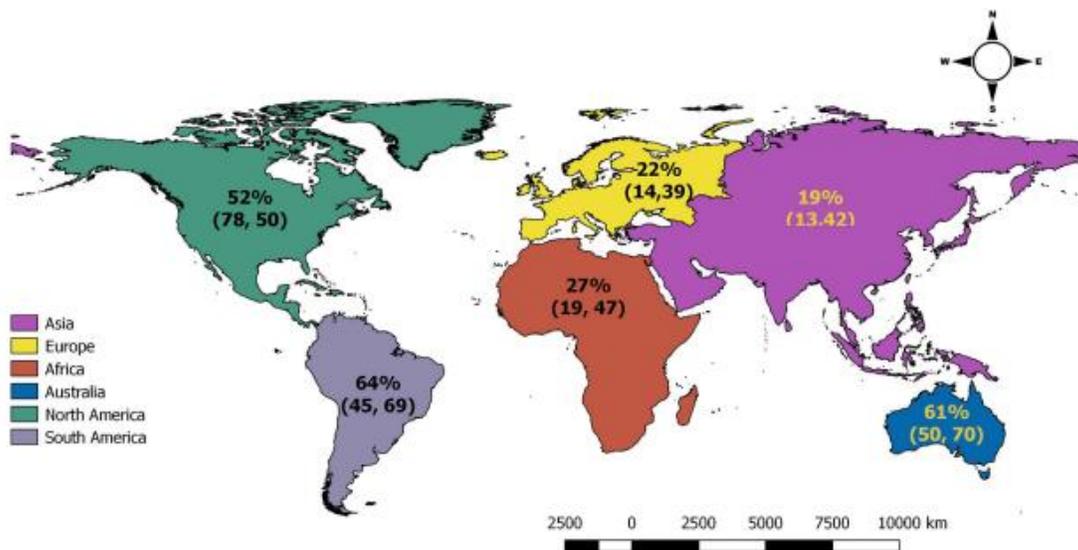


Figura 9: Estimados de prevalencia de babesiosis bovina a nivel mundial. La prevalencia de infecciones activas y seroprevalencia están indicadas en paréntesis (Jacob y col., 2020).

De acuerdo con los valores encontrados para cada región, el mayor porcentaje de prevalencia se encontró en América del Sur (64%). Este valor está relacionado con que la mayoría de la población

bovina en este continente se encuentra en áreas infestadas de garrapatas con estabilidad enzoótica establecida en la mayoría de las regiones. Sin embargo, la prevalencia más alta en América del Sur también puede a las condiciones agroclimáticas favorables a la presencia del vector y que prevalecen en esta región.

En Argentina, la garrapata común del bovino se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales del noreste (NEA) y noroeste (NOA) ubicadas al norte de los paralelos 30°-31° S, con excepción de la región andina. *R. microplus* se encuentra en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe (al norte del paralelo 30° S), Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco. La distribución de la garrapata en Argentina, y por lo tanto de la babesiosis, está relacionada a dos factores ambientales, el déficit hídrico y las temperaturas. En este sentido, la presencia de la garrapata requiere de inviernos benignos (mayoría de los meses con temperaturas superiores a 14,5 °C) y déficit hídrico bajo (climas relativamente húmedos). La aptitud ecológica de cada región para *R. microplus* se puede clasificar en función de estas dos variables:

- 1) Área intermedia: Déficit hídrico anual < 200 mm y 3-4 meses del año con temperaturas < 14,5 °C
- 2) Área intermedia: Déficit hídrico anual < 200-500 mm y < 3 meses del año con temperatura < 14,5 °C.
- 3) Área favorable: Déficit hídrico anual < 200 mm y y ≤ 1 mes del año con temperatura < 14,5 °C
- 4) Área erradicada por la campaña de lucha contra la garrapata;
- 5) Área naturalmente libre.

La aptitud ecológica de las distintas regiones de Argentina para la garrapata común del bovino se muestra en la Figura 10.



Figura 10: Áreas de aptitud ecológica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Argentina. 1)- Área intermedia: Déficit hídrico anual < 200 mm y 3-4 meses del año con temperaturas < 14,5 °C. 2)- Área intermedia: Déficit hídrico anual < 200-500 mm y < 3 meses del año con temperatura < 14,5 °C. 3)- Área favorable: Déficit hídrico anual < 200 mm y  $\leq 1$  mes del año con temperatura < 14,5 °C. 4)- Área erradicada por la campaña de lucha contra la garrapata. 5)- Área naturalmente libre. En azul se indican las zonas de anegamiento. El presente mapa fue realizado en el año 1992 (Anziani y col., 1993).

En nuestro país, en las zonas tropicales y subtropicales del NEA y NOA que se encuentran al norte de los paralelos 30°-31° S, la presencia de garrapatas ocasiona fuertes limitaciones al desarrollo de la ganadería de carne y leche. El número de bovinos infectados alcanzaba en 1992 los 9.900.000 animales, lo que en ese año constituía aproximadamente el 19% de la población bovina total del país (Anziani y col., 2011). Las pérdidas económicas no son sólo directas por pérdida de peso, mortalidad, daños en los cueros y menor producción láctea, si no también indirectas por los costos para el tratamiento (garrapaticidas, mano de obra, infraestructura de bañaderos) y la prevención de estas enfermedades mediante vacunas vivas contra los hemoparásitos. Las pérdidas económicas asociadas a la garrapata *R. microplus* superan los 250 millones de dólares anuales en la Argentina (siendo el 79% ocasionadas por las garrapatas y un 21% por la babesiosis), por lo que es considerada una enfermedad relevante para la industria ganadera y lechera del país (Lozina y col., 2015). Las pérdidas específicas por babesiosis se habían estimado en 38,9 millones de dólares en el año 1994 (Späth y col., 1994).

El control de *R. microplus* en nuestro país está reglamentado por el SENASA y este es el organismo rector que a través de la “ley de lucha obligatoria contra la garrapata” (Ley N°12566) indica los

procedimientos que productores y veterinarios deben seguir en las distintas áreas del país. Esta ley, promulgada en Buenos Aires en 1988, en su artículo primero establece:

**ARTICULO 1º. - Declárase obligatoria en todo el país, la lucha sistemática y ofensiva contra las diferentes especies de garrapata del ganado y de los animales domésticos, en la forma, zonas y tiempo que determine el Poder Ejecutivo.**

En el contexto de esta ley, a través de la resolución 382-E del mes de junio del año 2017, se aprueba el Plan Nacional de Control y/o Erradicación de la Garrapata del bovino, *R. microplus* en la REPÚBLICA ARGENTINA. Esta medida indirecta de control de la babesiosis implica atacar la garrapata mediante el uso de acaricidas, teniendo en cuenta que se han desarrollado productos garrapaticidas de aplicación diferente a los baños de inmersión con óptimos niveles de eficacia y efecto residual, que permiten un mejor control de este parásito en las zonas con garrapatas. Aunque esta medida resulta efectiva, con el uso de estos compuestos según pasan los años, se han ido seleccionando las poblaciones de garrapatas que desarrollaron resistencia por estar expuestas a estos químicos que se comercializan, productos principalmente derivados de la amidina como el Amitraz o piretroides como el caso de la Cipermetrina y la Flumetrina (Cutullé y col, 2013; Lovis y col., 2013).

En la actualidad, el artículo 3º de la resolución 382-E/2017 de la ley 12566 establece el marco legal para la zonificación del país en relación con el plan de lucha contra la garrapata común del bovino. Dichas zonas (Figura 11) se definen de la siguiente manera:

- a) Zona de control (con garrapatas): toda región con presencia del parásito en la cual el *Rhipicephalus microplus* posee condiciones ecológicas aptas para la evolución de su ciclo biológico.
- b) Zona de erradicación (bajo plan): territorio dentro de la zona con garrapatas, en donde se adopte una estrategia de limpieza y eliminación progresiva del parásito hasta alcanzar su supresión total del ambiente.
- c) Zona indemne (libre de garrapatas): toda región del país donde ecológicamente no es apta para el desarrollo del parásito o aquella apta para la evolución del ciclo biológico del *R. microplus*, donde se haya ejecutado y comprobado su erradicación en todos los establecimientos y/o exista un porcentaje menor al uno por ciento (1 %) de establecimientos infestados, fiscalizados por el servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria.

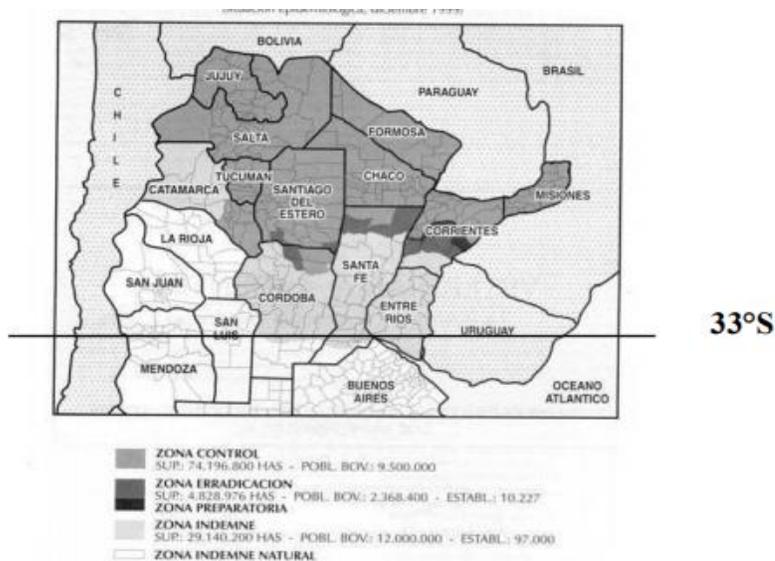


Figura 11: Zonificación del país según la Ley N° 12566 (Plan de lucha contra la garrapata), actualizado por SENASA (2017). El paralelo 33° S marca la división entre la región endémica y la región libre de la enfermedad.

### 8.1 Razas bovinas utilizadas para la producción ganadera en la zona enzoótica de la enfermedad.

Debido a intensos procesos de selección, actualmente en el mundo la mayoría de las razas bovinas pertenecen a la subespecie *Bos primigenius taurus* (razas taurinas) o *Bos primigenius indicus* (razas cebuinas). Las razas taurinas son muy eficientes para la producción de alimento en comparación con otras razas; sin embargo, no están bien adaptadas a los ambientes tropicales y no pueden maximizar su potencial de producción en los trópicos. El problema principal con el ganado taurino en estas zonas es la muy baja tolerancia al estrés por calor.

Aunque los niveles de producción del ganado cebuino no son tan buenos como los de taurinos, el ganado cebuino se utiliza ampliamente en los trópicos, especialmente en Brasil, debido a su termotolerancia y resistencia a parásitos y artrópodos, entre ellos *R. microplus*, vector de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. Para superar o minimizar los problemas relacionados con la disminución de la producción de ganado taurino de raza pura en regiones tropicales, una estrategia ha sido producir cruces de *Bos primigenius taurus* X *Bos primigenius indicus* (Sartori y col., 2010). Los mestizos incorporan la adaptación al medio ambiente del ganado cebuino y la mayor producción del ganado *taurino* (Favero y col., 2019) así como el beneficio del vigor híbrido.

En el noreste y noroeste de nuestro país, donde el clima es subtropical y la garrapata *R. microplus*, como vector de la enfermedad, encuentra las condiciones ecológicas aptas para su ciclo vital, las razas principalmente utilizadas para la producción de carne son Nelore, Brahman, Braford y Brangus

(Barbera y col., 2018). Las razas Nelore y Brahman pertenecen a la subespecie *Bos primigenius indicus*, aunque tienen orígenes históricos y geográficos muy diferentes. Mientras que la raza Nelore tiene su origen en la India, Brahman se creó en los Estados Unidos a partir de cruces seleccionados y dirigidos entre razas cebú (Guzerat, Nelore, Gyr, Krishna Valley y Sindhi Red). Brangus y Braford son el resultado de los cruces entre Brahman con Angus o Hereford, respectivamente, por los que las consideramos razas mixtas. Por su parte, el bovino criollo es descendiente de animales traídos por los conquistadores a América, instalados en el Caribe y luego esparcidos por todo el continente. Esta raza estuvo principalmente bajo selección natural durante al menos cuatro siglos y es del tipo *Bos primigenius taurus* (Livio Sala, tesis doctoral, 2009; Figura 12).

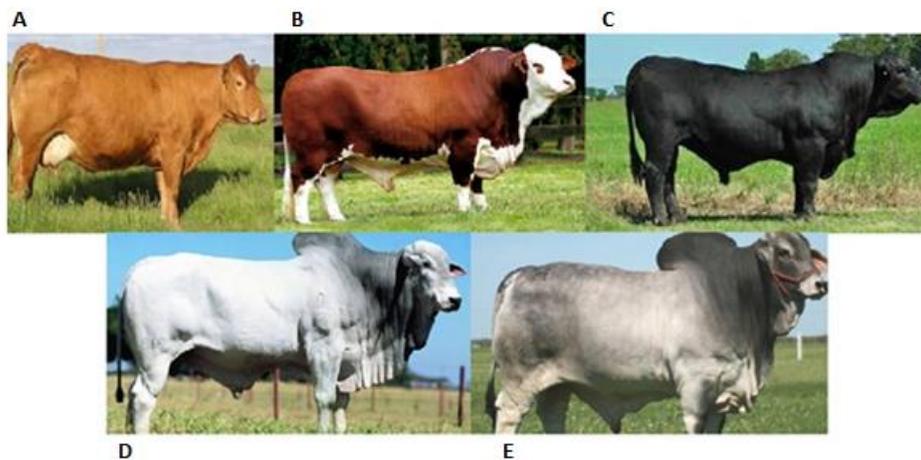


Figura 12: Razas bovinas frecuentemente utilizadas en el noreste argentino. Referencias: **A** Criollo (*Bos primigenius taurus*), **B** Braford (mixta) **C** Brangus (mixta) **D** Nelore (*Bos primigenius indicus*) **E** Brahman (*Bos primigenius indicus*).

## 9- Signos clínicos

El cuadro clínico de un animal infectado con *Babesia* sp. varía según la edad del animal, su estado nutricional, inmunológico y la patogenicidad de la cepa del parásito. Los bovinos menores a 9 meses generalmente no presentan síntomas, ya que presentan una resistencia natural posiblemente asociada a una alta proporción de Linfocitos T y  $\delta$  (Hein y Mackay, 1991) que va disminuyendo con la edad, por lo que la mayoría de los casos clínicos de babesiosis se observan en animales adultos.

La babesiosis aguda se asocia con un estado de anemia causada por una lisis eritrocítica extensiva (con la destrucción del 75% o más de los eritrocitos, en pocos días), caracterizada por un cuadro febril que coincide con niveles detectables de parásitos en sangre. El primer signo de la enfermedad es generalmente la hipertermia ( $> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pudiendo superar los  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida de anorexia, depresión, decaimiento y reticencia al movimiento. Se produce ictericia, hipoxia y en algunos casos anoxia

tisular debido a la adhesión de los eritrocitos infectados al endotelio de los capilares. La infección también puede inducir el aborto natural en hembras preñadas o la reducción temporaria de la fertilidad en toros.

El período de incubación es de 8 a 15 días. La morbilidad puede llegar a ser del 40% llegando a un 90% en los brotes. La mortalidad es más frecuente en animales estresados y procedentes de lugares donde no existe la enfermedad y que se infectaron luego de su traslado, o bien en animales inmunodeficientes por quimioterapia, cirugía previa reciente, escasez de calidad y cantidad de alimentos o afecciones concomitantes. El factor primario en los casos fatales se ha relacionado con la magnitud del cuadro anémico y la consecuente anoxia. Sin embargo, existen estudios que señalan a ciertas enzimas proteolíticas de origen parasitario como las responsables de la activación de mecanismos fisiológicos que conllevan a los signos clínicos y las alteraciones tisulares produciendo inflamación generalizada, shock y muerte del animal (Boero, 1976; Luciani, 2005).

La infección puede tener un curso benigno con recuperación espontánea, gradual o bien progresar a una segunda fase y producir una condición debilitante que finaliza con la muerte del animal. Los animales que sobreviven a la fase aguda desarrollan una fase crónica que puede durar varias semanas con elevaciones intermitentes de la temperatura, leve hemoglobinuria, acompañado de anorexia y caquexia, pero finalmente los animales se recuperan, mejorando luego la condición física y productiva.

Los terneros pueden infectarse en el útero, aunque, la infección transplacentaria parece ser accidental y poco frecuente. Trabajos previos realizados en Israel, Australia y Argentina mencionan casos clínicos de babesiosis en individuos perinatales infiriendo una transmisión transplacentaria (Trueman, 1986; Yeruham y col., 2003; Alcaraz y col., 2004).

La infección ocasionada por *B. bovis* se asemejan en muchos aspectos a la producida por *B. bigemina*, pero existen algunas diferencias. *B. bovis* es más virulenta que *B. bigemina*, pudiéndose presentar signos más severos de *shock* nervioso y respiratorio como consecuencia del secuestro de glóbulos rojos infectados que presentan cambios morfológicos en su membrana plasmática y quedan retenidos en los capilares pulmonares y cerebrales (Uilenberg, 1995; Brown and Palmer, 1999). Los casos en los que se presenta la sintomatología nerviosa terminan con la muerte del animal. La sintomatología nerviosa frecuentemente está dada por la incoordinación, ataxia, hiperextensión de la cabeza, movimientos involuntarios de los miembros y finalmente la muerte.

## 10-Patogenia y lesiones

Los mecanismos patogénicos en la babesiosis bovina están muy caracterizados en *B. bovis* mientras que estos procesos en *B. bigemina* se encuentran poco estudiados. La alteración de la estructura y funcionalidad de los eritrocitos por parte de *B. bovis* parecería ser crítico para su supervivencia y a su vez explicaría la patogénesis de los casos fatales producidos por este agente.

Los eritrocitos bovinos infectados con *B. bovis* resultan ser más rígidos que los eritrocitos normales, debido a una modificación de los componentes del citoesqueleto eritrocitario por proteínas derivadas del parásito. Este cambio altera la capacidad de deformación de los glóbulos rojos para adaptarse rápidamente a los capilares sanguíneos. Adicionalmente, aumenta la capacidad de adhesión de los eritrocitos a células endoteliales y entre eritrocitos, generando un tránsito capilar más lento. Estos cambios predisponen al secuestro de eritrocitos infectados en la microvasculatura, evitando la destrucción de parásitos por parte de las células fagocíticas del bazo, el cual cumple un rol crítico en la inmunidad contra *B. bovis* (Gohil y col., 2010). Por este motivo, la babesiosis causada por *B. bovis* está típicamente asociada con niveles bajos de parasitemia periférica y acumulación de glóbulos rojos parasitados en la circulación capilar de diversos órganos (Gohil y col., 2010). Las lesiones más graves asociadas a este mecanismo patogénico se hallan en el encéfalo y los pulmones, generando trastornos neurológicos, distrés respiratorio y posteriormente falla multiorgánica (Gohil y col., 2013). La patogénesis asociada a *B. bigemina* está casi completamente vinculada a una hemólisis intravascular rápida y masiva. Si bien la recuperación de los casos no fatales suele ser rápida y de manera completa en algunos casos, la enfermedad puede evolucionar de manera abrupta cursando con un cuadro de anemia e ictericia severas y culminando con la muerte del animal (Bock y col., 2004).

## 11- Diagnóstico

El diagnóstico de babesiosis bovina es una herramienta importante para controlar y prevenir la diseminación de la enfermedad.

Durante la etapa aguda de la enfermedad el número de parásitos dentro de los eritrocitos (parasitemia máxima 1% para *B. bovis* y 10% en el caso de *B. bigemina*) aumenta de tal manera que se pueden detectar microscópicamente. Para el diagnóstico directo se obtiene una muestra de sangre tomada de la punta de la cola u oreja del bovino y se realiza un extendido o frotis. El frotis fino o grueso con tinción de Giemsa es el método tradicional de diagnóstico directo y permite la detección de parásitos en infecciones agudas. El frotis fino permite también la diferenciación de

especies mientras que el frotis grueso se caracteriza por poseer mayor sensibilidad pudiéndose detectar un parásito cada  $10^5 - 10^6$  eritrocitos (Mosqueda y col., 2012). Sin embargo, en animales crónicamente infectados donde ocurre una forma subclínica de la enfermedad, este método es inútil y deben emplearse otros métodos indirectos más sofisticados.

La técnica de PCR es un método enzimático que permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN *in vitro*. La técnica de PCR resulta ser más sensible ya que permite detectar hasta 1 parásito cada  $1 \times 10^9$  eritrocitos (Mosqueda y col., 2012). Existen PCRs diagnósticas de referencia para *B. bovis* y *B. bigemina* descritas en el manual de la OIE (Figuerola y col., 1992, 1993, 1994; De la Fourniere y col., 2021) A su vez, existen otras técnicas moleculares para el diagnóstico, pero su uso es restringido al campo de la investigación, como la PCR en tiempo real y LAMP (Buling y col., 2007; Criado-Fornelio y col., 2009; Liu y col., 2012).

Cuando el número de parásitos de *Babesia* en la sangre es demasiado bajo para detectarse, buscar anticuerpos contra las proteínas de la etapa sanguínea del parásito ha demostrado ser una herramienta confiable para identificar portadores infectados o animales previamente expuestos, ya sea a infecciones naturales o a la vacuna con cepas atenuadas.

La inmunofluorescencia es un método de diagnóstico indirecto que requiere un antígeno de buena calidad, que es difícil de obtener ya que implica el cultivo *in vitro* del parásito o mantener animales experimentalmente infectados. Además, requiere de un microscopista experimentado en microscopía de fluorescencia y por lo tanto posee cierta subjetividad. La técnica puede discriminar entre especies de *Babesia*, aunque se han informado algunos problemas de reacción cruzada.

Cuando se requiere procesar una gran cantidad de muestras, la inmunofluorescencia se vuelve difícil de aplicar porque lleva mucho tiempo al tener que analizar una muestra a la vez. En estos casos, la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) permite automatizar el diagnóstico. El ELISA tiene la ventaja de su objetividad, la capacidad de automatización y presenta mayor especificidad que la IF. Existen varias versiones de ELISA para la detección de distintas especies de *Babesia*. El método de ELISA indirecto se desarrolló inicialmente usando antígeno crudo obtenido de sangre infectada, pero la reactividad cruzada con proteínas séricas fue muy alta (Morzaria y col., 1992).

En Argentina, la EEA INTA – Rafaela ha desarrollado dos técnicas de ELISA indirecto para uso como diagnóstico de rutina para *B. bovis* y *B. bigemina*. Ambas pruebas utilizan como antígeno de pegado a la placa un lisado de merozoítos purificado por gradiente de Percoll. Si bien ambas pruebas poseen una alta especificidad y sensibilidad con valores del 97% y 98% respectivamente, la forma de

obtener los parásitos es relativamente cara y además muy laboriosa porque requiere del cultivo *in vitro* de eritrocitos bovinos, los cuales son luego infectados para amplificar al parásito (Florin-Christensen y col., 2014). En virtud de superar esta dificultad, es que se han buscado alternativas a este método entre ellas el uso de antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales, lo que aumenta la especificidad y disminuye la unión y señal inespecífica. La biotecnología moderna permite la expresión de proteínas patógenas antigénicas, que pueden unirse a la placa de ELISA y se utiliza para evaluar la presencia de anticuerpos anti-babesia utilizando un anti-IgG conjugado con una enzima, generalmente peroxidasa. Algunos antígenos de *B. bovis* y *B. bigemina* como RAP-1, MSA-2c y AMA-1 han sido clonados, expresados y evaluados a través del método de ELISA (Boonchit y col., 2002, Dominguez y col., 2012; Torina y col., 2016; Jaramillo Ortiz y col., 2018). Sin embargo, actualmente el Laboratorio de Parasitología de la EEA – INTA Rafaela es por el momento el único laboratorio de Argentina que ofrece el servicio de diagnóstico serológico por ELISA indirecto a todos los productores ganaderos.

## 12- Tratamiento

El control de la babesiosis bovina puede ser mediante el manejo de garrapatas, inmunización contra los parásitos, fármacos parasiticidas o por una combinación de todos estos enfoques. El éxito del tratamiento depende del diagnóstico precoz y la pronta administración de los medicamentos. Para el tratamiento específico se dispone en nuestro país de dos compuestos: 1) El Diminazene (Ganaseg) que se administra a la dosis de 3,5 mg/kg vía intramuscular. Esta droga actúa sobre ambas Babesias y tiene un amplio margen terapéutico. 2) El Imidocarbo ha demostrado ser muy efectivo como agente terapéutico y también se lo ha utilizado como profiláctico, ya que se va eliminando y metabolizando lentamente durante 4 a 6 semanas. La dosis recomendada es 1,2 mg/kg vía subcutánea o intramuscular, en el caso de la esterilización de portadores se requiere una dosis de 2 mg/kg peso vivo. Además del tratamiento con un compuesto babesicida puede considerarse la posibilidad de administrar un tratamiento de apoyo, incluyendo cardiotónicos, antihistamínicos, soluciones parenterales, vitamínicos y minerales, para ayudar a la recuperación del animal. Si el tratamiento específico es administrado en la fase inicial de la enfermedad, como regla general la mayoría de los animales se recuperan. Sin embargo, la manipulación de los bovinos enfermos debe hacerse cautelosamente para evitar muertes súbitas. Es importante resaltar que el uso indiscriminado de estas drogas a dosis subletales para los parásitos puede producir la selección de poblaciones resistentes a los medicamentos con la consecuente ineficacia de estas.

## 13-Inmunología

### 13.1 Respuesta inmune innata

La inmunidad contra la infección por *Babesia* requiere la intervención de tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Brown y Palmer, 1996).

Está reportado que los terneros jóvenes, menores a 6 meses, son relativamente resistentes al desarrollo de la forma grave de la enfermedad típicamente observado en adultos susceptibles tras la infección inicial con *B. bovis* (Trueman y Blight, 1978; Goff y col., 2002). Se ha demostrado que la respuesta de los terneros jóvenes a la infección por *B. bovis* involucra la producción temprana de Interleuquina-12 (IL-12) e IFN- $\gamma$  y óxido nítrico (ON), por parte del bazo (Goff y col., 2002). Esta resistencia relacionada con la edad es un tanto contraintuitiva, ya que en general, el sistema inmunitario innato de los neonatos es menos desarrollado que el de los adultos (Goff y col., 2001). La resistencia relacionada con la edad no se debe únicamente a los efectos protectores de los anticuerpos maternos, ya que los terneros nacidos en regiones libres de la enfermedad, y que fueron infectados artificialmente, también son resistentes (Goff y col., 2001).

La importancia del bazo en el control de la infección fue demostrada, al observar que la esplenectomía resulta en agravamiento de la parasitemia y enfermedad clínica en animales persistentemente infectados (Wright y col., Goodger, 1988). En este órgano linfoide secundario se encuentra una importante actividad macrofagocítica, productora de IFN- $\gamma$  y ON (Mahoney y col., 1972). Además, en él se expresan y sintetizan citoquinas y otros mediadores inmunológicos claves en la respuesta inmune a *Babesia sp.* (Bock y col., 2004).

Una vez dentro del eritrocito, las células *Natural Killer* (NK), los monocitos activados y los macrófagos intervienen en la defensa contra el parásito. Las células NK, activadas por la IL-12, producen altos niveles de IFN- $\gamma$  y activa sus funciones efectoras. La producción de ON por parte de los macrófagos es activada por el FNT- $\alpha$ . Experimentos *in vitro* sugieren que el óxido nítrico reduce la viabilidad de *B. bovis* (Schneider y col., 2011).

### 13.2 Respuesta inmune adaptativa

Los parásitos del género *Babesia* son únicos entre los apicomplejos porque la mayoría de las especies invade y replica únicamente dentro de los eritrocitos, mientras que los parásitos relacionados del género *Plasmodium* y *Theileria* adicionalmente afectan células nucleadas. Por lo

tanto, la respuesta inmune adaptativa contra la infección depende de la presentación de antígenos del parásito a linfocitos T CD4+, que serán presentados solamente por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Brown, 2001).

Como se mencionó anteriormente, el control de la infección a nivel celular está mediado por la destrucción de eritrocitos infectados por macrófagos esplénicos activados (Brown y Palmer, 1999; Brown, 2001) y a nivel humoral por anticuerpos neutralizantes dirigidos contra merozoitos extracelulares y los antígenos variables de superficie del merozoíto, definidos como VESA1 (Allred y col., 1993). Ambos mecanismos inmunitarios dependen de las células T CD4+.

Cuando los merozoítos se encuentran libres en el torrente sanguíneo, las inmunoglobulinas de tipo IgG juegan un rol fundamental en esta etapa temprana de la infección. Además de activar los macrófagos para la eliminación de eritrocitos infectados, el IFN- $\gamma$  aumenta la producción de los anticuerpos IgG2 neutralizantes (Estes y Brown, 2006). Además, los anticuerpos cumplen la función de opsoninas al actuar como marcadores para la fagocitosis. Como consecuencia de la infección con *B. bovis*, se forman complejos inmunes con antígenos del parásito, inmunoglobulinas (Ig) y la proteína C3 del sistema del complemento bovino. Las inmunoglobulinas principales de los complejos pertenecen al tipo IgM y a los isotipos IgG1 e IgG2, estos últimos en bajas concentraciones. Los isotipos bovinos IgG1 e IgG2 son capaces de fijar el complemento y el isotipo IgG2 tiene además mayor capacidad opsonizante (McGuirey col., 1979).

Comprender los mecanismos de resistencia a la infección aguda por *B. bovis* en animales jóvenes (inmunidad innata) y de controlar la parasitemia en el ganado adulto que sobrevive a la infección (inmunidad adaptativa), es de vital importancia para el diseño de estrategias para inducir una respuesta inmune protectora por vacunación.

Varias revisiones bibliográficas han descrito el modelo de mecanismos inmunes protectores para *B. bovis* (Goff y col., 1998; Brown y Palmer, 1999). Según estos modelos, la resolución de un cuadro agudo infección en animales inmunológicamente *naive* infectados con *B. bovis* depende de una respuesta inmunitaria innata inicial en el bazo, lo suficientemente fuerte para llevar a la activación de macrófagos a través de la secreción de IFN- $\gamma$  lo que resulta en la muerte de los organismos por fagocitosis y producción de metabolitos tóxicos como el ON. En animales persistentemente infectados que tienen parasitemia controlada, o en animales inmunizados, las células T colaboradoras específicas son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa a través de la producción de IFN- $\gamma$ , y proporcionan ayuda para la generación de anticuerpos protectores (Figura 13).

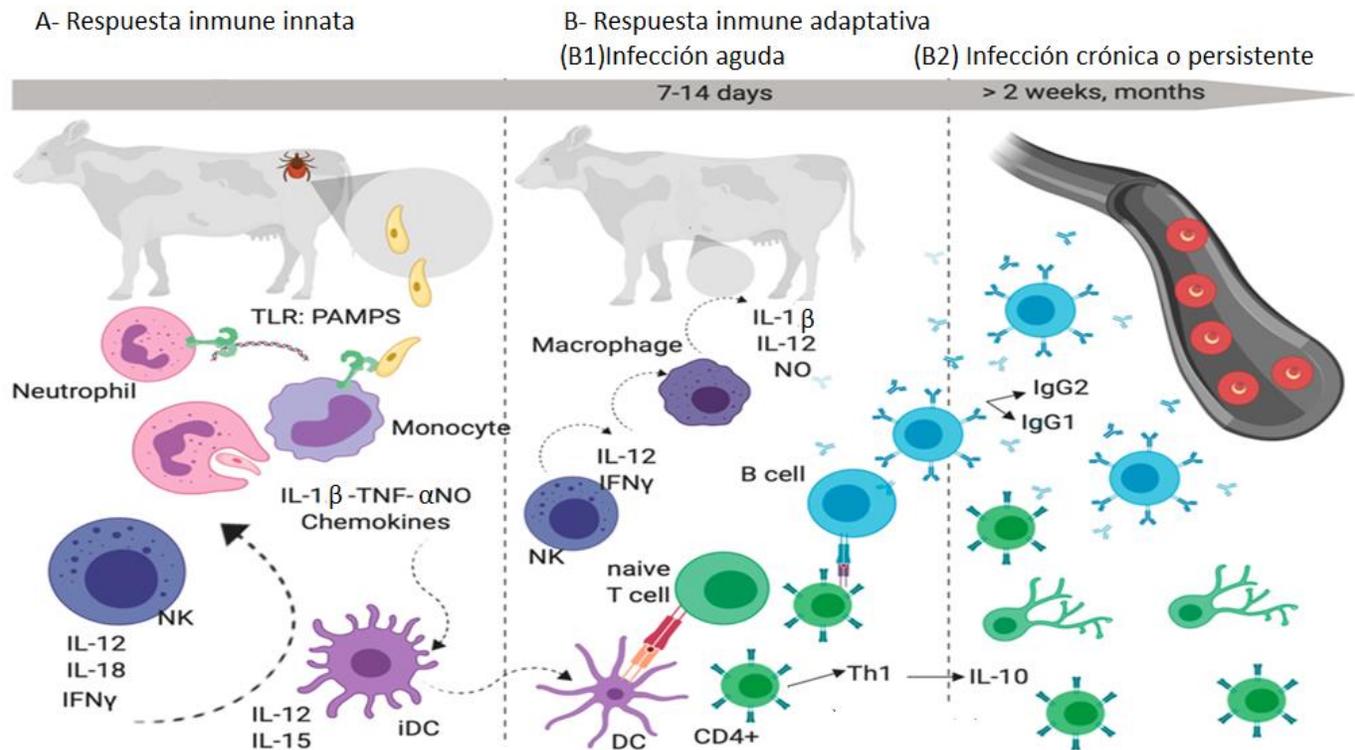


Figura 13: Mecanismos de respuesta inmune innata (A) y adaptativa (B) frente a *Babesia* sp. (Gallego-Lopez y col., 2019). Infección aguda (B1). Infección crónica o persistente (B2).

## 14-Vacunación

Los animales que se recuperan de una infección natural por *Babesia* sp. permanecen persistentemente infectados y son resistentes al desarrollo de sintomatología clínica frente a infecciones posteriores. Esto indica que son capaces de lograr un estado de inmunidad protectora a través de la vacunación, aun utilizando cepas distintas a las encontradas en las infecciones naturales. Actualmente existen vacunas atenuadas que son producidas para ambas especies de *Babesia* en cultivo *in vitro* o a través de 6 a 8 pasajes sucesivos en terneros esplenectomizados ya que se ha comprobado que el pasaje rápido por terneros con estas características induce un proceso de selección de subpoblaciones atenuadas en el parásito (Callow, 1979). Estas vacunas atenuadas son altamente efectivas porque una sola dosis provee protección durante la vida útil del bovino (Ristic y col., 1998).

Los mecanismos de atenuación del parásito fueron estudiados en la cepa *B. bovis* S2P y en la cepa atenuada R1A (obtenidas en Salta y Santa Fe, Argentina, respectivamente) (Baravalle y col., 2011). En este trabajo se postuló como mecanismo de atenuación la selección de subpoblaciones menos

virulentas que permanecen en la circulación y que son la fuente de infección del siguiente pasaje. A lo largo de los distintos pasajes, las subpoblaciones atenuadas aumentan su proporción en la población general de parásitos ya que las subpoblaciones más virulentas presentan una adherencia aumentada a los capilares sanguíneos. Esta adhesión selectiva al endotelio de los capilares de las subpoblaciones virulentas parece ser mediada por los antígenos VESA1, que están expresados en la superficie del glóbulo rojo. Probablemente estas moléculas se encuentren formando parte de las estructuras similares a crestas que se generan en la superficie del glóbulo rojo infectado y que resultan en la adhesión y acumulación de los eritrocitos infectados en la microvasculatura (Suarez y col., 2019).

Otros estudios comparativos realizados en las cepas de *B. bovis* T2B (Texas, EE. UU), E61 (North Queensland, Australia) y L17 (Salta, Argentina) en sus versiones virulentas y atenuadas por pasajes (Lau y col., 2011), no se encontraron factores comunes a nivel genético entre los 3 pares de cepas analizadas. Sin embargo, el pool génico de las poblaciones virulentas era significativamente más diverso que en sus contrapartes atenuadas. Los autores de este trabajo postulan que la diversidad global de los genes es un resultado tanto de la diversidad en una familia de genes variantes de multicopias (Ej. *ves1*), así como de genes múltiples de una sola copia. Así, mientras no se encontraron genes comunes consistentemente asociados con la atenuación o virulencia en estos pares de cepas relacionadas, los autores postularon que el fenotipo similar de los 3 derivados atenuados en animales infectados podría ser el resultado de la contracción de genes asociados a la virulencia durante el pasaje de parásitos en el hospedero natural. Otra hipótesis de los mismos autores plantea que los mecanismos de virulencia también pueden estar asociados con diferencias en el nivel transcripcional o proteico, incluido el repertorio *ves* (genes para la evasión de la respuesta inmune) o variaciones en regiones intergénicas o intrónicas.

En nuestro país, las vacunas contra la babesiosis bovina se producen en las - EEA - del INTA de Mercedes (Corrientes) y de Rafaela (Santa Fe). Estas vacunas – aprobadas por el SENASA – resultan en un formulado de eritrocitos infectados con cepas atenuadas de *B. bovis*, *B. bigemina* ( $10^7$  eritrocitos infectados) al que se le suma  $10^7$  eritrocitos infectados con *A. centrale* (subespecie que confiere inmunidad cruzada contra *A. marginale*) y solución salina balanceada en cantidad suficiente para 3 mL, administrándose 3 mL/animal en forma subcutánea o intramuscular. Este formulado, conocido como vacuna trivalente contra la Tristeza, contiene entonces la dosis necesaria para la protección contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. En el INTA de Rafaela, las cepas atenuadas de *Babesia* se propagan en forma *in vitro* a través de cultivo de eritrocitos de bovino, en el INTA de

Mercedes, la propagación ocurre por pasajes *in vivo* en terneros esplenectomizados. La otra vacuna disponible, que utiliza los mismos microorganismos atenuados de la vacuna de INTA Rafaela, es producida por la empresa privada “Litoral Biológicos S.R.L” bajo la marca comercial “BioJaJa”. Dicha empresa tomó la vacuna trivalente producida por el INTA y la formuló de manera tal que pudo ser congelada en pajuelas y almacenada en termos de nitrógeno líquido. La producción de esta vacuna en forma ultracongelada permite extender los plazos de vencimiento del antígeno, acumular *stock* y facilitar su distribución y conservación en zonas remotas.

Al igual que lo que frecuentemente ocurre con otras vacunas basadas en organismos vivos, la multiplicación parasitaria de *Babesia sp.* produce en los bovinos jóvenes una reacción post vacunal leve que generalmente cursa sin manifestaciones clínicas. La vacuna viva está indicada para uso exclusivo en bovinos de 4 a 10 meses de edad clínicamente sanos y en buen estado nutricional, ya que en animales adultos pueden llegar a producirse reacciones post-vacunación graves e incluso la muerte si no se controlan adecuadamente (Anziani y col., 2003). La vacunación con cepas vivas atenuadas es altamente efectiva para inducir una respuesta inmune que confiera protección al bovino durante toda su vida útil (Bock y col., 2004). La vacunación le propicia al animal una inmunidad contra la babesiosis que perdura como mínimo 4 años (máximo período evaluado) y contra la anaplasmosis, toda la vida. Sin embargo, se presentan una serie de dificultades y desventajas que limitan su uso. Un inconveniente serio es el riesgo de que estas vacunas transmitan otros microorganismos patógenos originados en los bovinos dadores (Bock y col., 1992; de Vos y col., 1995). También existe el riesgo de reversión de las cepas atenuadas a cepas patógenas (Timms y col., 1990) aunque en Argentina no se han reportado hasta la fecha estos eventos. Otra limitación no menor es la necesidad de mantener la cadena de frío y, aun así, la vacuna debe administrarse en un lapso no menor a 7 días desde la fecha de formulación. En el caso de la vacuna BioJaJa, si bien se logra extender los plazos de vida media, sigue siendo fundamental el mantenimiento de una cadena de frío y su consecuente logística. Otra desventaja que se suma a esta producción es la necesidad de formular estas vacunas con el triple de eritrocitos infectados, dado que el congelado y descongelado de las pajuelas provoca la disminución de la viabilidad de los parásitos.

Por estas razones, existe la necesidad de producir nuevas vacunas efectivas capaces de inducir una respuesta protectora de igual o mejor nivel que la obtenida con parásitos vivos, pero sin sus inconvenientes.

## 15-Búsqueda de nuevos candidatos vacunales

El cultivo *in vitro* de *Babesia sp.* y las herramientas de biología molecular e ingeniería genética han facilitado considerablemente el estudio de las interacciones hospedero - parásito y permitido la caracterización de tales antígenos.

Hasta la fecha, se han caracterizado varios antígenos del parásito. En particular, cuatro grupos de antígenos del género *Babesia* se han caracterizado y probado su potencial inmunoprotector: 1) los presentes en la superficie de eritrocitos infectados; 2) los presentes en la superficie de los merozoitos; 3) los presentes en las organelas del complejo apical; y 4) los excretados-secretados en el sobrenadante de cultivo *in vitro*.

En otros apicomplejos transmitidos por garrapatas como *Theileria parva* y *B. divergens*, se ha obtenido cierto grado de protección utilizando vacunas recombinantes. En el caso de *T. parva* la misma estuvo basada en la proteína de superficie del esporozoíto p67, obteniendo una protección del 47 al 52% en bovinos (Musoke y col., 2005, Hadj-Kaddoury col., 2007). Sin embargo, se han obtenido resultados infructuosos con vacunaciones utilizando solamente proteínas recombinantes para *B. bovis* (Hope y col., 2005; Norimine y col., 2003).

Nuestro grupo de trabajo sentó antecedentes sobre el primer reporte sobre vacunas virales de nueva generación, basadas en vectores virales no replicativos como el Vaccinia Ankara Modificado (MVA), aplicados al control de la babesiosis bovina causada por *B. bovis* (Jaramillo Ortiz y col., 2014, 2016, 2019). En este ensayo se evaluó una vacuna a subunidad y un vector MVA, ambos conteniendo un multiantígeno de 3 proteínas (MSA-2C, RAP-1 y HSP20) utilizando en un esquema prime- boost. A pesar de haber obtenido una respuesta inmune adecuada tanto celular CD4+ IFN- $\gamma$ + como humoral en bovinos, con alto títulos de anticuerpos, ésta no resultó protectora. La ausencia de anticuerpos neutralizantes fue el único correlato diferencial entre los individuos protegidos por la vacuna viva y los no protegidos del esquema recombinante.

En base a la experiencia de nuestro grupo y de otros con vacunas basadas en proteínas recombinantes que no resultaron protectoras, y que en general los vectores virales utilizados por nosotros tienen una capacidad máxima de inserto a incorporar, consideramos que una estrategia racional para incorporar más de un antígeno o epítipo parasitario sería utilizar una vacuna que contenga a varios de ellos, sean inmunodominantes o no pero expresados en sistemas capaces de inducir una respuesta efectora y de memoria de tipo B y T ya que se ha demostrado que ambos tipos de respuestas son necesarias para conferir protección en los bovinos (Brown y col., 1999).

### 15.1- Predicción de epitopes

A pesar de que se reportan frecuentemente numerosos trabajos acerca de la identificación de nuevos antígenos candidatos para vacunas en *Babesia*, la caracterización detallada de sus epitopes es un paso indispensable para el diseño de vacunas conteniendo estos fragmentos antigénicos.

En el caso de los epitopes B, su predicción no requiere tener en cuenta las características del hospedador y pueden utilizarse estrategias bioinformáticas que tienen en cuenta variables fisicoquímicas de la estructura molecular de las proteínas antigénicas y la información recopilada en las bases de datos sobre antígenos relacionados. Estas predicciones necesitan luego ser validadas de manera experimental utilizando un modelo biológico adecuado, pero no requieren tener en cuenta la variación individual del huésped y por ello son más sencillas de realizar. Existen distintos programas disponibles vía web donde se pueden realizar estos análisis (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>).

En el caso de la respuesta tipo T, dado que *Babesia sp.* es un parásito estrictamente intracelular que infecta eritrocitos carentes de antígenos de histocompatibilidad, los antígenos parasitarios son presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) bovino de tipo II cuando los eritrocitos infectados son reconocidos por células presentadoras de antígeno (CPA). Como mencionamos anteriormente, el perfil de la respuesta T generada en los bovinos infectados con *Babesia* es de tipo Th1 con producción de IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (FNT- $\alpha$ ) como citoquinas principales. Estas citoquinas median el control de la infección favoreciendo la destrucción de los eritrocitos infectados por parte de los macrófagos esplénicos activados, y por anticuerpos neutralizantes de tipo IgG2 dirigidos contra los merozoítos y contra antígenos de superficie variable del eritrocito, definidos como VESA1 (Brown y col., 2006).

Muchos complejos péptido T-CMH están expuestos en la superficie de las células presentadoras de antígeno, pero únicamente los péptidos reconocidos por los receptores de células T desencadenarán una respuesta inmune y son referidos como verdaderos epitopes de dichas células. La colección de todos estos péptidos se define como inmunopeptidoma y su conocimiento es de gran importancia para la ciencia básica y translacional. Para la ciencia básica, el inmunopeptidoma es un componente crítico para entender los mecanismos de procesamiento de antígenos por parte de la maquinaria intracelular, la estructura y diversidad de los CMH y los procesos de señalización con los linfocitos T. Para la ciencia translacional, es de gran interés por un gran número de razones prácticas, incluyendo el conocimiento de la etiología de enfermedades, el monitoreo inmune, el

desarrollo de ensayos de diagnóstico, inmunoterapias y diseño de vacunas de nueva generación basadas en epítopes sobre todo para enfermedades infecciosas y neoplásicas.

## 16-Complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) está codificado por una familia de genes que tiene un papel esencial en el sistema inmune adaptativo y comprende las glicoproteínas de la superficie celular requeridas por los linfocitos T para detectar péptidos antigénicos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (Bohórquez y col., 2020).

Como regla general, las moléculas de clase I presentan péptidos de proteínas producidas por la propia célula, mientras que las moléculas de clase II presentan péptidos de proteínas que están presentes en el entorno extracelular y que son endocitadas por la célula (Figura 14). Las moléculas de CMH de clase I se expresan de forma ubicua, mientras que las moléculas de CMH de clase II se expresan solamente en células presentadoras de antígeno (CPA) especializadas, como células dendríticas, células B y macrófagos (Jongsma y col., 2019).

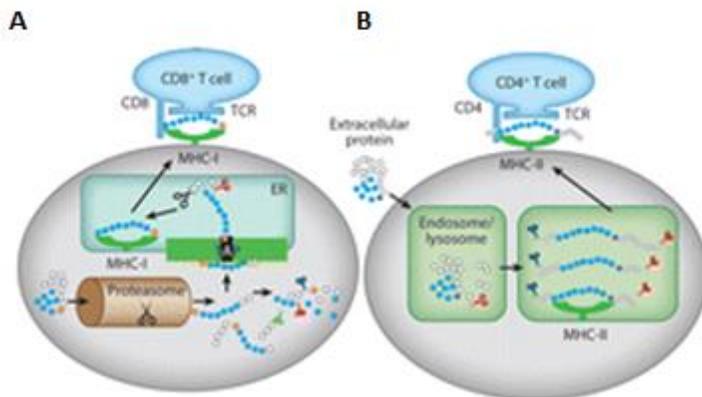


Figura 14. Principales mecanismos celulares involucrados en el procesamiento de antígenos A. Mecanismo de presentación del CMH clase I. B: Mecanismo de presentación del CMH clase II (Andreatta y Nielsen, 2018).

El papel de las moléculas CMH en la inmunidad adaptativa ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento en 1936 (Klein, 1994). El CMH presenta péptidos a las células T que conducen al inicio de una respuesta inmune adaptativa en muchas condiciones patológicas, como autoinmunidad, cáncer y durante infecciones. Las moléculas CMH de clase I presentan péptidos para ser reconocidos por el receptor de células T de las células T citotóxicas, por su parte, las moléculas CMH de clase II muestran péptidos a las células T CD4+ (Neefjes y col., 2011).

Debido a que la estructura del CMH clase I y II son muy distintas, las propiedades y el tamaño de los péptidos que se pueden unir a las mismas son también diferentes. El bolsillo de unión del CMH clase I es cerrado en ambos extremos y puede acomodar solo péptidos entre 8 y 11 aminoácidos. En cambio, el bolsillo de unión del CMH clase II está abierto en los extremos, por lo que el largo de los péptidos a unirse no es una limitación, y típicamente puede unirse a péptidos de 11 a 20 aminoácidos de longitud. Otros factores que determinan la afinidad de unión al CMH incluyen estabilidad de unión, procesamiento del péptido y abundancia de la proteína (Figura 15; Andreatta y Nielsen, 2018).

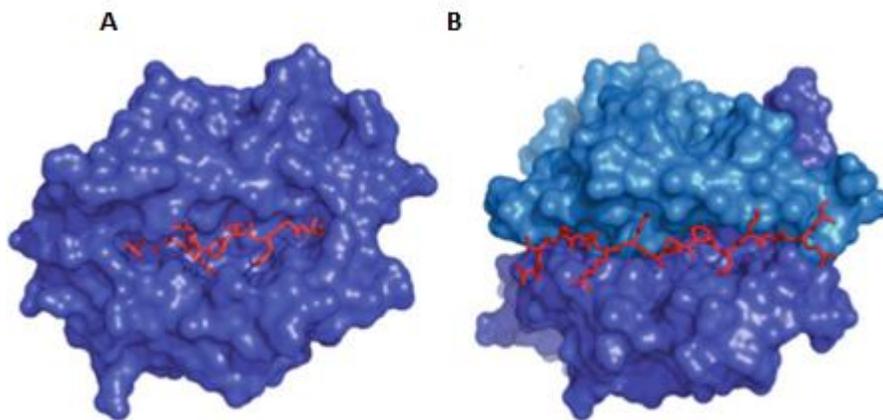


Figura 15: Estructura de las moléculas del CMH (azul) unidos a su péptido (rojo). A: CMH clase I B: - CMH clase II (Andreatta y Nielsen, 2018).

#### 16.1- Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (BoLA)

El CMH bovino, llamado antígeno leucocitario bovino (BoLA), está codificado en el cromosoma 23 y consta de tres clases de genes, I, II y III. Existen más de 3 loci polimórficos clase I (Ellis y col., 1999, 2011).

En bovinos, los genes BoLA de clase II se distribuyen en dos regiones distintas, IIa y IIb. Los genes *DRA*, *DRB*, *DQA* y *DQB* se encuentran en la región IIa, mientras que los genes *DOB*, *DYA*, *DYB* y *DIB* se encuentran en la región IIb (Davies y col., 1994). Las moléculas DR y DQ constituyen los principales elementos de restricción de clase II ya que codifican proteínas que presentarán los péptidos a las células T CD4+ (Glass y col., 2000). Entre los genes codificantes para las moléculas DRB, el único gen conocido como funcional es el gen BoLA-*DRB3* (Behl y col., 2012; Bohórquez y col., 2020) y es el locus de clase II más polimórfico (Figura 16).

En el bovino, se identificaron hasta la fecha 365 alelos *BoLA-DRB3* en distintas razas de origen diverso y están catalogados en la base de datos de polimorfismo inmunológico (IPD) – CMH (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/CMH/allele/list/grupo=BoLA>). Aunque resulta aparentemente alto, este número de alelos abarca solo 12 de más de las 800 razas de ganado identificadas a nivel mundial (Takeshima y col., 2018). En gran medida, las razas estudiadas incluyen razas taurinas de Europa y Asia, criollas americanas y razas originadas por cruza (Takeshima y col., 2018).

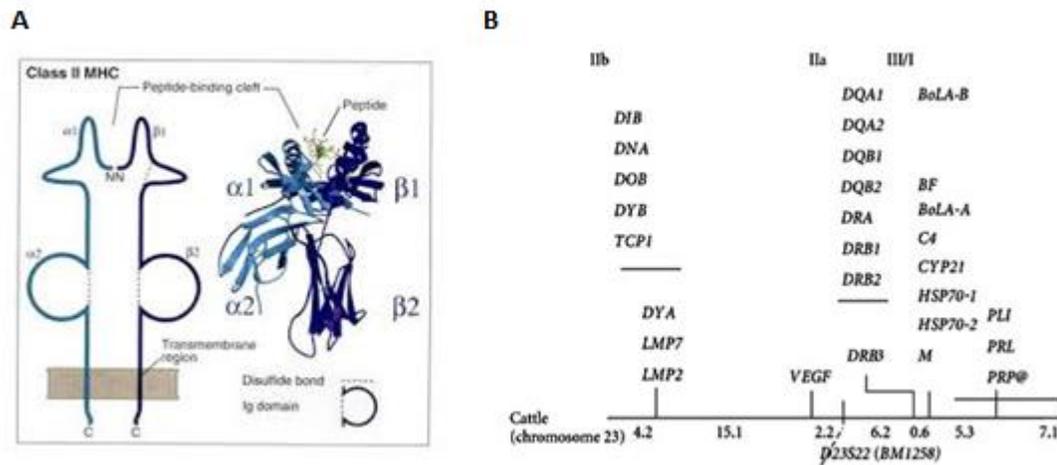


Figura 16: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II bovino. A- Estructura 3D de la proteína B- Mapa de ligamiento genético de la región del *BoLA* (Behl y col., 2012).

Diversos estudios han encontrado que las variaciones en la resistencia o susceptibilidad a diferentes enfermedades (por ejemplo, dermatofitosis y mastitis bovina), rasgos de producción (por ejemplo, producción de leche) y respuestas a las vacunas (por ejemplo, fiebre aftosa e infección por *Theileria parva*) (Dietz y col., 1997; Baxter y col., 2008; Takeshima y col., 2008; Maccari y col., 2018) se asociaron con polimorfismos *BoLA-DRB3*. Existe evidencia de que en los mamíferos el polimorfismo CMH se mantiene por alguna forma de sobredominancia o selección equilibrada (Hedrick, 1998; Duangjinda y col., 2013). El polimorfismo de los genes *BoLA-DRB3* ocurre predominantemente en los residuos dentro de una región denominada surco de unión al péptido o “peptide binding región” (PBR) (Figura 17) (Brown y col., 1993). Este surco de unión al péptido está formado a su vez por 5 bolsillos de unión a aminoácidos.

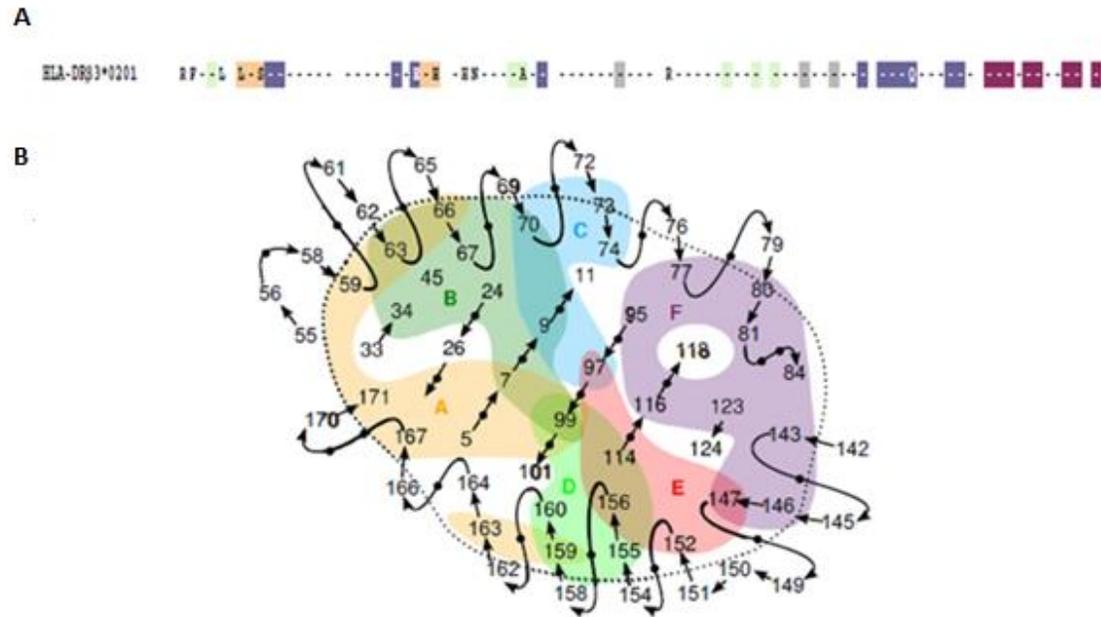


Figura 17: Detalle de la conformación espacial del surco de unión del péptido. **a** Secuencia del CMH-DRB3 de un alelo humano, coloreando las posiciones correspondientes al PBR: en fucsia, azul, ocre, gris y verde los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9, respectivamente (Suarez y col., 2006) **b** Representación esquemática del PBR. Los números representan las posiciones de los aminoácidos que conforman el CMH. Los colores representan los diferentes bolsillos (van Deutekom y col., 2015).

## 17- El estudio del inmunopeptidoma de *Babesia bovis* asociado al BoLAII

Como mencionamos anteriormente, para el caso de *Babesia* es especialmente relevante estudiar el inmunopeptidoma asociado al BoLA-II, ya que estos péptidos son los que permitirán la activación de los linfocitos colaboradores con su consecuente respuesta efectora. Los péptidos identificados podrán ser utilizados en formulaciones de vacunas multiepitópicas.

Este estudio del inmunopeptidoma puede realizarse mediante estrategias inmunoinformáticas e inmunoproteómicas. Para el primer caso, el análisis se realiza estimando la afinidad de unión del péptido antigénico al bolsillo del CMH clase II. Esta afinidad se determina teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos del llamado “core” del péptido y de sus regiones flanqueantes.

Existen varios factores que dificultan la predicción de afinidad “*in silico*” de unión de péptidos a las moléculas de CMH-II, incluyendo la naturaleza polimórfica de estas moléculas, la variación en el largo de los péptidos, la influencia de regiones flanqueantes al péptido y la identificación del motivo exacto de unión a péptido. Sin embargo, se han desarrollado algoritmos que facilitan esta tarea, como es el servidor NetBoLAIIpan (Fisch y col., 2020).

Otra estrategia es realizar directamente el análisis del péptido naturalmente asociado a la infección por *B. bovis* a través de herramientas proteómicas. La información obtenida sobre estos péptidos T naturalmente presentados por las CPA infectadas puede ser también utilizada para entrenar los algoritmos inmunoinformáticos de predicción de epitopes T para mejorar sustancialmente su desempeño. Para ambas estrategias, la validación experimental de la capacidad de los péptidos T predichos o identificados de despertar una respuesta inmune específica, es un paso necesario para su confirmación como verdaderos epitopes T.

## 17.1- Inmunoinformática

### 17.1.1- Historia esencial del campo

A fines de la década de 1980, varios grupos desarrollaron enfoques que trataban de dilucidar patrones peptídicos químicos para predecir qué péptidos podrían ser epitopes T. Aunque estos enfoques no eran aplicables para grandes bases de datos, abrieron el campo para el desarrollo de nuevos enfoques estas predicciones. En retrospectiva, la idea que faltaba era que no se debía desarrollar un único predictor para el CMH clase I y II, si no que debían ser predictores independientes; y que tener en cuenta las variantes alélicas del CMH era fundamental, ya que cada alelo está asociado con una especificidad de unión diferente. Esto se hizo cada vez más claro a través de estudios que mostraron que cada variante del CMH tiene una capacidad de unión a epitopes diferente, y que la especificidad de unión de péptidos está determinada por la presencia de patrones de aminoácidos específicos.

Los estudios sistemáticos experimentales revelaron que mientras ciertas posiciones en el péptido podrían sustituirse con casi cualquier aminoácido, otras posiciones solo tolerarían sustituciones limitadas con aminoácidos estrechamente relacionados. Estas posiciones se denominaron residuos de anclaje principal de los epitopes. Por evidencia experimental se demostró además que estos residuos de anclaje se encontraron con una separación similar en diferentes epitopes restringidos por el mismo CMH. Por lo tanto, estos residuos se denominaron posiciones de anclaje, y la suma de la separación y la especificidad de las posiciones de anclaje se denominó motivo de ligando al CMH. Las bases físicas de los motivos del ligando del CMH se sugirieron por primera vez en 1983 (Benoist y col., 1983) y se confirmó en 1987 cuando Wiley y sus asociados resolvieron las estructuras cristalinas de CMH humano A2 primero (Bjorkman y col., 1987) y DR1 poco después (Brown y col., 1993). Se encontró que las moléculas del CMH en estas estructuras tenían bolsillos característicos que explicaban el espaciado y la especificidad de los residuos de los motivos del ligando del CMH.

La definición y el refinamiento de los aminoácidos que componen los motivos CMH recibieron un impulso significativo a través de la llegada de técnicas experimentales que utilizaban ácidos para eluir ligandos del CMH presentados y procesados de forma natural. El grupo de Rammensee (Falk y col., 1991) llevó esta observación un paso más allá, mediante la secuenciación por degradación de Edman de ligandos de clase I, demostrando que los péptidos eran notablemente homogéneos en tamaño y que ciertas posiciones de anclaje principales se conservaban y asociaban con una diversidad química limitada.

Por su parte, la elución de ligandos naturales de clase I proporcionó un método poderoso para definir motivos de estos que fue simple y técnicamente poderoso. Esta metodología demostró ser efectiva para CMH de clase I, pero menos para moléculas de clase II, que tienen un surco de unión de péptidos que está abierto en ambos lados, lo que hace que la secuenciación de los ligandos agrupados sea más difícil de interpretar. Para superar estas limitaciones, a comienzos de los años '90, los péptidos eluidos se separaron mediante cromatografía y los ligandos individuales se identificaron mediante enfoques de espectrometría de masas (Hunt y col., 1992; Henderson y col., 1993), lo que dio como resultado la identificación directa de los ligandos peptídicos presentes en las células, una técnica que se ha seguido mejorando en rendimiento y sensibilidad hasta el día de hoy, proporcionando conocimientos importantes sobre los ligandos naturales de las moléculas CMH.

#### 17.1.2 Predicciones de unión al CMH

La era de las predicciones computacionales de epitopes de células T fue iniciada en 1989 por Sette y colegas (Sette y col., 1989), quienes describieron un programa de computadora que usaba motivos específicos conocidos de alelos CMH humanos para identificar posibles ligandos en una secuencia de proteínas. A partir de esto se desarrollaron varios enfoques destinados a producir una puntuación cuantitativa, relacionada con la afinidad de unión predicha o con la probabilidad de unión. Esencialmente, estos métodos se basaban en una matriz que asignaba a cada posición un valor numérico heurístico según los aminoácidos del péptido y luego los valores para cada posición se combinaban para dar un puntaje final.

Impulsado por el éxito de las predicciones heurísticas, otros grupos propusieron enfoques para el aprendizaje automático. Dichos enfoques consisten en entrenar un algoritmo con datos conocidos, como conjuntos de péptidos con afinidades de unión medidas, para generar una función que reproduce los datos de entrada y genere predicciones en datos no conocidos *a priori*. El rendimiento de los algoritmos de aprendizaje automático aumenta con la cantidad de datos disponibles para entrenarlos, lo que hace que tener una base de datos de epitopes sea un paso esencial en el

desarrollo de herramientas. Para esto se crearon bases de datos, como la base de datos IEDB (<https://www.iedb.org/>), que compilan registros de publicaciones y otras fuentes de datos en un formato consistente para hacer esta tarea mucho más fácil.

A pesar de la utilidad de los métodos heurísticos, estos métodos estaban disponibles para moléculas del CMH ya caracterizadas o de las que se posea alguna información experimental. Como alternativa surgieron los métodos de predicción llamados “pan-specific” en donde se puede predecir la unión de péptidos a moléculas del CMH aún no caracterizadas. El primer método en lograr este objetivo fue el TEPITOPEpan (Zhang y col., 2012) que puede predecir la unión de péptidos a 51 alelos del CHM humano clase II, seguido por el programa NetMHCpan (Nielsen y col., 2008) para alelos de clase I, aunque con resultados inexactos.

#### 17.1.2 Combinación de métodos predictivos con datos experimentales

La elución de los ligandos del CMH procesados y presentados de forma natural por las células presentadoras de antígenos y su identificación por espectrometría de masas ha avanzado rápidamente en los últimos años y gracias a la mayor sensibilidad y sofisticación de los equipos actuales es posible generar conjuntos de datos de forma rutinaria con miles de ligandos del CMH.

#### 17.1.3 El impacto del polimorfismo del CMH: Qué alelos considerar

Dado que diferentes alelos del CMH pueden tener especificidades de unión muy diferentes, es necesario definir qué alelos se tienen en cuenta al realizar predicciones de epitopes de células T. Es importante destacar que la respuesta a esta pregunta dependerá en gran medida de la aplicación. Si un estudio está probando epitopes candidatos que pretenden cubrir una población más amplia, es necesario cubrir una cantidad suficiente de alelos expresados por la mayoría de los individuos de esa población. Esto se puede lograr, en humanos, evaluando los péptidos por su capacidad para cubrir un panel de alelos que representan todas las moléculas CMH expresadas en una frecuencia significativa en todo el mundo. Por el contrario, si el objetivo de un estudio es definir epitopes para un individuo humano específico, los alelos CMH expresados por ese huésped deben ser el foco. Aquí es donde el valor de los enfoques de predicción “pan-specific” que pueden hacer predicciones para todos los alelos del CMH (incluidos los poco estudiados) ha mejorado enormemente la capacidad de realizar tales predicciones personalizadas. Esto es de particular importancia en el cáncer para el descubrimiento y evaluación de neoepitopes, que son inherentemente personales para un hospedadorespecífico (Peters y col., 2020).

#### 17.1.5 Limitaciones

Si bien se ha avanzado mucho en el desarrollo de predicciones de epítopes de células T, aún quedan varios desafíos. Es necesario reevaluar el rendimiento de todos los algoritmos para determinar la capacidad de identificar epítopes de células T en conjuntos de datos a gran escala. Esto permitirá recomendaciones claras sobre qué métodos y umbrales usar para las predicciones en la práctica.

#### 17.1.6 Programas de predicción para BoLA

Hasta el año 2020, los programas para estas predicciones estaban entrenados con información de humanos (Zhang y col., 2012, Nielsen y col., 2008), por lo que su aplicación en bovinos no era lo suficientemente exacta para utilizarlos. En diciembre del 2020, se publicó el primer programa para predecir péptidos asociados al CMH-II bovino, el NetBoLAllpan, basado en el uso de datos experimentales combinados con los métodos “pan-specific” (Fisch y col., 2020). Si bien teóricamente se pueden predecir péptidos para todos los alelos bovinos *DRB3* (predicciones “pan-specific”) las predicciones sólo están validadas experimentalmente para 7 alelos.

### 17.2 Inmunopeptidómica

#### 17.2.1- Historia esencial del campo

El estudio de las características químicas de los ligandos peptídicos presentados por las moléculas del CMH, sus fuentes y su generación, comenzó principios de la de 1980, cuando Nathenson y sus colegas idearon formas de escindir las moléculas CMH-I de las superficies celulares y adaptaron un método radioquímico que, junto con la degradación de Edman, permitió revelar la primera estructura primaria de una molécula CMH humana (Nathenson y col., 1981). A partir de ese momento aumentó el interés en los conocimientos en el campo, logrando dilucidar la estructura tridimensional de una molécula CMH-I humana (Fremont., 1992). Esto permitió revelar que el CMH era un receptor para péptidos procesados con un sitio de unión único (Matsumura y col.1992). A partir de este descubrimiento surgió la pregunta de qué tipo de péptidos se unen a este sitio de unión identificado. Utilizando el espectrómetro de masas se logró la determinación directa de la secuencia de aminoácidos de péptidos individuales eluidos del CMH (Sette y col., 1992; Hunt y col., 1992). Desde entonces y con los sucesivos avances en las tecnologías y plataformas de espectrómetros de masas y proteómica, se logró dilucidar directamente las secuencias de aminoácidos de los péptidos antigénicos (Gilchuk y col., 2013; McMurtrey y col., 2016; Kubiniok y col., 2020). Lo que mejoró es la instrumentación y sensibilidad de las mediciones, las cuales

permitieron el análisis de miles de péptidos utilizando esta técnica. A partir del conjunto de datos obtenido, surgieron conocimientos profundos sobre los mecanismos fundamentales de presentación de antígenos y cómo esto puede ser modificado por diversos agentes ambientales o infecciosos. La maduración de la inmunopeptidómica también facilitó la identificación de epitopes de células T en una variedad de enfermedades que incluyen autoinmunidad (Wan y col., 2020), cáncer (Khodadoust y col, 2017; Alspach y col., 2019) y enfermedades infecciosas (Bettencourt y col., 2020). Además, permitió la enumeración de epitopes específicos con gran precisión y exactitud. No obstante, la naturaleza de los antígenos peptídicos procesados naturalmente y derivados de numerosos patógenos reemergentes y emergentes, por ejemplo, Dengue, Marburg, Ebola, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, aún permanece desconocida. Este conocimiento es un requisito previo poder inducir la inmunidad protectora mediada por células T en ensayos de vacunas (Joyce y Ternette, 2021).

#### 17.2.2- Diferencia de la inmunopeptidómica con la proteómica tradicional

A diferencia de los flujos de trabajo proteómicos estándar, en los que los péptidos se identifican mediante espectrometría de masas a partir de la digestión de proteínas por enzimas, los estudios de inmunopeptidómica son considerablemente más desafiantes por varias razones.

En primer lugar, el mecanismo proteolítico preciso para generar el complejo péptido-CMH maduro es desconocido y muy complejo ya que muchas proteasas y peptidasas podrían participar en la liberación del mismo. En segundo lugar, los péptidos que se unen a las moléculas CMH son más similares entre sí en términos de longitud y conservación de la secuencia que el material proveniente de una proteína digerida con enzimas. Finalmente, la abundancia relativamente baja de péptidos unidos al CMH dificulta su detección, en comparación con una proteína. Por estos motivos, históricamente la identificación de péptidos unidos a CMH ha sido desarrollada sólo en pocos laboratorios especializados. Sin embargo, en los últimos 10 años se han desarrollado mejoras en la eficiencia del aislamiento de péptidos asociados al CMH y, como fue mencionado en la sección anterior, ha habido rápidos desarrollos tecnológicos en instrumentación, trayendo mayor sensibilidad, mayor poder de resolución y ciclos de adquisición y trabajo mucho más rápidos, además de que se introdujo una mejora significativa de la velocidad computacional y en la precisión de los algoritmos para procesar la información proveniente del espectrómetro de masas. Sin embargo, sigue siendo recomendado enfáticamente, a diferencia de la proteómica convencional, que un profesional experimentado en inmunopeptidómica se involucre en las primeras etapas del diseño experimental. Muchas instalaciones centrales no están equipadas para hacer un análisis

personalizado y, usualmente, al ser las mediciones de la inmunopeptidómica tan sensibles, se dificultan por la contaminación con otras muestras proteómicas más típicas como los digeridos tripticos, en los cuáles los péptidos pueden estar presentes en concentraciones varios miles de veces más altas. Por lo tanto, se debe tener mucho cuidado para asegurarse de que los componentes de la HPLC y del espectrómetro de masas estén libres de cualquier arrastre de material residual y que el instrumento está funcionando a su máxima sensibilidad absoluta.

### 17.2.3- Limitaciones

El análisis bioquímico directo de los péptidos unidos a CMH, si bien proporciona una medición imparcial de la naturaleza de la carga peptídica de estas moléculas, todavía tiene limitaciones. En primer lugar, la profundidad de la cobertura está restringida por la cantidad de material disponible para el análisis. Es necesario como mínimo  $1 \times 10^8$  células para realizar un análisis, lo cual, dependiendo del material a utilizar, no siempre es factible. Además, se han observado limitaciones en la detección debido a propiedades químicas del péptido. Finalmente, los anticuerpos adecuados no siempre están disponibles para algunos alelos del CHM o de diferentes especies a la humana o murina.

### 17.2.4- Desarrollo del protocolo

Existen varios enfoques para aislar péptidos unidos a CMH de líneas celulares y tejidos. El enfoque más simple, pero menos específico, consiste en utilizar un tampón ácido directamente sobre las superficies de las células en cultivo para eluir los péptidos unidos al CMH directamente. Esto da como resultado niveles muy altos de contaminación que pueden impedir el análisis del inmunopeptidoma en profundidad. Otro enfoque implica modificar las células mediante ingeniería para que secreten una molécula del CMH soluble de interés. Este enfoque tiene como ventaja que puede producir grandes cantidades de complejos CMH-péptido que se pueden purificar fácilmente del medio para su posterior análisis. Como desventaja, requiere la manipulación de la línea celular y la selección de transfectantes estables que expresan la molécula CMH soluble de interés. Además, este enfoque no es factible de utilizar para analizar péptidos de muestras clínicas o tejidos. Otro enfoque consiste en purificar complejos de CMH-péptido aislados de lisados de líneas celulares o tejidos. El mismo implica la inmunoprecipitación de complejos CMH- péptido y la posterior disociación del péptido unido utilizando un filtro de separación por peso molecular (MWCO). Esta separación por filtro conlleva inevitablemente la pérdida de péptidos y puede conducir a la contaminación con polímeros. Este enfoque fue mejorado recientemente en el laboratorio de la

Dra. Ternette (Universidad de Oxford; Purcell y col, 2019), eliminando el paso de separación por filtro de MWCO y reemplazándolo por el uso de HPLC de fase inversa para separar los péptidos del CHM al que están unidos. Esta mejora de la técnica aumenta el rendimiento de identificación de péptidos hasta diez veces (Figura 18).

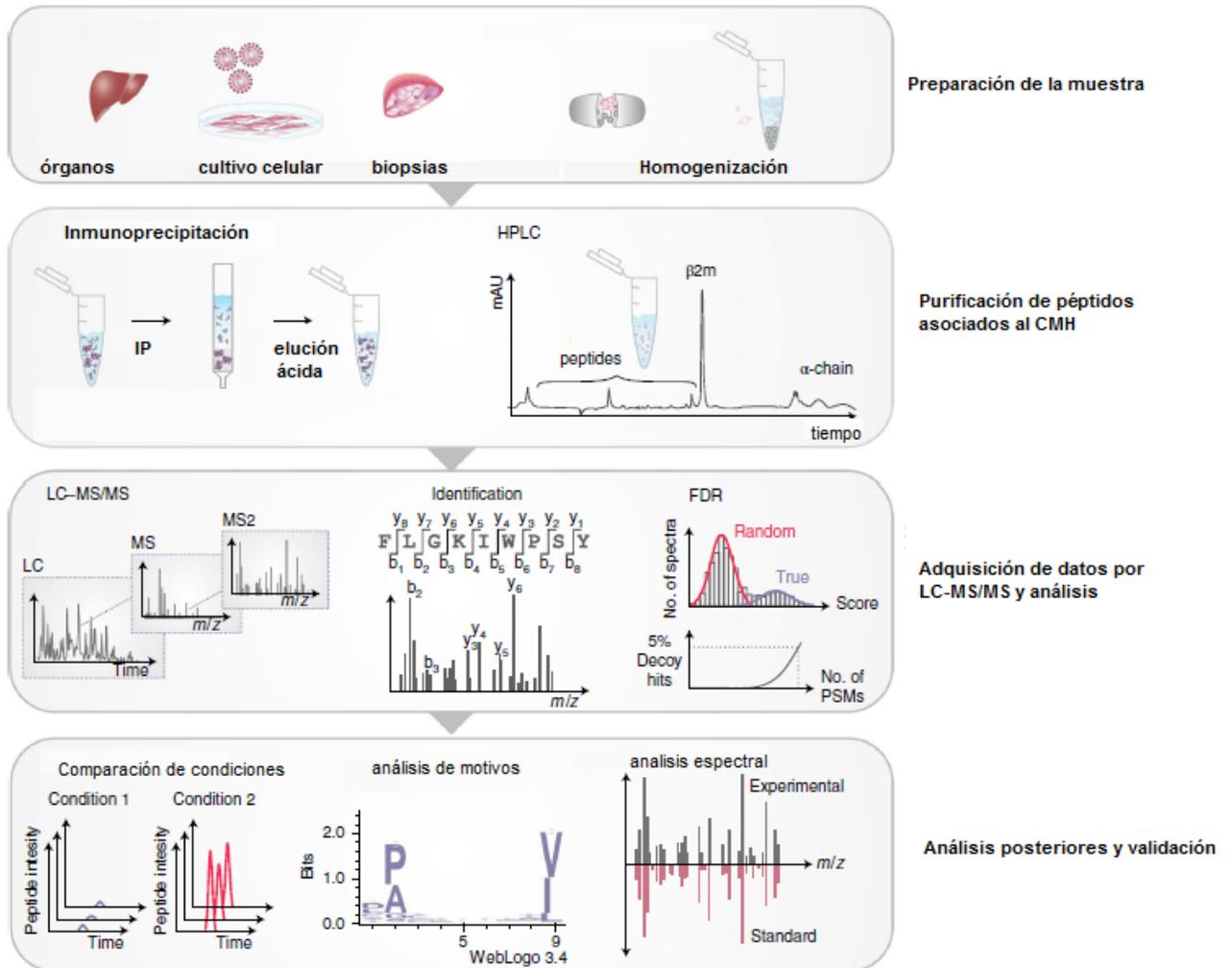


Figura 18: Flujo de trabajo para purificación de péptidos T asociados al CMH, identificación y validación. Adaptado de Purcell y col, 2019.

En este trabajo se decidió utilizar este último enfoque, ya que consideramos que el flujo de trabajo es factible de realizar en nuestro laboratorio, y que es el método disponible más sensible para identificar péptidos que permite obtener la menor contaminación posible.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo general

Identificar de manera racional los epitopes T de *Babesia bovis* mediante análisis inmunoinformáticos e inmunoproteómicos para su inclusión en candidatos vacunales multiepitópicos.

### Objetivos específicos

- 1- Identificar los alelos del gen *DRB3.2* más frecuentemente representados en las razas de bovinos de una zona con alta prevalencia de babesiosis.
- 2- Predecir e identificar los epitopes T de *Babesia bovis* mediante análisis inmunoproteómicos e inmunoinformáticos utilizando la información obtenida en el O.E. 1.
- 3- Validar experimentalmente los péptidos predichos por ambas estrategias utilizando células de bovinos naturalmente infectados con *Babesia bovis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1- Bovinos

Se utilizaron bovinos hembra menores a un año del campo experimental de INTA Castelar de las razas Hereford x Aberdeen Angus y Aberdeen Angus. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CICUAE-INTA; protocolo número 35/2021).

### 2- Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los productos de amplificación por PCR, se utilizaron geles de agarosa en concentración 1-1.5%. Las electroforesis se realizaron en buffer TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a temperatura ambiente y a un voltaje de 5 – 8 V/cm. Para visualizar las bandas de ADN, se adicionó una solución de 0,5 ug/mL de Bromuro de Etidio para la tinción de los geles. Para sembrar las muestras, se utilizó el buffer de siembra en concentración 10X (glicerol 50%, TAE 5X, azul de bromofenol 1%). Los fragmentos amplificados se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizaron y fotografiaron utilizando el equipo GelDoc (BioRad) y el software *QuantityOne 1-D Analysis Software* (versión 4.6.3) provisto por el fabricante.

### 3- Tipificación de *BoLA-DRB3.2*

#### 3.1 Extracción de ADN genómico bovino

Se obtuvo sangre total por venopunción usando EDTA 1% (1mg/mL sangre) como anticoagulante. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial ADN Puriprep S kit (Inbio Highway) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. En todos los casos, la cantidad y calidad del ADN se determinó midiendo su absorción UV a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (ThermoScientific). La calidad de la purificación se determinó midiendo las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. El ADN purificado se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

#### 3.2 Reacciones de PCR

Se utilizaron los *primers* HLO30 y HLO32 detallados en la Tabla 1.

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para tipificar el gen BoLA- *DRB3.2*

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Tm	Tamaño del amplicón	Referencia
HLO30	ATCCTCTCTCTGCAGCAATTTCC	60°C	247 pb	Miltiadou et al., 2003
HLO32	TCGCCGCTGCCAGTGAAACTCTC			

La mezcla utilizada y las condiciones de ciclado fueron:

ADN genómico	6 ng
Primer F	0,3 mM
Primer R	0,3 mM
dNTPs	0,2 mM
Taq Pol.	0,75 U
Buffer 5X	0,03 X
Agua ddcsp	15 ul

Desnaturalización inicial	94°C	3 min	35 ciclos
Desnaturalización	94°C	20 seg	
Hibridización	60°C	20 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	

Los fragmentos amplificados de 247 pb. correspondientes al exón 2 del gen BoLA-*DRB3* fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%.

### 3.3 Secuenciación capilar

Los fragmentos se secuenciaron mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) utilizando la química BigDye® siguiendo el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se realizaron en ambas cadenas en una mezcla de reacción de 10uL que contenía una dilución 1:10 del producto de PCR como molde, 0,1 mM de cada uno de los cebadores correspondientes (los mismos que se usan en las reacciones de PCR), la mezcla de amplificación y buffer 5X del kit BigDye® Terminator.

### 3.4 Análisis de secuencias y determinación de haplotipos

Los análisis de secuencias obtenidas por secuenciación y la determinación de genotipos se realizaron con el software Haplofinder ([www.bioinformatics.roslin.ac.uk/haplofinder/haplofinder.py](http://www.bioinformatics.roslin.ac.uk/haplofinder/haplofinder.py); Baxter y col., 2008). Este programa es un script de Python sencillo que identifica posibles haplotipos cuando

se presentan secuencias ambiguas derivadas de organismos diploides. Utiliza una base de datos con todos los alelos DRB3 conocidos para crear una lista de todas las combinaciones heterocigóticas posibles, utilizando los códigos de ambigüedad de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), y luego compara la secuencia obtenida experimentalmente con la lista de todas las combinaciones posibles, identificando el haplotipo del individuo.

#### **4- Cultivos de *B. bovis* cepa S2P**

Los cultivos fueron provistos por Beatriz Valentini, de la Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela (EEA INTA Rafaela). La cepa S2P es una cepa patógena y es proveniente de Salta, Argentina. Los parásitos se multiplicaron *in vitro* utilizando un método de cultivo en fase estacionaria microaerófila (Levy y Ristic, 1980). Brevemente, el medio básico consiste en M199 (Gibco®) suplementado con 0,1 g/l de penicilina, 0,16 g/l de estreptomina, 2,2 g/l de NaHCO<sub>3</sub> y 4,25 g/l de HEPES y enriquecido con suero bovino autólogo al 40% (v/v). El medio completo incluye 5–10 % (v/v) de eritrocitos bovinos normales. Los cultivos se mantienen a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio básico se reemplazó cada 24 horas (Baravalle y col., 2012).

Para realizar las expansiones de los cultivos y llegar a un porcentaje de parasitemia del 40-50%, se partió de un cultivo *in vitro* de *B. bovis* con 48 horas de desarrollo y un porcentaje de parasitemia del 8%, en una botella de cultivo de 225 cm<sup>2</sup> (JetBiofil). En primer lugar, se cambió el medio de la misma y se dividió su contenido en 2 botellas (10 ml a cada una). Se añadió por botella 10 ml de medio básico. El procedimiento se repitió a las 24, 48 y 72 hs. A las 72 h de iniciada la expansión, por cada botella de cultivo inicial, se obtuvieron 8 botellas con un porcentaje de eritrocitos parasitados >50%. El proceso completo desde que se inicia una expansión insume 5 días.

#### **5- Cultivo de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos**

Al no existir líneas celulares de macrófagos bovinos, pusimos a punto la obtención de cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos. Para obtener la cantidad adecuada de células para los análisis de espectrometría de masa (1x10<sup>8</sup> células/condición) se realizaron extracciones quincenales de 450 ml de sangre yugular de un bovino sano (número de caravana 383) del campo experimental de INTA Castelar. El haplotipo de histocompatibilidad clase II de este bovino fue previamente tipificado realizando una PCR seguida de secuenciación para el exón 2 del gen BoLA- DRB3 con los primers descritos en la sección 3.2.

Las células mononucleares de sangre periférica o “peripheral blood mononuclear cells” (PBMC) se purificaron mediante un gradiente de Ficoll (GE Healthcare). Brevemente, tubos con Ficoll y sangre diluída 1:3 en *buffer* fosfato (PBS) se centrifugaron a 400 x g por 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar la centrifugación, se tomó la fase intermedia de leucocitos y se transfirió a un nuevo tubo conteniendo 30 ml de *buffer* PBS. Las células se lavaron por centrifugación 3 veces con 40 ml de *buffer* PBS. Luego de un recuento al microscopio óptico con azul de tripán 0.4% (Sigma) utilizando la cámara de Neubauer (Marienfeld), se sembraron a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml en diferentes placas de cultivo. Se evaluó la viabilidad y adhesión de las células en distintos formatos de placas multiwell (24, 12 y 6 wells, JetBiofil y Corning), resultando en un mayor rendimiento las placas “*low binding*” de 6 wells (ultra Corning® Costar® Ultra-Low Attachment 6 Well Plate). Las mismas permiten que los monocitos queden adheridos a la placa, mientras que el resto de los PBMC quedan en solución y pueden ser removidos al cambiar el medio. El medio utilizado fue RPMI (Gibco), el cual fue probado con diferentes suplementos y la composición final incluyó antibiótico-antimicótico (10.000 µg/ml de estreptomicina, 25 µg/ml de anfotericina B, 10.000 unidades/ml de penicilina) 10mM (Gibco), piruvato de sodio 10mM (Gibco), solución de aminoácidos no esenciales MEM10mM (Gibco). Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 4hs. Pasado este tiempo se retiró el medio conteniendo las células no adheridas y se cambió por el mismo medio con el agregado de suero fetal bovinoal 5% inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos (Internegocios S.A). Este cultivo se mantuvo durante 6 días para inducir la diferenciación de los monocitos a macrófagos, reemplazando el medio de cultivo por medio fresco completo cada 48 hs. Al séptimo día, las células se levantaron de la placa utilizando una solución de EDTA 2mM, y se realizó el recuento al microscopio óptico en cámara de Neubauer (Marienfeld) de las células teñidas con azul de Trypan Blue 0,4% (GIBCO) determinando el porcentaje de viabilidad. Los macrófagos se sembraron en placas de 6 wells (JetBiofil) a razón de  $2 \times 10^6$  células por well. Las células se incubaron 18 hs u “over night “(ON) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para que las células se adhieran a la placa (Figura 19 A).

## 6- Ensayos de fagocitosis

Una vez obtenido el cultivo celular de macrófagos bovinos, las células se lavaron con PBS para eliminar restos y se co-cultivaron con un cultivo de merozoítos de *B. bovis*, cepa virulenta S2P, a diferentes multiplicidades de infección (MOI) (2:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1) durante 2 horas (Paul y col, 2013). El porcentaje de fagocitosis se evaluó por conteo directo de extendidos teñidos utilizando un microscopio óptico. Luego de transcurrido este tiempo, se adicionaron 500 ul por well de PBS para

realizar un primer lavado y se lisaron por shock hiposmótico los glóbulos rojos (GR) que no fueron fagocitados utilizando agua destilada estéril durante 20 segundos. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS para eliminar los restos de agua que puedan lisar a los macrófagos en caso de permanecer más tiempo, y se adicionó el mismo medio de cultivo utilizado para cultivar los macrófagos. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 16 hs para permitir el procesamiento de antígenos y su correspondiente presentación en el BoLAII. Al día siguiente se cosecharon los macrófagos en el medio de cultivo levantándolos de la placa utilizando el émbolo de una jeringa estéril, se transfirieron a un tubo de baja adherencia a proteínas (Eppendorf protein Lo-Bind, Eppendorf) y se centrifugó a 400g por 10 minutos para obtener el pellet celular. El co- cultivo se realizó también con glóbulos rojos normales, siguiendo el mismo procedimiento, a modo de control, para identificar los péptidos propios del bovino (Figura 19).

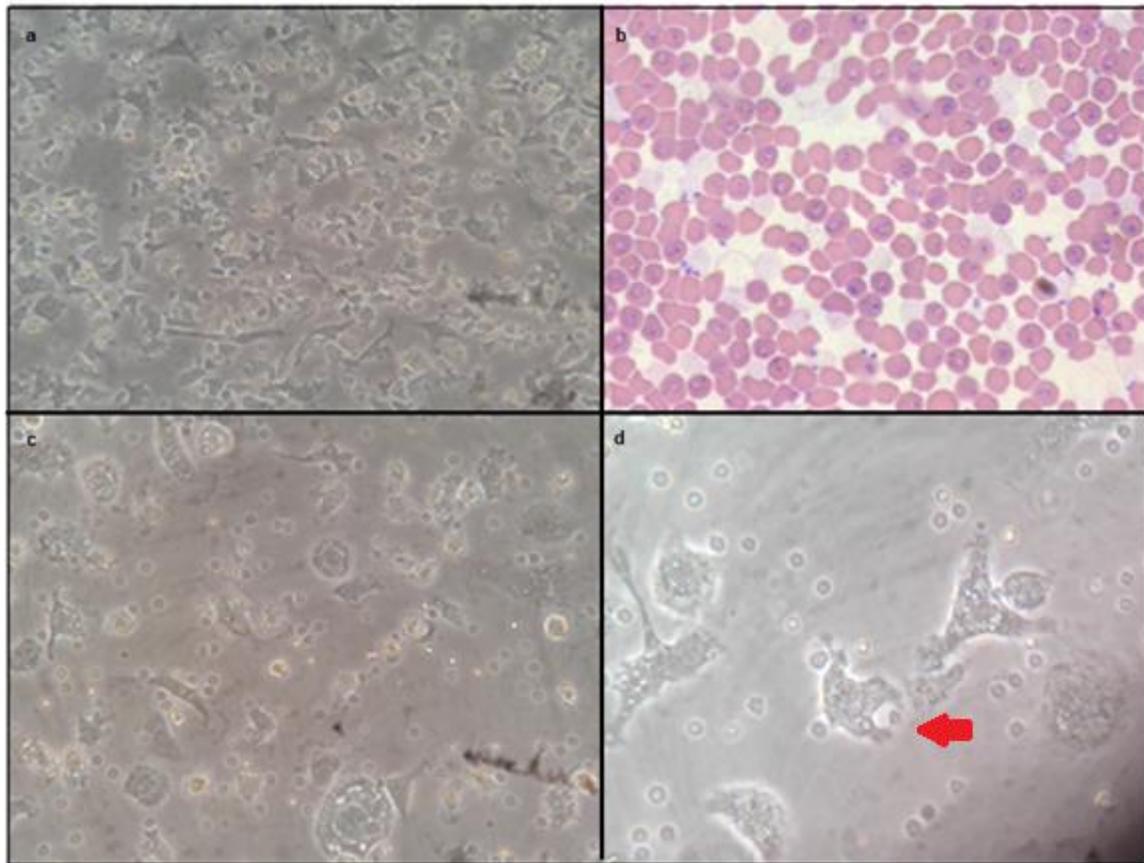


Figura 19: Microfotografías de ensayos de fagocitosis de eritrocitos infectados con *B. bovis*. Referencias: **A**-cultivo de macrófagos a partir de monocitos sanguíneos **B**- Extendido de cultivo de *Babesia bovis* teñido con Giemsa. **C**- Co-cultivo de macrófagos con eritrocitos infectados- **D**-Detalle de macrófago fagocitando un eritrocito (flecha). Aumento 40X. (Imagen propia).

## 7-Obtención de lisados de merozoítos de *Babesia bovis*

Se partió de cultivo de *B. bovis* cepa S2P con un porcentaje de eritrocitos infectados del 40%. Se concentró el paquete de eritrocitos por centrifugación a 2500 x g durante 15 min a 4 °C. El paquete de eritrocitos se lavó dos veces con 20 ml de PBS 1X (Gibco), se resuspendió al 10% de su volumen en PBS y se determinó el peso húmedo del pellet en una balanza analítica. Posteriormente se agregó 1,13 ml de H<sub>2</sub>O apirógena (Jayor) fría por gramo de peso húmedo del pellet para lisar los eritrocitos, se agitó suavemente y se dejó esta suspensión 1 min en hielo. Luego se agregó 0,11 volúmenes de PBS 10X y el pellet se lavó dos veces por centrifugación como al inicio. Las proteínas presentes en el lisado de merozoítos se cuantificaron utilizando el kit Micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce), siguiendo las especificaciones del fabricante. La suspensión se esterilizó utilizando un filtro de 0.22 µm (Merk Millipore) y se conservó en alícuotas a -20 °C hasta su utilización.

## 8- Infección de bovinos con *Babesia bovis*

### 8.1 Reacciones de PCR

Para confirmar o descartar la infección por *B. bovis* en la sangre de los bovinos utilizados en esta tesis se realizaron reacciones de PCR. Estas reacciones se llevaron a cabo con los oligonucleótidos Bbo\_v1a\_Fw y Bbo\_v1a\_Rv detallados en la Tabla 2, dirigidos a amplificar el gen multicopia *ves- 1α* (de la Fourniere y col., 2021).

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico de *B. bovis*.

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Tm	Tamaño del amplicón	Referencia
Bbo_v1a_Fw	AGGTGGTACTACTACATTAGGGC	56°C	157 pb	de la Fourniere y col., 2021
Bbo_v1a_Rv	TCACACCCAGGCACATCCAGCT			

La reacción se realizó en 25 µl finales utilizando la siguiente mezcla y ciclado:

ADN genómico	6 ng
Primer F	0,3 mM
Primer R	0,3 mM
dNTPs	0,2 mM
Taq Pol.	0,75 U
Buffer 5X	0,03 X
Agua ddcsp	15 µl

94°C	3 min	35 ciclos
95°C	30 seg	
56°C	30seg	
72°C	30seg	
72°C	10 min	

Los fragmentos amplificados de 157 pb. correspondientes al *ves- 1 $\alpha$*  fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

### 8.2 Determinación del hematocrito

Se obtuvo sangre heparinizada de la vena yugular y con ella se cargaron tubos capilares de microhematocrito heparinizados. Estos tubos se centrifugaron a 10 000 g durante cinco minutos en una centrífuga *ad hoc* (Rolco). La posterior lectura de los valores se realizó utilizando la tabla de referencia provista por el mismo equipo.

### 8.3 Infecciones con *Babesia bovis*

Se inocularon 5 bovinos con una dosis de  $5 \times 10^7$  eritrocitos parasitados con la cepa S2Ppor bovino, inyectados en un volumen de 3 ml por vía subcutánea. A partir de la infección, los bovinos fueron monitoreados semanalmente como indica el esquema de la Figura 20, midiendo su temperatura rectal y hematocrito del día 1 al 7, y diariamente del día 7 al 14, dado que el pico de la enfermedad es esperado al día 10. Los criterios de punto final para el comienzo del tratamiento antiparasitario se determinaron si se cumplía 1 de los siguientes criterios: disminución del hematocrito al 30% o hipertemia mayor a 41 °C durante 3 días seguidos. Cuando fue necesario, el tratamiento se realizó con Diminazene Aceturato 3,5%, Antipirina 18,75% en una, dos, o tres dosis, hasta que los animales alcanzaron la temperatura y nivel de hematocrito previo a la infección. El procedimiento fue aprobado (protocolo número 35/2021) por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (CICUAE-INTA).

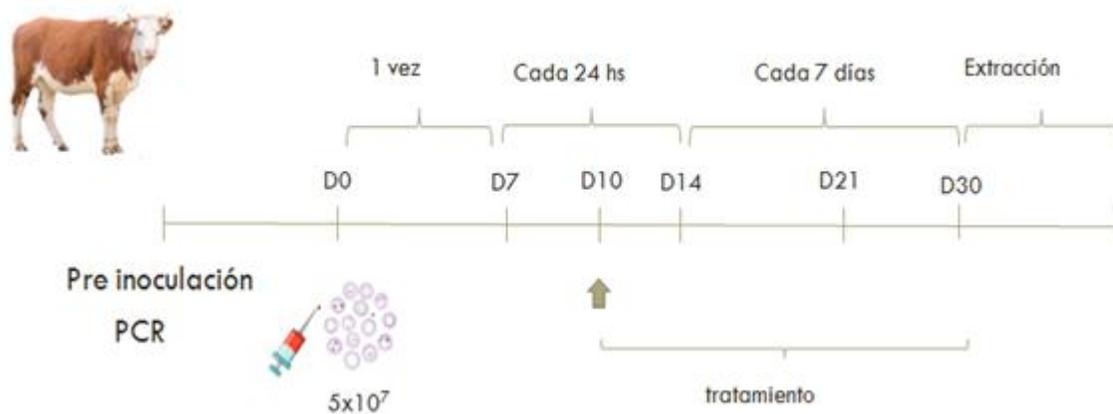


Figura 20: Esquema del ensayo de infección de bovinos.

## 9- Medición de variabilidad genética

### 9.1 Alineamientos de secuencias

Los alineamientos, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se construyeron utilizando el programa T-Coffee (Notredame y col., 2000), al cual puede accederse *on line* desde el sitio <https://tcoffee.crg.eu/>.

### 9.2 Variabilidad genotípica

Las frecuencias alélicas y el número de alelos ( $N_a$ ) se determinaron por el método de conteo directo. El número de alelos efectivo ( $N_e$ ) y observado ( $N_o$ ), así como la heterocigosidad imparcial observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) se calcularon según lo informado por Nei (1978) usando Genalex (Peakall y Smouse, 2006). La riqueza alélica se estimó utilizando FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995).

### 9.3 Mediciones de coeficientes de endogamia

Las posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se evaluaron para cada raza utilizando los estadísticos FIS (Weir&Cockerham, 1984) y la prueba exacta disponible en el software GENEPOP (Rousset, 2008).

### 9.4 Variabilidad nucleotídica

El número de sitios de segregación ( $S$ ), el número total de mutaciones ( $\text{Eta}$ ), el número de haplotipos ( $h$ ), la diversidad de haplotipos ( $H_d$ ), la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) y el número promedio de diferencias de nucleótidos ( $k$ ) se calcularon utilizando el programa DnaSP 5.00.02 (Librado & Rozas, 2009) disponible para descargar en <http://www.ub.edu/dnasp/>.

### 9.5 Evaluación de desviaciones de la neutralidad

Se utilizó la prueba D de Tajima (Tajima, 1989) para testear las desviaciones de la neutralidad (Kimura, 1983). La significación estadística de la D de Tajima se calculó mediante una prueba de dos colas y las simulaciones coalescentes, implementadas en DnaSP 5.00.02 (Librado & Rozas, 2009).

### 9.6 Cálculos de tasas de sustitución de bases

El número medio de sustituciones de nucleótidos no sinónimos (dN) y sinónimos (dS) por sitio se calculó utilizando la fórmula de Jukes-Cantor informada por Nei y Gojobori (1986) utilizando el programa DnaSP 5.00.02. La prueba Z se utilizó para evaluar la importancia de la relación dN/dS utilizando el software MEGA X (Kumary col., 2018) disponible para descargar en <https://www.megasoftware.net/>.

### 9.7 Análisis de distribución de alelos

La distribución de alelos entre los tres grupos principales de razas se representó mediante un diagrama de Venn aplicando el paquete R 'VennDiagram' (R\_Core\_Team, 2020). Para este análisis, se construyó una base de datos, utilizando los datos generados aquí, así como información de informes de otras razas sudamericanas (Da Mota y col., 2002; Kelly y col., 2003; Giovambattista y col., 2013; Takeshima y col., 2018) (Tabla 5). En el caso del conjunto de datos de Kelly et al., 2002, solo se utilizaron los alelos cuyo patrón PCR-RFLP coincidía con un solo alelo en la nomenclatura actual (Davies y col., 1997).

### 9.8 Análisis funcional del PBR

#### 9.8.1 Cálculo de porcentajes de identidad y similitud

Los porcentajes de identidad y similitud de aminoácidos se calcularon con Geneious Prime 2020.2.4 (<https://www.geneious.com>) utilizando una matriz de sustitución BLOSUM62. Los cálculos se realizaron con base en la secuencia de aminoácidos de las 31 posiciones que putativamente constituyen el MHC-DRB PBR humano pero cuyas posiciones clave se mantienen también para los bovinos (Suárez y col., 2006).

#### 9.8.2 Diseño y análisis de logos.

Se creó un gráfico de logos con la información de los aminoácidos presentes en las posiciones que constituyen el PBR para cada población utilizando el software WebLogo (Crooks y col., 2004). La altura de los símbolos dentro de la pila indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición para cada población. Solo se consideraron en el análisis los alelos que tenían frecuencias superiores al 5%.

### 9.8.3 Cálculo de coeficiente de correlación de Pearson y escalado métrico multidimensional.

Se utilizó el paquete R 4.0.2 (R\_Core\_Team, 2020) para calcular los coeficientes de correlación de Pearson (PCC) entre razas y realizar un escalado métrico multidimensional (MDS) sobre la matriz de correlación obtenida.

## 9.9 Análisis AMOVA

La partición de la variación genética entre razas se realizó con un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier y col., 1992) considerando las secuencias o los estados alélicos discretos de los genotipos BoLA-DRB3.2. Las evaluaciones de los análisis de secuencias se realizaron sobre la base de diferencias por pares utilizando Arlequin 3.11 (Excoffier y col., 2005). Para estados alélicos discretos, las distancias genéticas de Nei se utilizaron como matriz inicial para AMOVA. La significación estadística de cada componente de varianza se evaluó en base a 999 permutaciones de los datos.

## 9.10 Medidas de diferenciación entre razas

### 9.10.1 Estructura genética

La estructura genética y la diferenciación entre razas se analizaron con el estadístico F de Wright según el método de Weir y Cockerham (Weir y Cockerham, 1984). Estos parámetros y su significado se evaluaron con FSTAT 2.9.3.2.

### 9.10.2 Distancia genética de Nei

La distancia genética de Nei se calculó a partir de frecuencias alélicas con GENALEX (Peakall y Smouse, 2006).

### 9.10.3 Agrupamiento de razas

El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el algoritmo UPGMA implementado en Phylip (Felsenstein, 1989). Los árboles generados se visualizaron con Figtree (Rambaut, 2010). Para completar el análisis de relaciones entre razas se utilizaron las distancias genéticas de Nei para realizar un análisis MDS utilizando R (R\_Core\_Team, 2020).

## 9.11 Análisis filogenético de alelos BoLA-DRB3

Los árboles de Máxima Verosimilitud (ML) se construyeron a partir de los alineamientos de las secuencias de nucleótidos de BoLA-DRB3.2 como fue descrito en el punto 10.1. Antes de realizar

los análisis de ML, se utilizó el software informático ModelTest 2.1.9 (Posada & Crandall, 1998) para determinar el modelo más adecuado de evolución molecular basado en el criterio de información de Akaike. Luego de este análisis, las secuencias se analizaron bajo un modelo Jukes-Cantor con heterogeneidad de tasa gamma y sitios invariantes. El software PAUP 4.0 (Swofford, 2003) se utilizó para realizar el árbol de ML. Se utilizaron 1000 cálculos de seudoréplicas para probar la robustez de cada nodo.

## **10- Secuenciación, ensamblado y anotación del genoma de *Babesia bovis***

### 10.1 Extracción y purificación de ADN genómico de *Babesia bovis*

La extracción de ADN se realizó a partir de 1 ml de cultivo de *B. bovis* cepa S2P de un 40% de parasitemia, mediante el método de fenol-cloroformo descrito en el libro "Molecular Cloning", capítulo 1 (Sambrook y Russell, 1982). En primer lugar, alícuotas de 500 µl de cultivo parasitario se resuspendieron en 1 volumen de buffer de extracción de ADN (Tris-HCl 100mM pH7.5, SDS 1%, NaCl 30mM, EDTA 25mM). Se adicionó además proteinasa K (InbioHighway) a una concentración final de 0,2 mg/ml y se incubó 16 hs a 56°C. Seguidamente se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1) y se mezcló por inversión 5 veces. Se centrifugó 5 minutos a 14125 g en una microcentrífuga (Sigma) y se recuperó la fase acuosa. Este procedimiento se repitió nuevamente pero sólo con cloroformo. A partir de la fase acuosa obtenida, se precipitó el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se centrifugó 30 minutos en las mismas condiciones, pero a 4°C. Se descartó el sobrenadante seguido de dos lavados con etanol 70%. Se dejó secar el pellet a 60°C 5 minutos y finalmente se resuspendió el ADN en 100µl de buffer TrisHCl 10mM pH 8, incubándolo a 65°C durante 10 minutos.

El ADN extraído fue tratado con RNasa A (Sigma) a una concentración final de 10µg/ul a 37°C durante 10 minutos. Se corroboró la presencia de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Luego el mismo fue purificado mediante el kit ADN Puriprep-S (InbioHighway) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron corridas en el equipo Fragment Analyzer (Agilent) para corroborar su calidad y cuantificadas utilizando los equipos Nano Drop™ y Qubit Fluorometre (Thermo Fisher Scientific).

### 10.2 Preparación de bibliotecas y secuenciación

Las bibliotecas genómicas se construyeron utilizando el kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) a partir de 2,5 ng del ADN genómico puro, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el protocolo consistió en etiquetar el ADN, es decir añadir los adaptadores, seguido de la amplificación de las bibliotecas genómicas por PCR. Al finalizar, las mismas debieron ser purificadas utilizando las beads AMPure XP (Illumina). Finalmente se analizó la calidad de las lecturas a través del equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent) y se cuantificó utilizando Qubit Fluorometre (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación se realizó utilizando la tecnología IlluminaMiSeq (Illumina) en la Unidad de Genómica del IABIMO, INTA Castelar, generando lecturas pareadas de 150pb.

### 10.3 Análisis de calidad de lecturas y filtrado

El análisis de calidad de las lecturas se realizó mediante el software FastQC (Andrews, 2010). Se prosiguió con un pre-procesamiento de las mismas donde se eliminaron aquellas bases de menor calidad fijando un umbral de calidad de Phred > 20, además de remover los adaptadores. Para el filtrado de las lecturas se utilizó el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014).

### 10.4 Ensamblado

El genoma fue ensamblado *de novo* mediante el programa SPADES (Prjibelski et al., 2020) basados en gráficos de Bruijn. Los contigs obtenidos para cada uno de los genomas fueron alineados, ordenados y orientados utilizando el programa ABACAS (algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences) (Assefa et al., 2009) contra el genoma de referencia de *B. bovis* cepa T2B (accesión AAXT02 del NCBI; disponible en [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF\\_000165395.2/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_000165395.2/)).

### 10.5 Anotación funcional

Las pseudomoléculas obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Companion (Steinbiss y col., 2016) y con los parámetros establecidos por defecto. El programa incluye funciones de anotación de genes estructurales y funcionales, así como también los análisis comparativos y visualización de los resultados obtenidos. Tanto el ensamblado como la anotación funcional del genoma fueron hechos en colaboración de la Dra. Natalia Pin Viso (INTA Castelar).

## 11- Predicciones de péptidos T mediante bioinformática

### 11.1 Análisis funcional de los alelos BoLA-DRB3

Para agrupar los alelos individualmente en cuanto a la funcionalidad del PBR, se utilizó el programa MHC Cluster (Thomsen y col., 2013), el cual agrupa las moléculas del CMH basado en su afinidad de unión predicha. El programa grafica estos datos en forma de árbol funcional y mapa de calor o *heatmap*.

### 11.2 Selección de genes candidato para las predicciones

La selección de genes se realizó a partir del genoma de *B. bovis* cepa S2P secuenciado en este trabajo, con la colaboración del Dr. Morten Nielsen (Universidad Técnica de Dinamarca). Se partió del total de 2794 genes anotados para esta cepa. Dado que no existe ninguna estrategia previamente definida para seleccionar genes para predecir epitopes T y a fin de acotar el número de genes candidato sobre los cuales realizar las predicciones, diseñamos un modelo propio de selección de genes sobre los cuales se realizaron los análisis, adaptado de Gohil y col, 2013. El primer criterio fue seleccionar genes que se expresen exclusivamente en el estadio sanguíneo del parásito y no en el estadio presente en el vector.

Teniendo en cuenta los datos de transcriptómica recientemente disponibles para la cepa T2Bo (Ueti y col, 2020), se identificaron los genes sobreexpresados al menos 20 veces en el estadio de merozoíto. El segundo criterio fue seleccionar aquellos genes codificantes para proteínas parasitarias con señal de secreción, ya que es probable que estas proteínas se transporten al citosol o la membrana de los glóbulos rojos, desempeñando papeles importantes en la mediación de la patogenia de la babesiosis (Gohil y col., 2013). Para esto, se evaluó la presencia de péptido señal mediante el software SignalP 5.0 (DTU HealthTech; Bendtsen y col., 2004) y se eligieron los genes con el péptido señal presente. Luego se eligieron los genes que no tuvieran dominio transmembrana mediante el programa TMHMM 2.0 (DTU HealthTech; Krogh y col., 2004) ya que es poco probable que las proteínas con este dominio sean transportadas más allá de la membrana del parásito. Finalmente, se descartaron los genes que presenten homología con el genoma de *B. taurus* utilizando BLAST (NIH; Altschul y col., 1990) para elegir genes específicos del parásito. Adicionalmente, se incluyeron 3 genes que, si bien no se encontraron sobreexpresados en el estadio sanguíneo, está reportado que se expresan en la membrana del eritrocito durante la infección (Gohil

y col., 2013). El diagrama que representa los distintos criterios se encuentra resumido en la Figura 21.

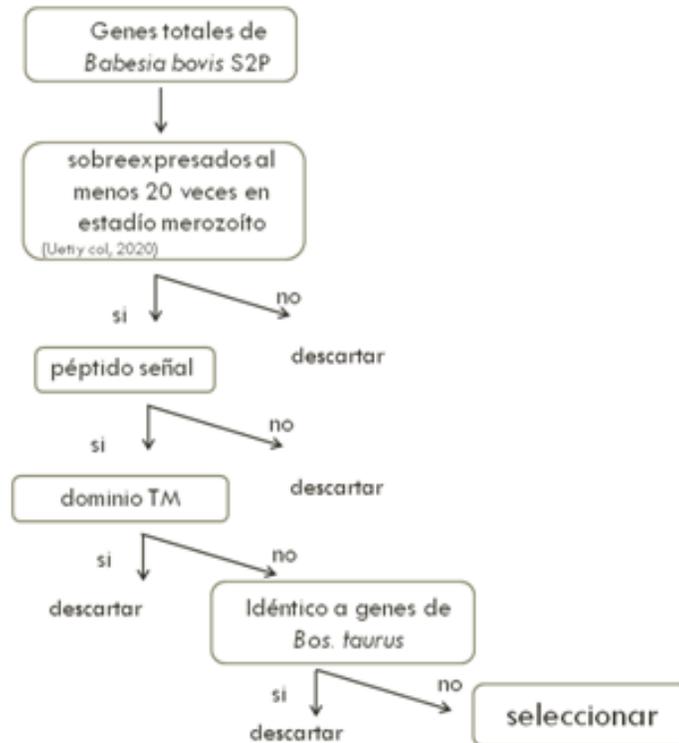


Figura 21: Esquema de selección de genes sobre los cuales se realizó la predicción de epitopes T.

### 11.3 Predicción de péptidos T a partir de los genes seleccionados

A partir de estos genes, se realizó la traducción de la secuencia para conocer la secuencia aminoacídica utilizando el recurso online ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>) y finalmente se realizaron predicciones de epitopes T para el alelo *DRB3\*001:01* mediante el servidor NetBoLAllpan ([www.cbs.dtu.dk/services/NetBoLAllpan](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetBoLAllpan)) (Fisch y col., 2020). Se eligió este alelo ya que se encontró en alta frecuencia en el rodeo de animales presente en el campo experimental de INTA que luego iban a ser utilizados para la validación. Se eligieron los péptidos con un *Rank* < 1% y se priorizaron aquellos péptidos que se unan a dos o más alelos de los 7 alelos disponibles en este software a partir de información experimental. En el caso de los péptidos que se solapan, se eligió el de mayor puntaje de predicción de unión al alelo. Los péptidos seleccionados fueron enviados a sintetizar a la empresa Genscript.

## 12- Obtención de péptidos T por inmunopeptidómica

### 12.1 Estrategia general

La estrategia general consistió en obtener células presentadoras de antígeno profesionales, en el caso de este trabajo caso macrófagos derivados de monocitos sanguíneos, co-cultivarlas con eritrocitos infectados con *B. bovis* para luego purificar los complejos MHC-péptido utilizando la técnica de inmunoprecipitación. El paso que siguió fue separar los péptidos de su CMH mediante HPLC y analizarlos por espectrometría de masas. Con los espectros de masas resultantes y comparando contra las bases de datos correspondientes, el último paso fue determinar la identidad de los péptidos y analizarlos (Figura 22).

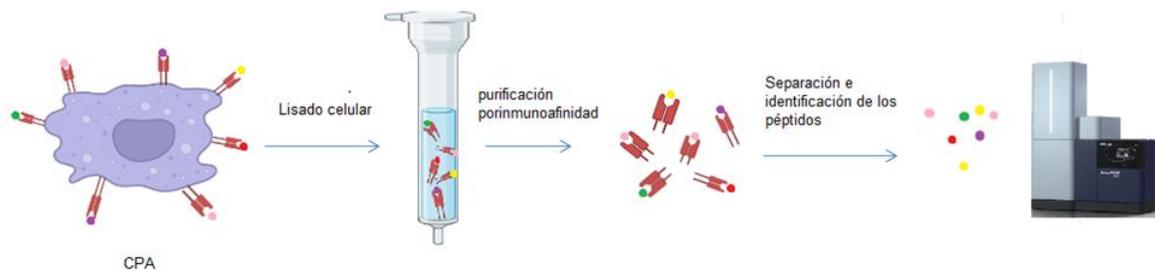


Figura 22: Estrategia general de los experimentos de inmunopeptidómica realizados. A partir de macrófagos incubados con *B. bovis*, se purificaron los complejos MHC- péptido por inmunofinidad, seguido de la separación de los péptidos por HPLC y su identificación por espectrometría de masas.

Para obtener las cantidades de macrófagos requeridas, es decir de al menos  $1 \times 10^8$  macrófagos, el procedimiento de obtención de cultivos primarios descritos en la sección 6 y los ensayos de fagocitosis detallados en la sección 7 se repitieron entre 6 y 8 veces para cada condición (eritrocitos infectados y eritrocitos normales).

### 12.2 Confirmación de la expresión de BoLAII

Para confirmar que los macrófagos derivados de monocitos bovinos utilizados en esta tesis expresen el BoLAII se realizó una marcación con un anticuerpo (Ac) específico y análisis por citometría de flujo. El análisis se realizó en tres condiciones por duplicado: macrófagos solos, macrófagos incubados con glóbulos rojos infectados con *B. bovis* y macrófagos + glóbulos rojos sin infectar. Como controles se incluyeron, para cada condición, células sin marcar como control de autofluorescencia, y células incubadas con el anticuerpo conjugado sin anticuerpo primario como control de especificidad. El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo monoclonal ILA-21 (anti

BoLA clase II) sin marcar hecho en ratón, gentileza del Dr. Timothy Conneley, Universidad de Edimburgo. El anticuerpo secundario utilizado fue anti Fc de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (BioRad). Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en Buffer Staining (BS) (PBS, SFB 2%, 0,05% azida sódica) a una concentración final de 1mg/ml.

Para la marcación, los macrófagos cultivados fueron levantados suavemente de su placa como se describió en la sección 6 y transferidos a tubos eppendorf de 1.5 ml, previamente incubados ON con 1.5 ml de SFB 1 % para mayor rendimiento, a razón de  $1 \times 10^6$  células por condición. Para ayudar a hacer un sedimento más compacto y deshacerse de algunas células muertas y restos celulares se agregaron 50 ul de SFB por well. Se recogieron las células por centrifugación a 400 g y se descartó el sobrenadante. Se bloqueó con buffer correspondiente (PBS, 10% SFB) 15 minutos a 4°C. El sedimento celular luego se resuspendió en 25 ul de una dilución 1/200 de Ac. primario en BS para cada tubo. Se incubó 15 min a 4°C. Luego de tres lavados con BS, el mismo procedimiento se realizó con el anticuerpo secundario. Las células se lavaron nuevamente con BS y se fijaron con formaldehído 0,2%. Posteriormente fueron analizadas en el citómetro de flujo (BectonDickinsonFACSCalibur) utilizando el software Cell Quest (BD) en colaboración con la Dra. Maria Jose Gravisaco, investigadora del IABIMO-INTA-CONICET. Se analizaron un total de hasta 80000 células/pocillo de las cuales solo se incluyeron las células viables para su análisis correspondiente. Se incluyeron controles de autofluorescencia.

### 12.3 Experimentos de inmunoprecipitación

Para estos experimentos es especialmente relevante utilizar reactivos con alto grado de pureza, así como plásticos descartables de baja unión a proteínas.

#### 12.3.1 Preparación de las columnas para la inmunoprecipitación

Este trabajo fue hecho en colaboración con la Dra. Nicola Ternette y el Dr. Robert Parker en la Universidad de Oxford, Reino Unido. Se utilizaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro. A 2ml de resina proteína G Sepharosa (Cytiva) se le unió una solución de 5 mg/ml de anticuerpo ILA-88 (anticuerpo anti-BoLAI provisto por el Dr. Tim Conneley, Universidad de Edimburgo), disuelto en PBS. Aunque el análisis de los péptidos unidos a esta molécula no estuvo dentro de los objetivos de esta tesis, en el laboratorio de la Dra. Ternette contaban con este anticuerpo y consideraron que podría ser de utilidad para ensayos futuros.

El pegado del anticuerpo ILA-88 a la resina se realizó mediante incubación en movimiento durante 60 min a 4°C. Por otra parte, una columna de cromatografía de vidrio y vacía se pre-lavó con ácido acético 10% para remover sustancias poliméricas. A esta columna, se empacó la solución de proteína G Sepharosa unida al anticuerpo y seguidamente se lavó con buffer borato (0.1 M ácido bórico, 0.1 M KCl) para remover las aminos libres en la columna. Se equilibró la misma con trietanolamina 0.2M, pH 8.2 para remover las aminos y equilibrar la columna. Se agregaron 10 volúmenes de columna (VC) de solución crosslink (40 mM Dimethylpimelimidato en 0.2 M Triethanolamina) y se incubó 60 min a temperatura ambiente. Se agregaron 10 VC de solución de Tris 0.2 M, pH8 y luego 10 VCde buffer citrato 0.1 M, pH3.0 para eluir los restos de anticuerpo que no hayan quedado unidos. Luego se neutralizó la columna agregando 10 VC de PBS pH 8 . El mismo procedimiento se realizó en otra columna, en este caso con el anticuerpo ILA-21 (anti BoLAII).

### 12.3.2 Inmunoprecipitación del complejo BoLA-péptido

Se utilizaron 5 ml de buffer de lisis (1% IGEPAL, 300 mMNaCl, 100 mM Tris pH 8.0, agua ultrapura, complete Mini InhibitorCocktail (Roche), 1 tableta cada 10 ml de buffer de lisis) por cada  $1 \times 10^8$  células, se homogeneizó y se ajustó el volumen a 10 ml con PBS. Se incubó lentamente durante 45 min en rotación y en frío. Luego el lisado se centrifugó 10 minutos a 500g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf *protein low binding* y se centrifugó a  $>15000 \times g$  a 4°C durante 45 min. Posteriormente, el lisado se pasó por la columna a un flujo máximo de 1.5 ml/min. Luego se realizaron 4 lavados para remover el material no unido. Para esto se lavó la columna 4 veces con 10 VC de cada buffer de lavado 1 a 4 (Buffer de lavado: 1 0.005% IGEPAL, 50 mM Tris pH 8.0, 150 mMNaCl, 5 mM EDTA; buffer de lavado 2: 50 mMTris, 150 mMNaCl; buffer de lavado 3: 50 mMTris, 450 mMNaCl; buffer de lavado 4: 50 mMTris). Los complejos BoLA-péptido se eluyeron con 5 VC de ácido acético 10% en tubos eppendorf *low binding*. Posteriormente, este eluido se pasó por la otra columna de inmunoprecipitación unida al anticuerpo ILA- 21 para purificar los complejos CMH-péptido clase II. Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente y una vez eluidos los complejos BoLA-péptido, se procedió a separar los péptidos mediante HPLC de fase reversa, utilizando los tips C18 spin tips (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los péptidos obtenidos se secaron en una centrífuga de vacío. Los pellets se guardaron a -80°C hasta su análisis en el espectrómetro de masas.

### 12.3.3 Purificación de los péptidos por HPLCy análisis por espectrometría de masas

Las muestras fueron resuspendidas en 20ul de ácido fórmico al 0.1% y analizadas en el equipo Ultimate 3000 nano UPLC system (Lumos) unido a dos espectrómetros de masas: el equipo OrbitrapFusion™ Lumos™ Tribrid™ MassSpectrometer (Lumos) (ThermoScientific) y el equipo TimsTof SCP (Bruker). Una vez cargadas las muestras, se ejecutó un gradiente optimizado como se describe en el manual de cada equipo.

### 12.3.4 Identificación de péptidos

Los análisis de los espectros obtenidos se realizaron utilizando el software Peaks Studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) contra la base de datos de proteínas de *Bos taurus* (Número de acceso: GCF\_002263795.2), la de *B. Bovis* cepa T2B y una lista de contaminantes estándar. La tasa de descubrimientos falsos (false Discovery rate o FDR) se estableció a 1%. El análisis posterior y las visualizaciones de datos de las identificaciones de Peaks Studio se realizaron en R utilizando paquetes asociados.

### 12.3.5 Generación de motivos de unión de los alelos BoLAI

A partir del listado de péptidos totales obtenido en el análisis anterior (ambas condiciones) y analizando que aminoácidos y con qué frecuencia aparecen, se generaron dos motivos de unión diferentes correspondientes a los dos alelos del BoLA a partir del cual se generaron los cultivos de macrófagos. Este análisis lo realizó el Dr. Morten Nielsen utilizando el programa GibbsCluster (Andreatta y col., 2017).

### 12.3.6 Identificación de péptidos T específicos de *Babesia bovis*

Para la identificación de péptidos exclusivos de *B. bovis*, se procedió a realizar un filtrado utilizando un paquete específico de R. Se tuvo especial cuidado en eliminarlos péptidos también encontrados en la condición control (péptidos propios bovinos), péptidos con mutaciones Isoleucina/Leucina comparado con el proteoma bovino (estos aminoácidos pueden ser intercambiados por error al hacer el análisis de los espectros) y eliminando los péptidos con un largo menor a 12 aa. El próximo paso que se realizó con estos péptidos obtenidos luego del filtrado fue predecir bioinformáticamente su unión a los dos motivos de unión del BoLAI descritos en la sección 13.1.6. A cada péptido se le asignó un score máximo de unión los dos motivos de unión. Los péptidos con alto score de unión son identificados como epitopes T de *B. bovis*, porque esto indica que fueron verdaderamente presentados por el BoLAI, y no son contaminantes inespecíficos.

Los péptidos identificados como provenientes de *B. bovis* que se solapan fueron agrupados con la herramienta disponible en la página web del IEDB Epitope Clustering Results (<http://tools.iedb.org/cluster/>) version 2.0 seleccionado un 100% de *cutoff*, con el objetivo de generar péptidos consenso. Esto es porque se conoce que los péptidos que son parte de un cluster tienen una mayor probabilidad de ser verdaderos ligandos del CMH. El esquema de todo el proceso se resume en la Figura 23.

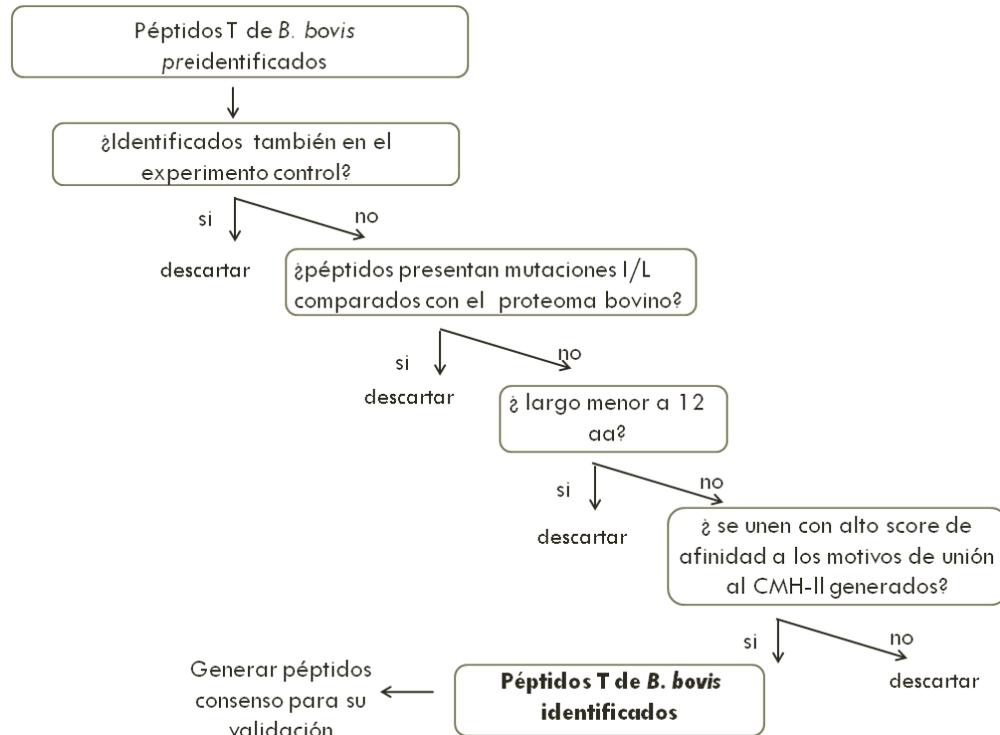


Figura 23:Esquema que resume el procedimiento realizado para identificar los epitopes T de *Babesia bovis*.

### 12.3.7 Análisis de las proteínas identificadas

Se realizó un análisis informático y bibliográfico de las proteínas cuyos péptidos fueron encontrados durante los análisis por espectrometría de masas. Se realizó una búsqueda bibliográfica de cada proteína en Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las proteínas fueron asociadas a Términos GO (Ontología Genética) utilizando el programa online Gene Ontology Resource (<http://geneontology.org>). En la Ontología Genética, los genes se asignan a un conjunto de contenedores predefinidos según sus características funcionales, ya sean componentes celulares, procesos biológicos o según su función molecular. Los resultados fueron visualizados utilizando la herramienta online REVIGO (<http://http://revigo.irb.hr>), el cual reduce y analiza los resultados de los términos GO.

### 13-Validación experimental de péptidos T

Dado que la babesiosis no se encuentra presente en la región (Buenos Aires) al no ser un ambiente propicio para el vector, y que es necesario contar con bovinos infectados para poder realizar la validación, resultó necesario infectar con *B. bovis* 5 bovinos del campo experimental de INTA. El procedimiento utilizado para esta infección se detalla en la sección 8.3. Los péptidos sintetizados fueron resuspendidos a 10 mg/ml en agua o dimetilsulfóxido (DMSO) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 13.1 ELISA

La secreción de IFN- $\gamma$  por parte de células PBMC presentes en sangre entera heparinizada fue estudiada por ELISA utilizando el kit comercial BOVIGAM, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 bovinos previamente infectados con *B. bovis* y un bovino no infectado a modo de control. Para realizar el ELISA se partió de la incubación de 250  $\mu$ l de sangre con 35  $\mu$ l de estímulo correspondiente. Se incubó ON a 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las placas fueron centrifugadas a 500 g durante 30 min., y el plasma fue separado y guardado a -20 °C hasta su uso. Los controles utilizados fueron RPMI y un péptido no relacionado (10  $\mu$ g/ml) como controles negativos, concanavalina A (con A) como control positivo inespecífico (5  $\mu$ g/ml) y lisado de merozoítos (10 $\mu$ g/ml) de *B. bovis* como control positivo específico. Los estímulos utilizados fueron pools de péptidos generados al azar de 10 péptidos cada uno (1.5  $\mu$ g/ml c/u; 15  $\mu$ g/ml finales), o péptidos individuales (15  $\mu$ g/ml). Una vez finalizado el ensayo se leyó la absorbancia a 620 y 450 nm en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems). Las absorbancias fueron restadas como indica el kit para obtener el valor final considerado como el resultado del ensayo.

#### 13.2 Citometría de flujo

Para la determinación de linfocitos CD4+ productores de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos sintetizados, se purificaron PBMCs a partir de los bovinos infectados previamente con *B. bovis* siguiendo el protocolo mencionado en la sección 5. Los mismos se incubaron, junto con los estímulos o controles, a razón de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos fondo en "U" durante 96 hs en medio RPMI (Gibco) suplementado con antibiótico-antimicótico (Estreptomicina, anfotericina B, penicilina) (Gibco) y 10% de suero fetal bovino (Gibco) 10mM. Los estímulos consistieron en pools de 10 péptidos a una concentración de 1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l cada uno, o péptidos individuales a una

concentración de 15 ug/ul. Se utilizó concanavalina A a una concentración final de 5 ug/ml como control positivo inespecífico, lisado de merozoítos de *B. bovis* 10 ug/ul como control positivo específico y medio RPMI como control negativo. Durante las últimas 4 horas de incubación se adicionó 5  $\mu$ M del reactivo Monensina (Sigma) a cada pocillo. La Monensina bloquea el transporte del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, frenando el tránsito de proteínas de secreción lo cual facilita la acumulación intracitoplasmática de las citoquinas. A continuación, se centrifugó la placa a 163 x g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se unificaron las células juntando 12 pocillos por cada condición, para partir de un total de  $6 \times 10^6$  células por condición. Estas células se resuspendieron en 180  $\mu$ l de buffer staining (BS: PBS 1X, SFB 5% y  $\text{NaN}_3$  0,1%). Posteriormente se realizó otra centrifugación y el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de BS con las diluciones de anticuerpo anti-ratón CD4FITC™ (clon CC8) dirigido a la molécula CD4 ubicada en la superficie celular, a diferentes concentraciones, seleccionando luego de la puesta a punto una concentración de 0,12  $\mu$ g/pocillo. Luego de incubar 30 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron las células por centrifugación dos veces con BS y se permeabilizaron con formaldehído 1% durante 20 min a 4 °C. Las células se lavaron luego dos veces con 180  $\mu$ l de BS. Posteriormente, se resuspendieron en 180  $\mu$ l de buffer de permeabilización (BP: BS y saponina 0,5% preparado en el momento) y se incubó durante 15 min a 4 °C en oscuridad. Luego se realizó un lavado con BP, las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de la dilución de anticuerpo anti-bovinoIFN $\gamma$ -Alexafluor 647 (clon CC302) a una concentración de 0,12  $\mu$ g/pocillo en BP y se incubó 30 min a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células dos veces, el primer lavado en BS y el segundo con BP. Se repitieron los pasos de fijación, pero esta vez con formaldehído 0,1%. Al día siguiente las células se resuspendieron en 180  $\mu$ l de PBS 1Xy fueron transferidas a tubos para citometría de flujo (Corning) para finalmente ser analizadas en el citómetro FACSCalibur usando el software CellQuest (BD). Se analizaron un total de hasta 100.000 células/pocillo de las cuales solo se incluyeron las células viables para su análisis correspondiente. Se incluyeron controles de autofluorescencia.

## RESULTADOS

---

### 1- Identificación y caracterización los alelos del gen *DRB3.2* de alta frecuencia en las razas de bovinos presentes en el NOA y NEA

#### 1.1-Distribución de alelos *BoLA-DRB3.2* entre razas

En un patógeno dado, la identificación racional de epítopes T para ser incluidos en vacunas de nueva generación requiere tener en cuenta las características genéticas del hospedador, ya que, en el caso del hospedador bovino, diferentes alelos del *BoLA* presentarán diferentes péptidos a los linfocitos T CD4+. En este sentido, el primer paso para poder predecir epítopes T de *Babesia bovis* por bioinformática y también para identificar este tipo de epítopes por inmunoproteómica, es estudiar la diversidad del gen *BoLA-DRB3.2* en una muestra determinada que resulte de interés al estudio en cuestión. Como esta diversidad es muy amplia, en este trabajo acotamos el estudio a las razas de bovinos de origen índico (cebuinos) o cruza más utilizadas en la actividad ganadera del NOA y NEA, zona donde la babesiosis bovina es enzoótica y donde este tipo bovino es elegido por su adaptación al clima cálido de la región, así como por su resistencia natural a ciertas enfermedades y artrópodos. Además, incluimos en el estudio a la raza Criollo como *outgroup*, ya que al ser del tipo europeo (taurino) se espera que sus características genéticas difieran notablemente.

Con este propósito se realizó el análisis de la secuencia de ADN del gen *BoLA-DRB3.2* de 264 muestras previamente genotipadas según lo descrito en la sección 9.4 de M y M. A partir del análisis de estas secuencias se identificaron 61 alelos los cuales estaban previamente reportados y depositados en la base de datos EMBL del Instituto Europeo de Bioinformática (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>) (Tabla suplementaria A), sin encontrarse nuevas variantes alélicas (Tabla 3). Al desglosar el análisis según el tipo bovino, de estos 61 alelos, 5 están presentes solo en *B. taurus*, 4 están presentes exclusivamente en *B. indicus* y 22 están presentes exclusivamente en razas mixtas. Solo nueve alelos se comparten entre los tres tipos principales de bovinos. Mientras tanto, los 21 alelos restantes se comparten entre al menos dos razas (Figura 24 a).

Tabla 3: Frecuencias del gen BoLA-DRB3.2 en razas índicas y Criollo del norte argentino. Las frecuencias más altas (consideradas > al 5%) están señaladas en negrita.

Alelo DRB3.2	Criollo (N=59)	Nelore (N=30)	Brahman(N=36)	Braford(N=69)	Brangus (N=70)	Referencia
BoLA-DRB3*001:01	<b>0,203</b>			0,022	<b>0,171</b>	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*002:01	0,017			0,014	<b>0,164</b>	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*003:01	0,008			0,007		Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*005:01	<b>0,068</b>		0,014	0,022	0,007	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*005:02	0,008					Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*005:04				0,007		Takeshima y col., 2011
BoLA-DRB3*007:01	0,008		0,042	0,014	0,007	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*008:01				0,036	0,029	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*009:01				0,021	0,021	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*009:02	0,008		0,014	0,014	0,007	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*010:01					0,007	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*010:02				<b>0,094</b>	0,007	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*011:01	<b>0,051</b>			0,007	0,021	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*011:03		0,017		0,007		Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*012:01	0,034	0,017	<b>0,194</b>	<b>0,065</b>		Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*013:01	0,025			0,014		Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*014:01:01				0,014	0,021	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*014:02					0,007	De y Singh, 2006
BoLA-DRB3*015:01	0,017			<b>0,051</b>	0,043	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*015:02				0,007		Xu A y col., 1993
BoLA-DRB3*016:01		0,033		<b>0,051</b>		Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*016:02					0,007	Mikko y col., 1997
BoLA-DRB3*017:01					0,014	Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*017:03					0,021	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*018:01	<b>0,11</b>	0,017		0,043	0,029	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*019:01			0,014			Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*019:02					0,007	Takeshima y col., 2011
BoLA-DRB3*020:01:02	0,042		0,042	0,007		Gelhaus y col., 1995
BoLA-DRB3*020:03	<b>0,059</b>					Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*021:01	0,042					Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*022:01		<b>0,083</b>	<b>0,069</b>	0,022		Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*023:01	<b>0,085</b>					Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*024:03				0,007		
BoLA-DRB3*026:01	0,008					Mikko y Anderson, 1995
BoLA-DRB3*027:03				0,043	0,007	Takeshima y col., 2009

BoLA-DRB3*027:04					0,014	Gelhaus y col., 1995
BoLA-DRB3*027:05			0,028			Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*027:07				0,022	0,021	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*027:10					0,021	Takeshima y col., 2003
BoLA-DRB3*028:01	<b>0,076</b>	<b>0,1</b>		<b>0,065</b>		Gelhaus y col., 1995
BoLA-DRB3*028:02				0,007		Takeshima y col., 2011
BoLA-DRB3*029:01	0,025	0,017				Gelhaus y col., 1995
BoLA-DRB3*030:01		<b>0,1</b>	<b>0,375</b>	<b>0,087</b>	<b>0,121</b>	Gelhaus y col., 1995
BoLA-DRB3*030:21		0,017			0,021	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*030:22			0,014			De y Singh, 2006
BoLA-DRB3*031:01			0,042	0,014	0,014	Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*032:01		0,017		0,036	<b>0,05</b>	Takeshima y col., 2001
BoLA-DRB3*032:02		<b>0,116</b>	0,028		0,007	Takeshima y col., 2011
BoLA-DRB3*032:03					0,007	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*033:01				0,022	0,043	Sitte y col., 1995
BoLA-DRB3*034:01			0,014	0,014		Takeshima y col., 2009
BoLA-DRB3*035:01	0,017	<b>0,183</b>	0,014	0,007	0,007	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*036:01	0,034	<b>0,233</b>	0,042	<b>0,065</b>	0,043	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*037:01		0,017				Takeshima y col., 2001
BoLA-DRB3*039:01			0,014			
BoLA-DRB3*042:01			0,028	0,029	0,007	Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*043:01				0,007		Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*044:01	0,034			0,014		Maillard y col., 1999
BoLA-DRB3*048:01	0,017				0,007	De y Singh, 2006
BoLA-DRB3*048:02				0,014		Takeshima y col., 2011
BoLA-DRB3*057:02		0,033	0,014		0,007	Das y col., 2012
<b>N° de alelos</b>	23	15	18	37	34	
<b>N° de alelos frecuentes</b>	7	6	3	7	4	

\*Número de alelos totales: 61.

El análisis de los datos mostró que la identidad de los alelos presentes en alta frecuencia (considerada > al 5%) varía según la raza. Las razas Criollo y Braford tienen el mayor número de alelos por encima del umbral del 5 % (n=7 cada una), seguidos de Nelore (n=6), Brangus (n=4) y Brahman (n=3). Por su parte, el alelo\*030:01 es el único alelo de alta frecuencia que comparten todas las razas índicas, y las cruzas, en alta frecuencia (Tabla 3). Los alelos \*035:01 y \*036:01 resultaron los únicos compartidos por todas las razas. Todas las razas presentaron alelos exclusivos tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Alelos exclusivos en las diferentes razas bovinas analizadas.

Raza	Alelo	Frecuencia
Criollo	005:02	0,008
Criollo	020:03	0,059
Criollo	021:01	0,042
Criollo	023:01	0,085
Criollo	026:01	0,008
Nelore	037:01	0,017
Brahman	019:01	0,014
Brahman	027:05	0,028
Brahman	030:22	0,014
Brahman	039:01	0,014
Braford	005:04	0,007
Braford	015:02	0,007
Braford	024:03	0,007
Braford	028:02	0,007
Braford	043:01	0,007
Braford	048:02	0,014
Brangus	010:01	0,007
Brangus	014:02	0,007
Brangus	016:02	0,007
Brangus	017:01	0,014
Brangus	017:03	0,021
Brangus	019:02	0,007
Brangus	027:04	0,014
Brangus	027:10	0,021
Brangus	032:03	0,007

Con el objetivo de poner en contexto nuestros resultados con los resultados de otros autores que estudiaron razas similares en Latinoamérica, y así poder analizar la distribución alélica de este gen de manera más global, se construyó un diagrama de Venn utilizando un conjunto de datos más grande obtenido de la literatura que consta de 70 alelos de diez razas bovinas provenientes de Sudamérica agrupadas en tres tipos principales (taurino, cebuino y razas mixtas). La información más detallada sobre estas razas se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Información sobre las razas sudamericanas incluídas en este estudio.

Raza	Tipo	País de muestreo	Referencias
Nelore x Brahman	mixta	Peru	Takeshima y col.,2018
Nelore	<i>Bos indicus</i>	Bolivia	Takeshima y col.,2018
Gir	<i>Bos indicus</i>	Bolivia	Takeshima y col.,, 2018
Harton del valle	<i>Bos taurus</i>	Colombia	Giovambatista y col., 2013
Yacumeño	<i>Bos taurus</i>	Bolivia	Giovambatista y col., 2013
Gir	<i>Bos indicus</i>	Brasil	da Mota y col.,2002
Criollo	<i>Bos taurus</i>	Uruguay	Kelly y col.,2002
Nelore	<i>Bos indicus</i>	Argentina	Este trabajo
Brahman	<i>Bos indicus</i>	Argentina	Este trabajo
Criollo	<i>Bos taurus</i>	Argentina	Este trabajo
Braford	mixta	Argentina	Este trabajo
Brangus	mixta	Argentina	Este trabajo

El análisis de distribución de los 70 alelos totales en las 12 razas de este análisis ampliado (Figura 24 B) mostró que 26 alelos (37,1 %) son compartidos por los tres tipos bovinos, mientras que siete alelos (10 %) están presentes exclusivamente en tipo taurino, tres (4,3 %) en el tipo índico y siete (10 %) en el tipo mixto. Este análisis ampliado muestra que los alelos exclusivos del tipo mixto disminuyen en comparación con nuestros propios datos sobre bovinos del norte de Argentina.

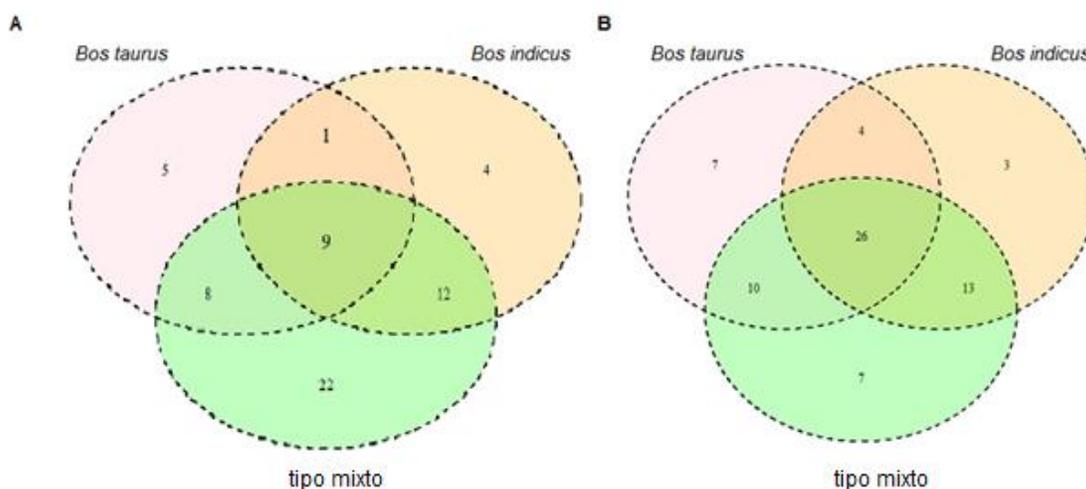


Figura 24: Diagramas de Venn que muestran la distribución del alelo BoLA-DRB3 entre las razas de ganado según su tipo principal: razas taurinas, cebuinas y mixtas. A: datos reportados en este trabajo. B: análisis ampliado.

### 1.2-Diversidad genética del gen *BoLA-DRB3*

La diversidad genética se puede evaluar utilizando pruebas estadísticas que miden la cantidad de alelos por población, y relativizado al tamaño de la muestra, la heterocigocidad y coeficientes de endogamia, entre otros. En nuestro caso esta diversidad se evaluó teniendo en cuenta diferentes parámetros (Tabla 6) según lo descrito en la sección 9.4 de M y M. Para el número de alelos, el  $N_a$  varió de 15 en Criollo a 37 en Braford. Cabe destacar que en todas las razas se observó que el  $N_e$  es menor que la riqueza alélica. Para la heterocigosis, los valores de  $H_e$  oscilaron entre 0,806 en Brahman y 0,953 en Braford, mientras que los valores de  $H_o$  oscilaron entre 0,643 en Brangus y 0,855 en Braford. En general, se observó que Braford es la raza más diversa, demostrado por el número de alelos, la heterocigocidad y la riqueza alélica.

Tabla 6: Medidas de variabilidad genética.

	N	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$uH_e$	$F_{IS}$	Riqueza alélica
<b>Criollo</b>	59	23	11,488	0,814	0,913	0,921	0,117*	19,113
<b>Nelore</b>	30	15	7,531	0,733	0,867	0,882	0,170*	15,000
<b>Brahman</b>	36	18	5,153	0,694	0,806	0,817	0,152*	16,574
<b>Braford</b>	69	37	21,350	0,855	0,953	0,960	0,110	27,108
<b>Brangus</b>	70	34	11,681	0,643	0,914	0,921	0,303*	22,990

Referencias: número de individuos (N), número de alelos ( $N_a$ ), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigocidad observada ( $H_o$ ), esperada ( $H_e$ ) y esperada sin sesgo ( $uH_e$ ), equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) medido usando  $F_{IS}$ , \*valores significativos con  $P < 0,05$ .

La diversidad de *BoLA-DRB3.2* también se examinó a nivel de nucleótidos usando siete índices que determinan el grado de polimorfismo dentro de una población (Tabla 7). El valor de  $\pi$  varió de 0,074 en Nelore y Criollo a 0,082 en Braford. Los valores de  $H_o$  fueron menores que los de la  $H_e$ , indicando menos variabilidad que la esperada. El número S de sitios segregantes varió de 56 en Nelore y Brahman a 65 en Braford, mientras que el número de mutaciones  $\eta$  varió de 67 en Nelore a 82 en Braford. Todas las razas presentan más mutaciones que sitios segregantes; lo que demuestra que hay posiciones nucleotídicas que no se ajustan al modelo de sitio infinito, indicando que no todos los alelos provienen de un descendiente en común. Por su parte, el número promedio de diferencias de nucleótidos ( $k$ ) es menor en razas puras que en razas mixtas, como era de esperar debido a su

naturaleza mixta. La prueba D de Tajima no mostró desviaciones de las expectativas neutrales, lo que indica que las secuencias de ADN evolucionaron aleatoriamente.

Además, se calculó el número de variaciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) para cada raza (Tabla 7). Los valores de dN van desde 0,096 en Nelore y Brahman hasta 0,104 en Braford, mientras que los valores de dS van desde 0,024 en Nelore hasta 0,037 en Brahman. En todas las poblaciones se encontró una relación dN/dS significativa (>1) indicando que la selección natural favoreció la fijación de cambios aminoacídicos. Como es esperable, la relación entre dN y dS fue más pronunciada cuando solo se consideraron los codones del PBR.

Tabla 7: Diversidad genética a nivel nucleótidos.

	N	S	Eta	h	Hd	$\pi$	k	D de Tajima	Total		PBR	
									dN	dS	dN	dS
<b>Criollo</b>	59	58	74	10	0,786	0,074	17,419	1,114	0,100	0,036*	0,217	0,082*
<b>Nelore</b>	30	56	67	15	0,882	0,074	17,356	0,701	0,096	0,024*	0,197	0,051*
<b>Brahman</b>	36	56	68	10	0,817	0,076	17,924	0,930	0,096	0,037*	0,198	0,072*
<b>Braford</b>	69	65	82	37	0,960	0,082	19,184	0,908	0,104	0,035*	0,228	0,071*
<b>Brangus</b>	70	62	76	33	0,918	0,078	18,108	0,989	0,097	0,035*	0,196	0,071*

Referencias: número de individuos (N), número de sitios segregantes (S), número de mutaciones (Eta), número de haplotipos (h), diversidad de haplotipos (Hd), diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ), número medio de diferencias por pares (k), prueba de neutralidad D de Tajima, número medio de sustituciones de nucleótidos no sinónimos (dN) y sinónimos (dS) por sitio en la secuencia completa de BoLA (total) y en el sitio de unión del péptido (PBR). Los asteriscos indican una relación estadísticamente significativa diferente de 1 dN/dS.

### 1.3-Análisis de similitud de PBR

Además de la diversidad genética, es importante evaluar el impacto de esta a nivel aminoácidos. Las posiciones de los mismos que forman el PBR son cruciales para definir el contexto estructural en el cual un péptido podrá ser presentado o no por un determinado BoLA. Para evaluar la diversidad aminoacídica entre razas, en primer lugar, evaluamos la identidad y similitud de los aminoácidos correspondientes a las posiciones del PBR para todos los alelos identificados (Tabla 8). Como resultado de los análisis de identidad observamos que mayoría de los alelos (59/61) poseen una secuencia de aminoácidos única para su PBR. En cuanto a la similitud entre ellos, Brahman y Brangus tuvieron los porcentajes más altos (80,8%), lo que indica una baja diversidad en estas razas mixtas.

Por el contrario, Braford tuvo el porcentaje de similitud de aminoácidos más bajo (74,7 %) y es la raza más diversa a nivel de PBR. Este hallazgo es consistente con los resultados de diversidad de nucleótidos descrito en la sección 2.

Tabla 8: Análisis de identidad y similitud en la secuencia de aminoácidos de BoLA- DRB3.2 completo y en el PBR para cada raza

Raza	Total		PBR	
	identidad (%)	similitud (%)	identidad (%)	similitud (%)
Criollo	85,1	86,8	68,8	77
Nelore	85,7	86,3	71,6	78,8
Brahman	86	86	72,5	80,8
Braford	83,5	87,3	66,5	74,7
Brangus	85	87,7	72,5	80,8

Otra forma de evaluar la diversidad del PBR a nivel funcional es mediante el análisis de correlación de Pearson (PCC) y su posterior gráfico MDS comparando entre razas. Los resultados de ambos análisis indican que todas razas tuvieron una diversidad funcional similar, excepto Braford, la cual es la raza más diversa a nivel de PBR en comparación con todas las razas analizadas (Tabla 9 y Figura 25). Estos resultados son consistentes con los análisis de identidad y similitud previos que mostraban que Braford es la raza con mayor diversidad.

Tabla 9: Correlación de Pearson entre razas.

	Criollo	Nelore	Brahman	Braford	Brangus
Criollo	0,000	0,076	0,117	0,036	0,034
Nelore	1,505	0,000	0,091	0,040	0,070
Brahman	2,355	0,854	0,000	0,058	0,081
Braford	0,887	0,596	0,483	0,000	0,029
Brangus	0,566	1,305	0,897	0,631	0,000

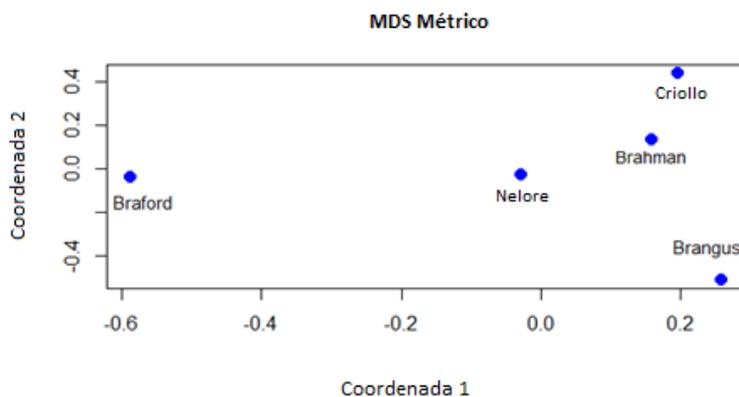


Figura 25: MDS basado en la variabilidad del PBR entre razas.

Para una mejor visualización de la variabilidad de aminoácidos en cada posición que conforma el PBR, se pueden utilizar gráficos de logo, donde se puede observar en la posición de cada aminoácido presente en el bolsillo cuáles son los aminoácidos presentes y su frecuencia. El análisis realizado con los alelos más frecuentes en cada raza mostró que los logos son notablemente parecidos entre las 5 razas (Figura 26). Las posiciones más conservadas fueron la 82 y 83 del bolsillo 1, las 14, 15, 26., 28, 40, 72 y 73 del bolsillo 4, la 29 del bolsillo 6, la 64 del bolsillo 7 y las 38 y 61 del bolsillo 9. Por su parte, las posiciones más variables fueron la 11, 13, 37, 70, 71 y 74. En las posiciones 81 y 85 del bolsillo 1, 78 del bolsillo 4, 12 y 30 del bolsillo 6, y 47 y 9 del bolsillo 9 (Figura 26) podemos encontrar 2 aminoácidos posibles para cada posición, en todos casos estos aminoácidos son similares en cuanto a sus características químicas. Los 2 aminoácidos probables en la posición 81 son aromáticos, los de la posición 85 son pequeños, en la posición 78 son no polares, los de las posiciones 9 y 12 son polares y en las posiciones 30 y 47 son aromáticos.

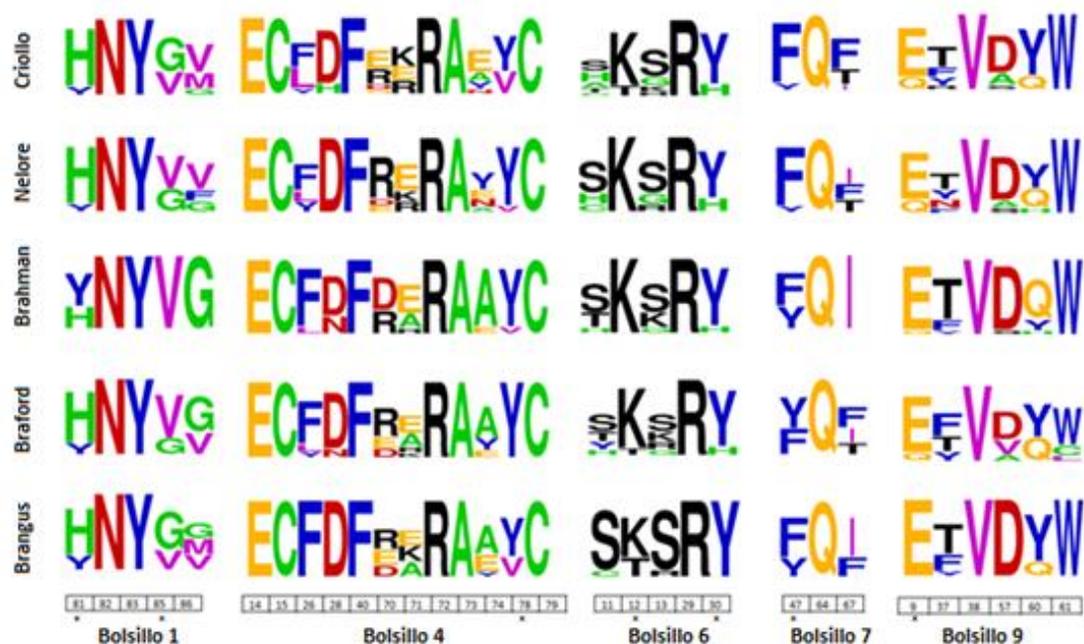


Figura 26: Logos del PBR. Referencias: \* posiciones con 2 aminoácidos posibles.

Para estudiar la diversidad funcional de los alelos a nivel individual, utilizamos como set de datos aquellos alelos más frecuentes (> 5%) en el NOA y NEA, y analizamos su especificidad de unión a péptidos predicha por el algoritmo MHC Cluster (Thomsem y col., 2013). Este algoritmo estima la similitud entre las moléculas del MHC a partir de la afinidad de unión de cada una de ellas a un set de péptidos predefinidos. Como resultado arroja un árbol funcional donde se muestran grupos de alelos que podrían unir péptidos similares en cuanto a su composición aminoacídica y un *heatmap* que grafica la similitud entre cada una de las moléculas del MHC individualmente.

Como resultado (Figura 27 A, centro), encontramos que en el árbol funcional se pueden distinguir 3 grandes grupos con diferente similitud de unión a péptidos (las tres ramas que se distinguen desde el centro del árbol). Otra manera de visualizar en más en detalle la similitud funcional entre los diferentes alelos es el uso de mapas de calor o *heatmaps* (Figura 27 B), en el cual el color rojo indica mayor similitud funcional mientras que el amarillo, menor.

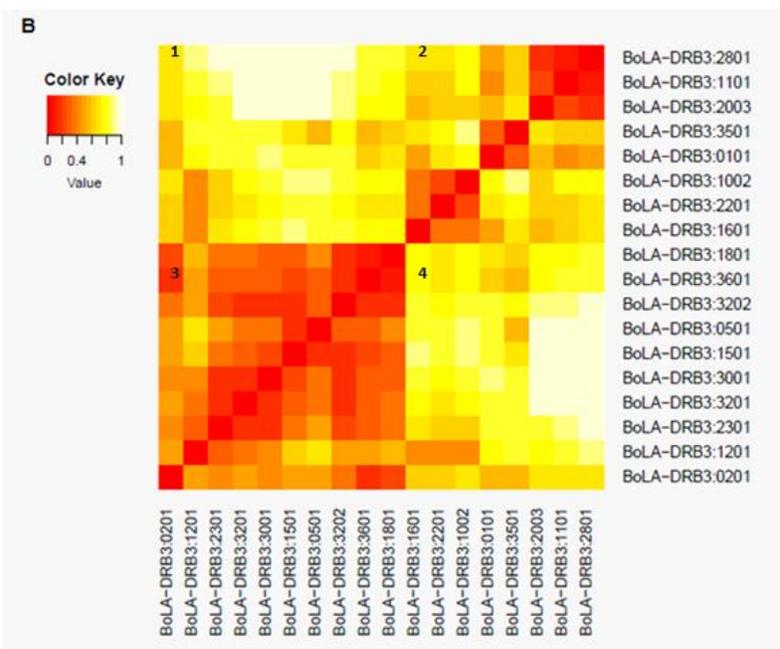
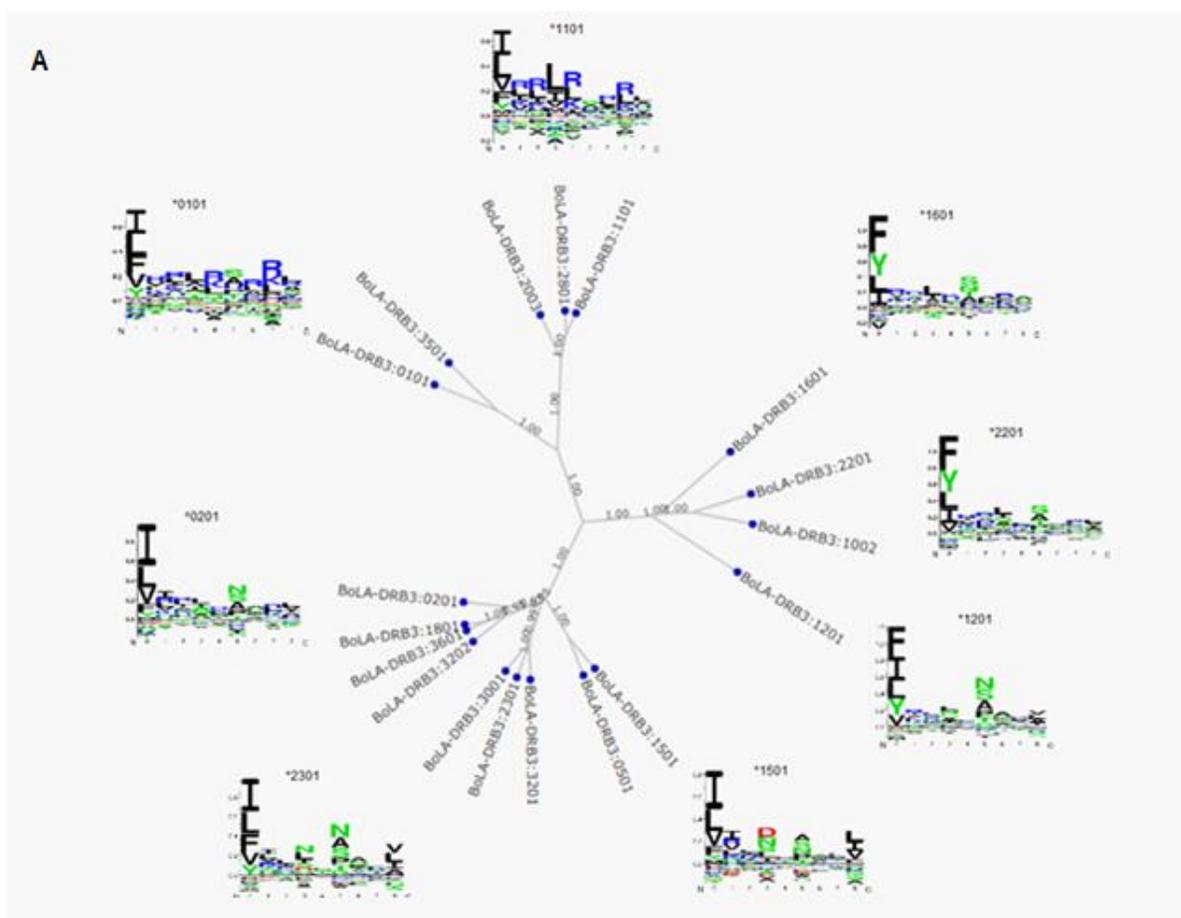


Figura 27: Análisis de funcionalidad de alelos BoLA-DRB3 más prevalentes en el NOA y NEA. A: árbol funcional. B: heatmap.

El análisis de heatmap, además de mostrar la similitud entre las moléculas a nivel individual, nos permitió determinar la existencia de 3 grupos funcionales de la misma manera que lo hace que el árbol funcional, lo que se puede observar en los 3 cuadrantes bien diferenciados (cuadrantes 1, 2 y 3 (el cuadrante 1 y 4 son iguales) (Figura 27 B).

Si bien el análisis de la secuencia de aminoácidos del PBR de la sección 5 de resultados mostró que estos son similares entre razas, los análisis de funcionalidad resultan más informativos a la hora de distinguir grupos funcionales con similitud de afinidades de unión a péptidos.

#### 1.4-Frecuencias genotípicas de los alelos BoLA-DRB3 y estructuración poblacional

El análisis del equilibrio de HWE permite determinar si una población evoluciona, o si por el contrario sus frecuencias alélicas permanecen constantes. En nuestro caso realizamos un análisis de posibles desviaciones de HWE mediante el cálculo de índices  $F_{IS}$  para cada raza. Las razas Criollo, Nelore, Brahman y Brangus exhibieron un exceso significativo de homocigotas, mientras que, aunque el  $F_{IS}$  para Braford también es mayor que cero, el mismo no resultó significativo (Tabla 6).

Para evaluar el grado de diferenciación genética entre las cinco razas estudiadas se utilizó el índice  $F_{ST}$ . Este índice revela diferencias significativas entre todas las razas de ganado ( $F_{ST}=0,052$ ,  $P<0,001$ ). Además, también se observan valores significativos de diferenciación entre razas para todas las comparaciones por pares ( $P<0,001$ ) con valores desde 0,029 entre Braford y Brangus hasta 0,117 entre Brahman y Criollo (Figura 28 A). Estos resultados demuestran que, aunque relativamente baja en la mayoría de los casos, existe una diferenciación genética significativa entre todas las razas.

Otra manera de determinar los niveles de diferenciación genética entre razas es mediante AMOVA, el cual mide la varianza molecular y permite compararla en diferentes grupos. Los resultados revelaron que el porcentaje de variación entre razas fue del 5,60 % cuando los alelos se codificaron como estados discretos y del 4,50 % cuando se incluyó la divergencia de secuencia en el análisis ( $P<0,001$ ).

#### 1.5-Relaciones poblacionales basadas en frecuencias de alelos BoLA-DRB3.2

La relación genética entre las razas se determinó mediante el estudio de las distancias genéticas entre razas utilizando coeficientes de Wright ( $F_{st}$ ) y las distancias genéticas de Nei (Figura 28), los cuales miden el grado de diferenciación genética entre razas. Los valores de  $F_{st}$  entre razas y el árbol UPGMA, el cual agrupa las razas de acuerdo con las distancias de Nei, mostraron que, de acuerdo

---

con lo esperado, la distancia genética entre el tipo taurino y cebuino es amplia (Figura 28 A y B). Esto coincide con sus orígenes históricos y geográficos. Otra forma de simplificar las variantes y visualizar las distancias es el MDS (Figura 28 C). Las dos primeras coordenadas explican acumulativamente el 98,07 % de la variabilidad de los datos. La primera coordenada explica el 77,30% de la varianza total y mostró un patrón bien claro de diferenciación entre la raza criollo (tipo *Bos taurus*) y las demás razas. Por su parte, la raza Brahman (tipo *Bos indicus*) se encontró en el extremo opuesto de esta coordenada, indicando que son tipos completamente diferenciados. Por su parte, la segunda coordenada solo explica el 20,77% de la variación total y diferenció únicamente a la raza Nelore (tipo *Bos indicus*) de las demás razas. La tercera coordenada (no mostrada en la Figura) explica el 1,93% de la varianza y no aportó información sustancial sobre la diferenciación genética de las razas. Estos resultados están acordes con el árbol de UPGMA, debido a que ambos tipos de análisis coinciden en diferenciarlas razas taurinas y cebuinas y agrupan de manera similar a las razas mixtas.

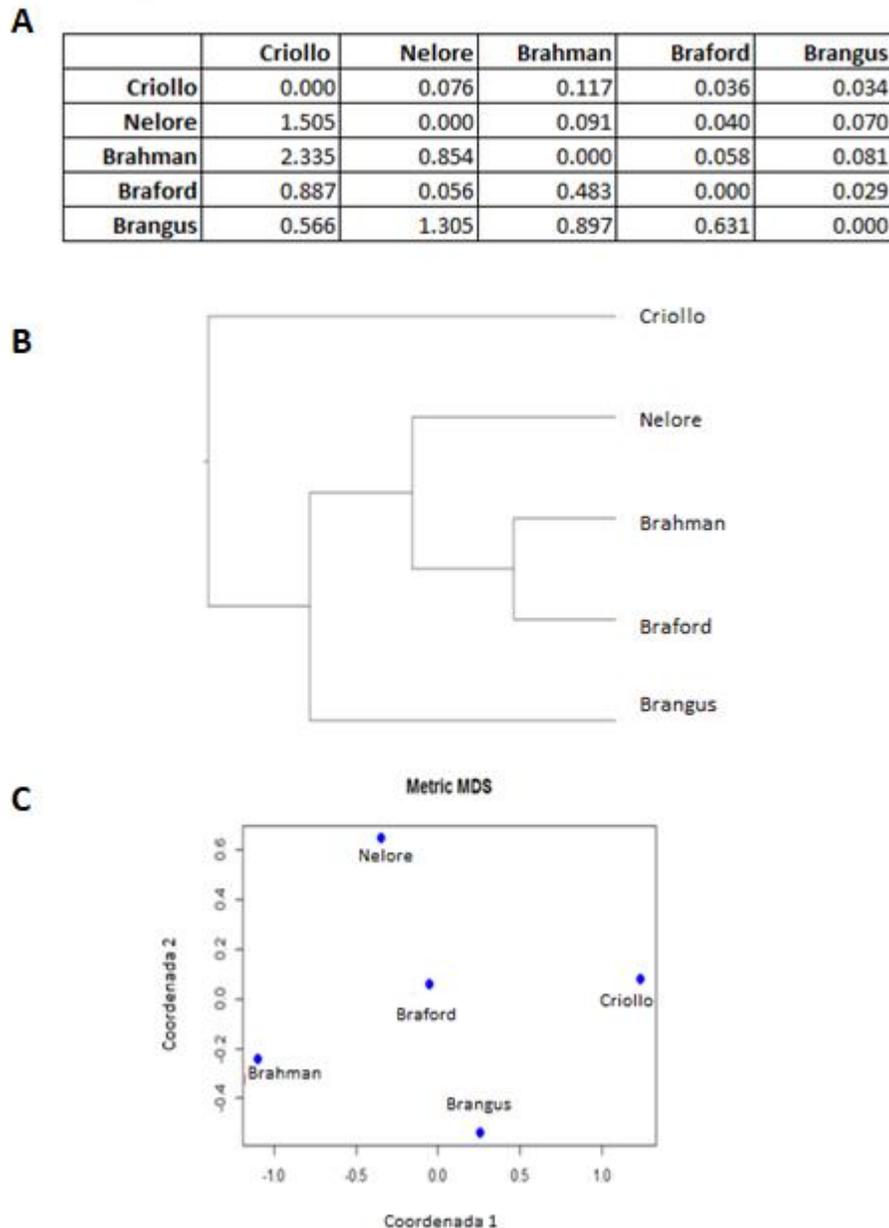


Figura 28: Estructuración y relaciones de las poblaciones. **A** Distancia genética entre pares de razas estimada por los estadísticos  $F$  de Wright ( $F_{ST}$ ) (arriba) y la distancia  $DA$  de Nei (abajo). **B** Árbol de distancia de Nei. Análisis de escalamiento multidimensional métrico (MDS) de genotipos *BoLA-DRB3.2* en cinco razas de ganado.

### 1.6-Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó mediante la construcción de árboles de Máxima Verosimilitud (ML) a partir de secuencias de nucleótidos de *BoLA-DRB3.2* (Figura 29). El árbol resultante no mostró agrupaciones significativas entre linajes de alelos y razas. Como era de esperar, la mayoría de los

grupos se formaron de acuerdo con su respectiva nomenclatura de alelos, que se basa en la secuencia de nucleótidos (Davies y col., 1997; Maccari y col., 2018) y, por lo tanto, confirma la asignación correcta de los alelos realizada en este y los otros estudios.

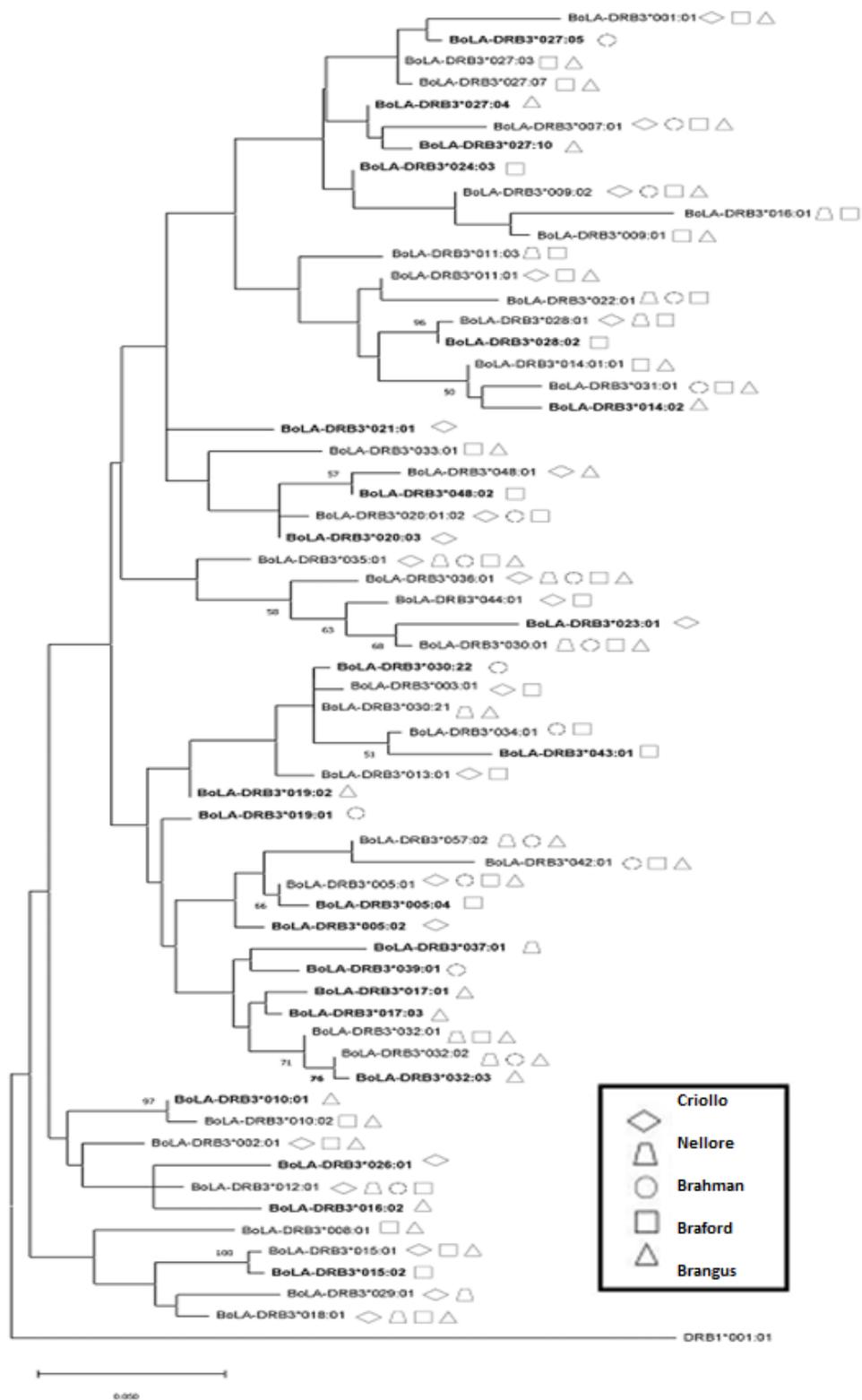


Figura 29: Análisis filogenético entre alelos BoLA-DRB3. Los alelos privados están resaltados. Los valores de remuestreo menores a 50 no están mostrados.

En síntesis, con todos estos análisis realizamos una caracterización genética exhaustiva y totalmente novedosa de las cinco razas bovinas criadas bajo uso extensivo en el norte de Argentina y otras regiones subtropicales de América del Sur. Los análisis mostraron que, de acuerdo con el tipo de manejo productivo, todas estas razas están bien diferenciadas genéticamente. Por el contrario, el análisis de secuencias de PBR a nivel de aminoácidos no muestra diferencias en la funcionalidad del BoLA-DRB3.2 entre poblaciones, excepto para Braford. A partir de estos resultados pudimos realizar los siguientes análisis de esta tesis, teniendo en cuenta que esta restricción funcional en el PBR es clave para la predicción bioinformática de los epitopes T y la correcta asignación de los péptidos obtenidos por inmunoproteómica.

## **2- Predicción e identificación de epitopes T de *Babesia bovis* mediante análisis inmunoinformáticos**

### 2.1- Análisis inmunoinformáticos

La inmunoinformática es una disciplina con gran potencial para acelerar el descubrimiento de nuevos antígenos y contribuir al desarrollo vacunas más seguras y eficaces. En este trabajo, utilizamos la misma para predecir epitopes T de una cepa virulenta de *B. bovis* utilizando el algoritmo NetBoLAIpan (Fisch y col., 2021) específicamente entrenado para este fin.

Teniendo en cuenta la información recabada en el O.E.1 sobre los alelos BoLA-DRB3.2 presentes en mayor frecuencia en el NEA y NOA, se realizó la predicción inmunoinformática de los epitopes T de *B. bovis*. Para realizar estas predicciones, utilizamos la cepa S2P de Argentina debido a que la misma es una cepa virulenta muy caracterizada a nivel fenotípico y se mantiene en cultivo lo que resulta muy útil para los posteriores experimentos proteómicos. Dado que el genoma de S2P no estaba disponible, fue necesario secuenciar el mismo. El mismo se secuenció utilizando tecnología Illumina a partir de ADN genómico de un cultivo de eritrocitos infectados con esta cepa, obteniendo un total de 16.510.667 secuencias de una longitud promedio de 150pb. Se evaluó la calidad de estas, siendo el promedio del puntaje Phred de 36 (Figura 30) lo que indica alta calidad de las secuencias (máximo 36). Se encontraron secuencias duplicadas con un nivel >10, lo que resulta consistente con las secuencias repetitivas que se conoce que posee el genoma de *B. bovis* (Brayton y col., 2007). La cobertura del genoma de S2P fue de 309X.

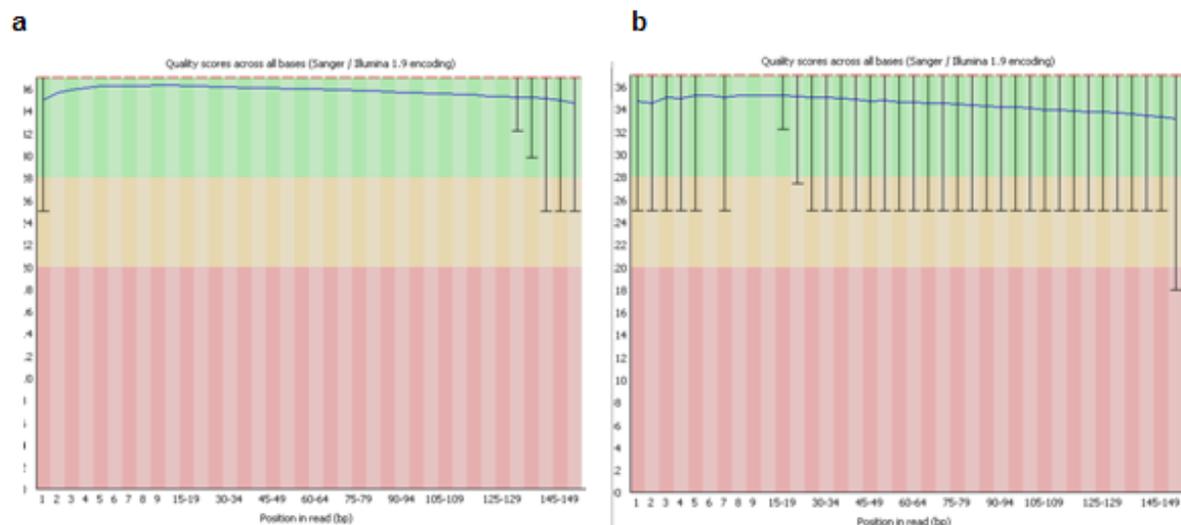


Figura 30: Puntajes de calidad a lo largo de la secuencia obtenida, utilizando FastQC. Referencias: a. secuenciación *Forward*, b. secuenciación *Reverse*.

Luego de confirmar que las secuencias resultantes eran de muy buena calidad, se prosiguió con un pre-procesamiento de las secuencias donde se removieron los adaptadores y también se eliminaron puntualmente aquellas bases de menor calidad fijando un umbral de calidad Phred > 20.

El genoma de S2P fue ensamblado de *novo* con el programa SPAdes reconstruyendo 59 contigs con un  $N_{50}=172148$ . El contenido de GC fue calculado en un 42%. Los contigs obtenidos fueron alineados, ordenados y orientados contra el genoma de referencia de la cepa estadounidense T2B (accesión AAXT02 del NCBI). A partir de esto, se obtuvieron las pseudomoléculas correspondientes a los cuatro cromosomas del parásito y dos genomas extranucleares correspondientes a la mitocondria y el apicoplasto. El tamaño del genoma resultó de 8.016.032 pb y de un tamaño similar a los genomas de las otras cepas de *B. bovis* ya reportadas (Brayton y col., 2007). Para continuar con la anotación de genes estructurales y funcionales las pseudomoléculas obtenidas fueron procesadas y se realizaron también los análisis comparativos y la visualización de los resultados obtenidos. Como resultado de este análisis, se anotaron 2794 genes en total correspondientes a 373, 586, 875 y 923 genes para los cromosomas 1, 2, 3 y 4, respectivamente, 36 para el apicoplasto y 1 para la mitocondria.

Debido al gran número de genes de *B. bovis*, la dificultad técnica de manejar la gran cantidad de datos y la imposibilidad económica de sintetizar cientos de péptidos T para su posterior validación *in vitro*, fue necesario seleccionar un subset de genes sobre los cuales realizar las predicciones bioinformáticas de epítopos T. Así, una vez completada la secuenciación y anotación del genoma de

---

S2P se continuó con la selección de genes sobre los cuales realizar dichas predicciones. A partir de datos publicados sobre estudios transcriptómicos comparativos entre el estadio merozoíto presente en el bovino y el estadio esporozoíto presente en el vector (Ueti y col, 2020) decidimos seleccionar en un primer paso aquellos genes cuya expresión estuviera incrementada al menos 20 veces en el estadio de merozoíto. Este criterio de selección fue diseñado por nosotros para seleccionar genes específicos de este estadio presente en el bovino y con mayor nivel de expresión. Para ello se partió de un total de los 2794 genes nucleares anotados de la cepa S2P utilizada en esta tesis.

Un total de 165 genes cumplían esta condición de sobreexpresión en merozoítos. A partir de este subconjunto de 165 genes, se evaluó la presencia de péptido señal y se eligieron 58 genes. De este subgrupo de genes, se seleccionaron 39 genes que no tuvieran dominio transmembrana. Estos dos criterios de selección fueron adoptados para seleccionar proteínas secretadas, ya que se conoce que tienen mayor probabilidad de estar expuestas a la membrana del parásito o del glóbulo rojo y así ser detectadas por el sistema inmune y eliminar proteínas que pudieran quedar ancladas a la membrana. El subconjunto de estos 39 genes fue traducido para conocer su secuencia aminoacídica, y posteriormente verificamos en cada uno de ellos que no presenten homología significativa con el proteoma de *B. taurus*. Como resultado se descartó 1 solo gen (BBOV\_IV010360, codificante para una proteasa aspártica) que sí presentó regiones similares entre el genoma de *B. bovis* y *B. taurus*. Adicionalmente, se incluyeron 3 genes que, si bien no se encontraron sobreexpresados en el estadio sanguíneo de acuerdo a los datos transcriptómicos, el grupo de Gohil y col., reportó que se expresan en la membrana del eritrocito durante la infección. Con el agregado de estos últimos 3 genes, el total de candidatos para la predicción fueron 41 genes (Tabla 10). Los diferentes criterios utilizados se resumen en la Figura 31 y la lista de los 41 genes en la Tabla 10.

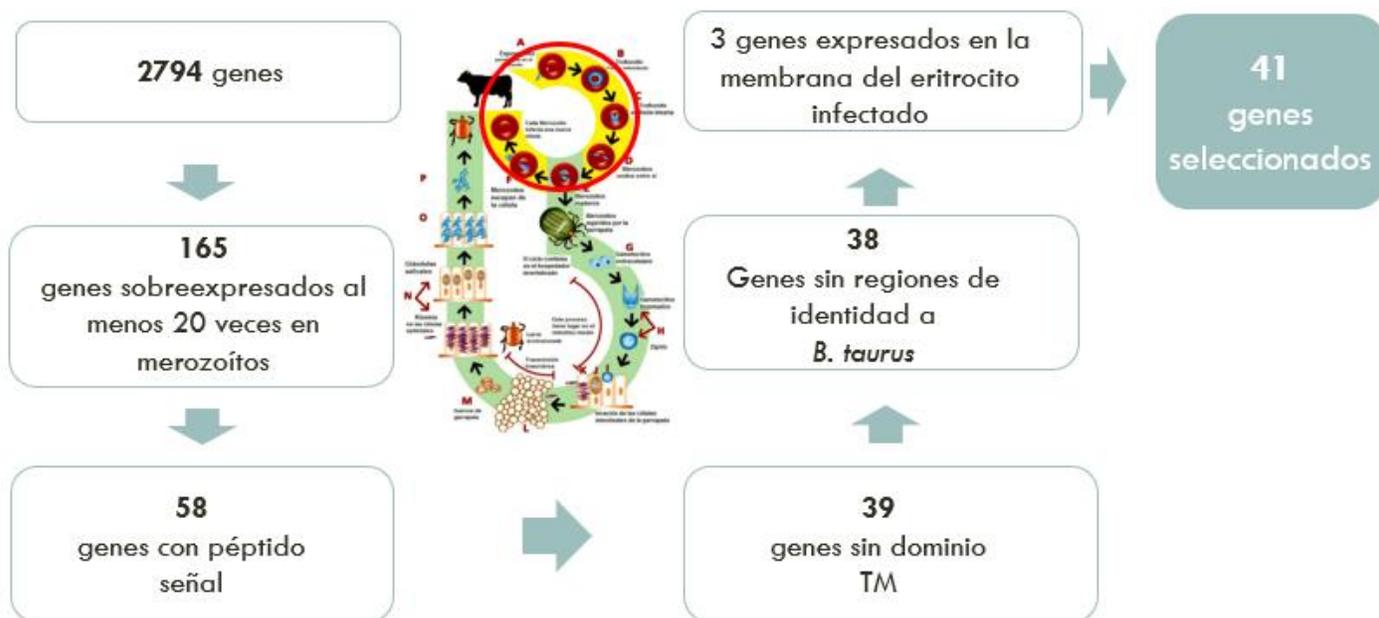


Figura 31: Esquema para ilustrar la secuencia de análisis utilizada para la predicción de péptidos T de *B. bovis*.

Tabla 10: Genes seleccionados para la predicción de péptidos T.

Gen	Nombre	Incremento en veces	Cantidad de péptidos T predichos
BBOV_I003060	MSA-1	170,4330918	1
BBOV_I003010	MSA-2a1	161,6336152	0
BBOV_I003000	MSA-2a2	139,6117534	0
BBOV_I002990	MSA-2b	133,0867042	0
BBOV_I002880	Proteína hipotética	132,0409008	1
BBOV_IV005390	SBP4	129,3389084	1
BBOV_IV005120	Proteína de membrana putativa	125,2164288	1
BBOV_II002580	Proteína de membrana putativa	113,2752503	0
BBOV_IV000780	Proteína hipotética	111,4519042	1
BBOV_I001680	Proteína hipotética	111,1249125	1
BBOV_IV011430	Proteína de membrana putativa	107,4206191	10
BBOV_I003130	Proteína hipotética	101,5588586	1
BBOV_IV009870	RAP-1	94,23662238	1
BBOV_IV004810	Proteína de membrana putativa	93,59866215	1
BBOV_I003020	MSA2c	85,392288	1
BBOV_II002570	Proteína de membrana putativa	84,09372511	1
BBOV_IV001030	Proteína hipotética	78,82300495	1
BBOV_II002820	Proteína de membrana putativa	69,94925498	1
BBOV_III003710	Proteína hipotética	69,69897685	0

BBOV_IV005950	Proteína de membrana putativa	63,56083557	1
BBOV_IV001370	Proteína con dominio MAC/perforina	62,09673241	4
BBOV_IV008970	Proteína de membrana putativa	49,01569895	2
BBOV_II001760	Proteína hipotética	42,389266	0
BBOV_IV009860	RAP-1	35,66288688	1
BBOV_IV001040	Proteína hipotética	35,42389848	0
BBOV_II007850	Proteína de membrana putativa	34,01189139	0
BBOV_IV009170	Proteína de membrana putativa	29,98591078	0
BBOV_IV012010	Proteína hipotética	29,87265539	0
BBOV_I001020	Proteína hipotética	29,83599016	0
BBOV_IV008150	antígeno12D3	29,37183049	1
BBOV_IV000670	Proteína hipotética	27,35516337	0
BBOV_III001600	Proteína hipotética	27,04520644	0
BBOV_III003290	Proteína hipotética	24,20701717	1
BBOV_IV000770	Proteína hipotética	22,78922868	1
BBOV_III006500	SBP2	21,89915163	0
BBOV_III006480	SBP2	20,81901711	3
BBOV_IV001070	Proteína putativa disulfuro isomerasa	20,81558597	2
BBOV_II007340	Antígeno asociado a la membrana del eritrocito	2,346893149*	0
BBOV_II004730	Proteína hipotética	1,989097461*	0
BBOV_IV009240	Proteína hipotética	0,831147586*	2

Referencias: \* Genes que no están sobreexpresados en merozoítos, pero que está reportado que se expresan en la membrana del eritrocito durante la infección.

Al analizar esta lista de 41 genes, encontramos que los genes seleccionados resultaron ser principalmente genes que codifican para proteínas de membrana putativas, proteínas hipotéticas, proteínas de superficie del merozoíto (MSA), proteínas asociadas a la membrana del eritrocito y proteínas secretadas por el complejo apical típico de los apicomplejos, como son RAP (proteínas asociadas a las roptrias) y SBP (proteínas del cuerpo esférico). A partir de la secuencia de proteínas correspondientes a estos 41 genes, obtenidas mediante la traducción *in silico*, se realizaron entonces las predicciones de epitopes T. Para ello se seleccionó el alelo bovino DRB3\*001:01 que fue uno de los que se encontró en alta frecuencia en los alelos presentes en el norte argentino (razas criollo y Brangus) y además se encontraba presente en el rodeo de animales presentes en el campo experimental de INTA, los cuáles luego iban a ser utilizados para la validación experimental con los péptidos sintéticos. Debido a la alta cantidad de péptidos que el programa predice a partir de una proteína (aproximadamente 100), debimos acotar las predicciones a un solo alelo. Los análisis se

realizaron de manera individual para cada secuencia de aminoácidos utilizando el servidor NetBoLAllpan. Este programa permite, a partir de una secuencia aminoacídica, predecir qué péptidos de esta serán capaces de asociarse a un determinado alelo del BoLA clase II asignando un puntaje de afinidad de unión (Fisch y col., 2020).

Aquellos péptidos con alto puntaje de afinidad de unión al alelo \*001:01 fueron seleccionados. De las 41 proteínas analizadas, en 36 de ellas se obtuvieron uno o más péptidos T capaces de unirse al alelo *DRB3\*00101*. Por el contrario, en 5 proteínas correspondientes a los genes *BBOV\_I001020*, *BBOV\_I1001600*, *BBOV\_IV000670*, *BBOV\_IV009170* y *BBOV\_IV012010* el programa no predijo ningún péptido (Tabla suplementaria B). En particular, el péptido correspondiente a la proteína EDO05384.1 (MSA-2c) se superpone parcialmente con un péptido HDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDT reportado previamente, el cuál demostró ser inductor de la producción de anticuerpos e IFN- $\gamma$  en ensayos de ELISA y citometría de flujo (Hidalgo Ruiz y col., 2022) (Figura 32).

```

MVSFNIITVAFCSILFNAYAVASPQEEAVPTKQVNGSHLLFDDMKMLYDVMRSIDESMLKSILEKNF
EAVGMEATSATKTHDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDTLDLEYLSGQSNEELLKLLIEAIYGMETII
EKTNSFVGESAKHSDKLDTDLRQY YWDNI YDDQSEYNKDKLSNLYKAFITDSGALRIASEELIKFE
TRKAQKDDYRFINPSSSTSEAETPSPSSGENTAAQP PKPAETPKPTGSSFTYGGTLVATLCYFVLSA
F

```

Figura 32: Secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2c (nº de acceso: XP\_001608952.1). Referencias: subrayado celeste: péptidos predichos mediante herramientas bioinformáticas en este trabajo; subrayado rosa: péptido identificado en Hidalgo y col., 2022; violeta: péptido identificado mediante inmunoinformática en este trabajo.

Finalmente, los 40 péptidos resultantes fueron sintetizados comercialmente (tabla 11), para su posterior validación por ELISA o citometría de flujo. Adicionalmente se sintetizó 1 péptido no relacionado del mismo tamaño y proveniente de *Mycobacterium bovis*, para utilizar como control negativo.

Tabla 11: Péptidos seleccionados por análisis inmunoinformáticos.

Número	Péptido	Gen
1	KEMLISYVKNLLKAG	<i>BBOV_I001680</i>
2	VKPIKPTSPRSKRNR	<i>BBOV_I002880</i>
3	THDALKAVKQLIKTD	<i>BBOV_I003020</i>
4	YDDFVTAKKLARVNT	<i>BBOV_I003060</i>
5	AKWLEDSGIVKKEEG	<i>BBOV_I003130</i>
6	KKGDVDLSVLKERIS	<i>BBOV_I1002570</i>

7	KKGEVDLSMLKKRIS	<i>BBOV_II002820</i>
8	DTDTANTAIVSKTK	<i>BBOV_III003290</i>
9	DDQPIKSKISAKKTR	<i>BBOV_III006480</i>
10	HDPAAVAIVNSRGKS	
11	RNKQLEKTRNNVKEY	<i>BBOV_IV000770</i>
12	TRYITEAILSLKNFP	<i>BBOV_IV000780</i>
13	VERIVNHEPKKKWQD	<i>BBOV_IV001030</i>
14	KSTISSHAIKRREVD	<i>BBOV_IV001070</i>
15	NDLVHYAYKMHRLESE	<i>BBOV_IV001070</i>
16	MDNVFKSLLGRKSCK	<i>BBOV_IV001370</i>
17	NPPVTIASMQSKTGP	
18	EKPVNPGARKNKPDD	
19	KSKLKAASKLKKG	
20	SVSDINIGEVVNKDS	<i>BBOV_IV004810</i>
21	FRELKADMAQKVDD	<i>BBOV_IV005120</i>
22	APAILHADLQNKFID	<i>BBOV_IV005390</i>
23	RSVAVKIHVGDRRKRA	<i>BBOV_IV005950</i>
24	DSVMKYSPTGAKEHP	<i>BBOV_IV008150</i>
25	DKIAVLSVAPKKGHK	<i>BBOV_IV008970</i>
26	KDKIDEVLIRLKSDS	
27	RERNLNKSRIQVKRT	<i>BBOV_IV009240_1</i>
28	YRPMIYARIGRIRND	
29	AKNFISAAHEGTKQF	<i>BBOV_IV009860 y BBOV_IV009870</i>
30	PYQLDAAFRLFKESA	<i>BBOV_IV009860 y BBOV_IV009870</i>
31	WQVELKEVYVGKRKV	<i>BBOV_IV010360</i>
32	AMPVRKNVVVKKGKK	<i>BBOV_IV011430_1</i>
33	VAQINKAMLQTKDMN	
34	SKQMKVADVVGKNVR	
35	TLVAQINKAMLQTKD	
36	YDSAIMFSELAHRYH	
37	KPDLYAHKVKKPKKM	
38	PDLYAHKVKKPKKMT	
39	RKNVVVKKGKKAKAD	
40	ESPIVSNTTEEKPT	
41	VVRFQEAANKQKQEL	Control

Los 41 péptidos seleccionados fueron utilizados en ensayos *in vitro* de medición de IFN- $\gamma$  liberado por PBMCs bovinos obtenidos de 6 animales con sus alelos BoLAII tipificados tal como se describirá en la sección 2.3.

## 2.2- Validación experimental de los péptidos predichos

Una vez realizadas las predicciones bioinformáticas, los péptidos candidatos obtenidos deben ser validados para confirmar que sean verdaderos epitopes T. Es decir, evaluar si son capaces de efectivamente unirse al BoLAII, para de esta manera ser presentados a los linfocitos T, y que estos respondan produciendo citoquinas de perfil Th1 como el IFN- $\gamma$ . Para ello utilizamos una técnica que permita medir esta citoquina, como el ELISA-

Para realizar estos experimentos debíamos contar con bovinos previamente infectados con *B. bovis*, para que sus linfocitos T, en caso de reconocer nuevamente un epítotope T inmunogénico, desarrollen la respuesta inmune específica. Como la provincia de Buenos Aires es una zona naturalmente libre de babesiosis decidimos infectar experimentalmente 5 animales (bovinos 473, 475, 483, 486 y 492) de la raza Hereford con la cepa patógena S2P de *B. bovis*. Los 5 bovinos más un bovino no infectado, para utilizar a modo de control, fueron tipificados para el alelo BoLA- DRB3.2 (Tabla 13) para luego poder evaluar qué péptidos pueden ser presentados por los diferentes alelos del BoLA. Todos los bovinos resultaron ser heterocigotas. El alelo \*026:01 fue encontrado en 4 de los 6 animales, representando una frecuencia de 0,66.

En primer lugar, se confirmó por PCR para el gen *ves $\alpha$*  la ausencia del parásito antes de la infección experimental (Figura 33 A). Los animales fueron inoculados con una dosis alta de la cepa S2P para asegurar la infección patente. Los mismos comenzaron a mostrar un leve decaimiento a partir del día 7 post-infección, cuando se confirmó por PCR la presencia del parásito (Figura 32 B). Los animales fueron tratados con 1, 2 o 3 dosis del fármaco antiparasitario según fue necesario, cuando su hematocrito disminuyó un 30% durante 3 días seguidos (Tabla 12). Los bovinos continuaron siendo monitoreados mediante la toma de temperatura rectal y medición del hematocrito hasta su recuperación en términos de temperatura, hematocrito y signos clínicos.

Tabla 12: Monitoreo de animales infectados experimentalmente con *B. bovis*.

	día 0	día 5	día 6	día 7	día 8	día 9	día 10	día 11	día 12	día 14	día 26
<b>Bovino 473</b>											
T (°C)	38.5	39.3	39.4	39.1	39.2	41	41	38.2	38.2	38.5	38.5
Hto (%)	38	38	38	32.5	25	25	25	20	20	20	35
<b>Bovino 475</b>											
T (°C)	38.5	38.7	39.8	38.5	39.8	40.5	40	38.5	38.2	38.5	38.5
Hto (%)	35	36	29	30	25	25	25	17	20	20	35
<b>Bovino 483</b>											
T (°C)	38.5	38.3	39	39.2	39.8	41	41	41	38.7	38.3	38.5
Hto (%)	35	35	38	35	25	25	25	17	15	15	32.5
<b>Bovino 486</b>											
T (°C)	38.5	38.6	38	40	40.2	38.5	38.5	38.2	37.8	38.3	38.5
Hto (%)	35	32.5	26	30	20	25	25	25	25	25	32.5
<b>Bovino 492</b>											
T (°C)	38.5	38.6	39.9	40.6	41	41	41	37.8	37.6	38.3	38.5
Hto (%)	35	31	34.5	30	25	20	20	19	17.5	20	32.5

El sombreado indica los días en que los animales recibieron las dosis de tratamiento.

Tabla 13: Tipificación de los bovinos utilizados para el gen BoLA-DRB3.

Bovino	Alelos
473	001:01 y 018:01
475	002:01 y 016:01
483	001:01 y 026:01
486	015:01 y 026:01
492	009:02 y 026:01
494	001:01 y 026:01

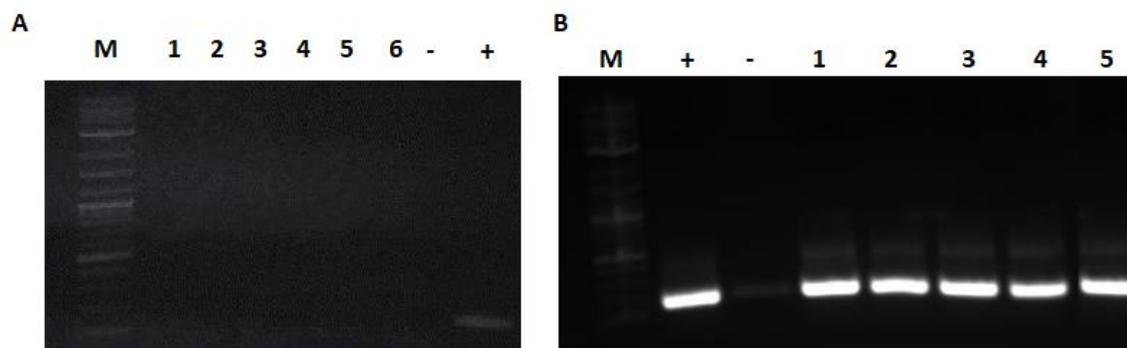


Figura 33: PCR para verificar la presencia de *B. bovis*. A- PCR pre infección B- PCR día 10 post infección. Referencias: M: Marcador; -: control negativo; +: Control positivo; 1,2,3,4,5,6: animales 473, 475, 483, 486, 492, 494, respectivamente.

Una vez que contamos con los bovinos previamente infectados con *B. bovis*, se dividieron al azar los 40 péptidos predichos por bioinformática en 4 grupos o pooles de péptidos, numerados de acuerdo con la Tabla 11:

Pool 1: péptidos 1, 4, 5, 12, 17, 20,21, 22, 30, 35, 36.

Pool 2: péptidos 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14.

Pool 3: péptidos 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28.

Pool 4: péptidos 29, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 40.

La determinación de la producción de IFN- $\gamma$  se realizó con el kit comercial BOVIGAM (Thermo Fisher) el cual está basado en la detección de la producción de esta citoquina mediante un inmunoensayo enzimático tipo sándwich basado en anticuerpos monoclonales específicos.

Para este ensayo, 6 meses después de la infección de los 5 bovinos, la sangre entera heparinizada de los mismos y del bovino control (494) fue incubada durante 24 hs con los péptidos diluídos en medio RPMI sin aditivos o con sus controles resuspendidos en el mismo medio. Al finalizar la incubación se obtuvo el plasma por centrifugación, el cual se utilizó para realizar el ELISA. Finalmente, la absorbancia fue medida a 450 con un filtro de referencia a 620 nm., tal como indica el protocolo del kit. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de ELISA para validar pooles de péptidos.

	P1	P2	P3	P4	-	+	MZ
<b>473</b>	0,18	0,546	0,049	0,045	0,044	2,982	0,522
<b>475</b>	0,277	0,269	0,032	0,238	0,039	2,816	0,58
<b>483</b>	0,073	0,067	0,066	0,284	0,073	2,692	0,434
<b>486</b>	0,059	0,052	0,069	0,167	0,049	2,807	0,103
<b>492</b>	0,08	0,049	0,05	0,096	0,057	3,015	0,372
<b>494 (C)</b>	0,052	0,051	0,054	0,136	0,063	1,888	0,086

Referencias: P1-P4: pooles de péptidos, -: control negativo, + control positivo, Mz: lisado de merozoítos de *B. bovis*, (C) bovino no infectado. En rojo se muestran los valores que superan el punto de corte.

Como se puede apreciar, no se observó producción de IFN- $\gamma$  al estimular las células sanguíneas del bovino control (494), ya sea con pooles de péptidos o con el lisado de merozoítos, confirmando que la respuesta obtenida por estas preparaciones en el resto de los bovinos es específica. La sangre del bovino 492 no reaccionó a ninguno de los pooles. La sangre del bovino 473 resultó positiva para la estimulación con los pooles 1 y 2, la del bovino 475 para los pooles 1,2 y 4, y la del bovino 483 y 486

para el pool 4. En base a estos resultados, los péptidos correspondientes al pool 3 fueron eliminados del estudio.

Para determinar cuál de los péptidos presentes en cada pool está estimulando la producción de IFN- $\gamma$ , los pooles que resultaron positivos para cada bovino fueron abiertos y los péptidos se incubaron individualmente con cada muestra de sangre entera. Lamentablemente, el bovino 486 falleció durante la experiencia por causas ajenas al protocolo experimental por lo que no se pudo continuar el estudio con este animal. Los resultados del análisis individual de cada péptido con cada bovino se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de ELISA para validar péptidos individualmente.

Controles	473	475	483
-	0,051	0,035	0,081
+	3,006	2,618	2,648
Mz	0,1	0,285	0,481

Péptidos	473	475	483
1	0,032	0,038	
4	0,037	0,033	
12	0,07	0,048	
17	0,055	0,064	
22	0,05	0,042	
30	0,057	0,039	
35	0,057	0,045	
36	0,058	0,04	
5	0,346	0,042	
2	0,134	0,035	
3	0,057	0,03	
6	0,065	0,036	
7	0,113	0,04	
8	0,058	0,042	
9	0,055	0,043	
10	0,1	0,029	
11	0,066	0,028	
13	0,058	0,035	
14	0,048	0,082	
29		0,03	0,168
31		0,029	0,097
32		0,033	0,055
33		0,033	0,043

<b>34</b>		0,039	0,055
<b>37</b>		0,037	0,051
<b>38</b>		0,037	<b>0,127</b>
<b>39</b>		0,038	0,052
<b>40</b>		0,043	<b>0,254</b>

Referencias: P: pool, -: control negativo, + control positivo, Mz: lisado de merozoítos de *B. bovis*. En rojo se muestran los valores positivos.

En el caso del bovino 475, a pesar de que los pools de péptidos estimularon la producción de IFN- $\gamma$ , los péptidos individuales no pudieron generar esta respuesta. Por el contrario, en el bovino 473, 4 péptidos generaron respuesta de esta citoquina y en el bovino 483 fueron 3 los péptidos estimuladores. Los péptidos que fueron capaces de inducir la producción de IFN- $\gamma$  de se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16: Listado de péptidos T inductores de liberación de IFN- $\gamma$ .

Bovino	Alelos	Péptido	Nombre	Secuencia	Proteína
473	*001:01 y *018:01	2	BBOV_I002880	VKPIKPTSPRSKRNR	Proteína hipotética
		5	BBOV_I003130	AKWLEDSGIVKKEEG	Proteína hipotética
		7	BBOV_II002820	KKGEVDLSMLKKRIS	Proteína de membrana
		10	BBOV_III006480_2	HDPAAVAVNSRGKS	SBP2
483	*001:01 y *026:01	29	BBOV_IV009860	AKNFISAAHEGTKQF	RAP-1
		38	BBOV_IV011430_7	PDLYAHKVKPKKMT	Proteína de membrana
		40	BBOV_IV011430_9	ESPIVSNTTEEKPTE	Proteína de membrana

Estos resultados muestran que si bien algunos péptidos corresponden a antígenos ya conocidos y bien caracterizados como RAP-1 y SBP-2 que son antígenos relevantes en la invasión y respuesta inmune al parásito, este estudio permitió identificar 4 nuevos antígenos, los cuáles son proteínas hipotéticas y de membrana que no han sido descritas para el parásito y que tendrían un potencial antigénico que amerita su evaluación posterior.

Para confirmar si la subpoblación de células que producen IFN- $\gamma$  eran los linfocitos T CD4+, utilizamos la técnica de marcación intracitoplasmática de IFN- $\gamma$  seguida de análisis por citometría de flujo estimulando con los pools de péptidos y con los 7 péptidos confirmados por ELISA. Para esto aislamos los PBMCs tal como se describe en la sección 5 de M y M, y los cultivamos 4 días en presencia de los péptidos o sus respectivos controles. Al día 4, realizamos las marcaciones celulares con anticuerpos anti CD4 y anti IFN- $\gamma$  conjugados con distintos fluoróforos (Figura 33).

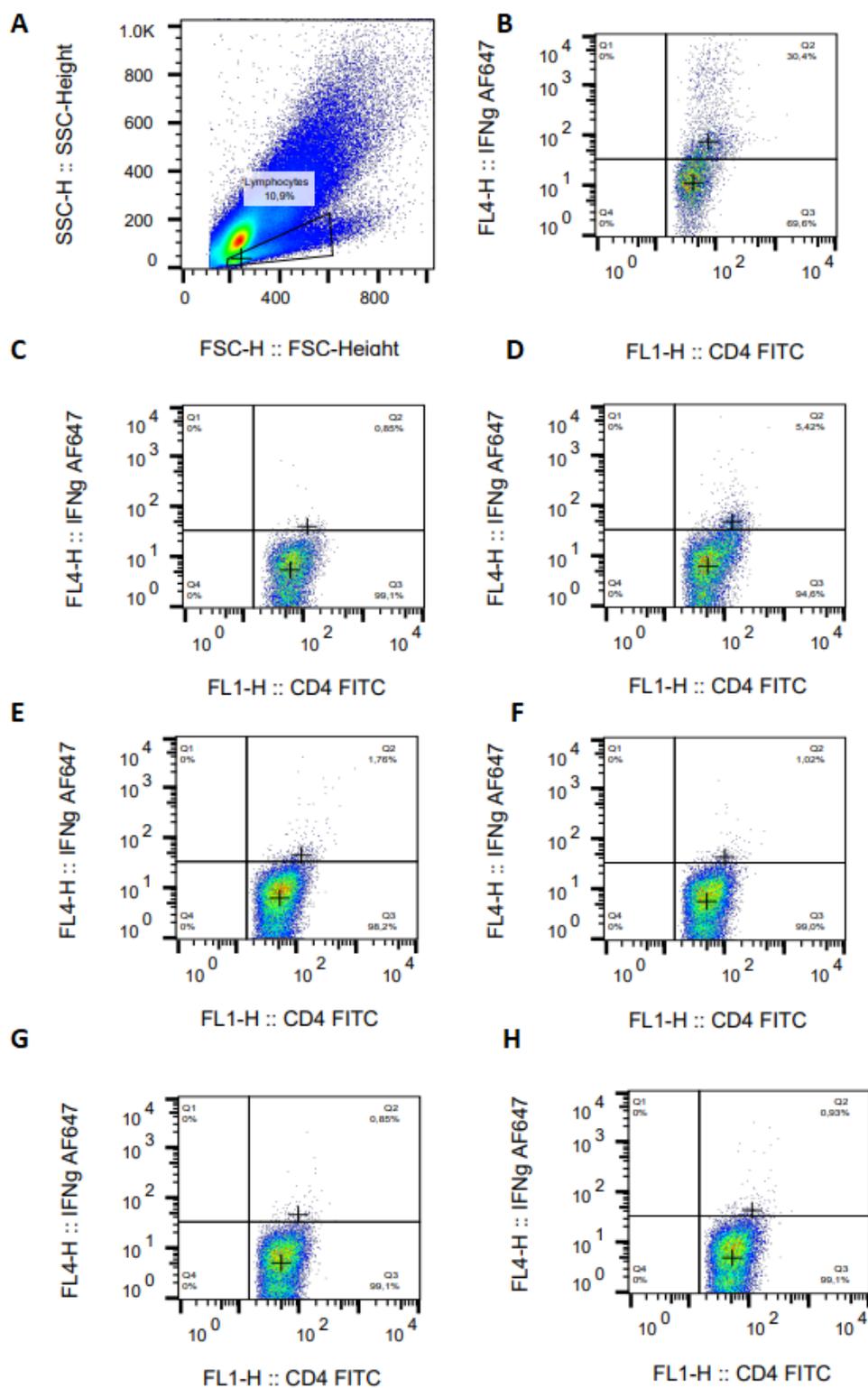


Figura 34: Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el bovino 473. Referencias: A- *gate* de linfocitos, B-H: células incubadas con distintos estímulos: B- Con A, C- RPMI, D- lisado de merozoítos, E- Pool de péptidos 1, F- Pool 2, G- Pool 3, H- Pool 4.

Los resultados mostraron que luego del día 4, la viabilidad obtenida es del 10%, un valor bastante bajo y que debe ser considerado para las conclusiones posteriores. Para el caso del bovino 473, la respuesta obtenida a los pools de péptidos es concordante con el ensayo de ELISA, demostrando que, aún con la poca cantidad de células viables de este ensayo, los linfocitos T CD4+ son al menos uno de los tipos celulares responsables de la producción de IFN- $\gamma$  ante la reestimulación con péptidos sintéticos de proteínas de *B. Bovis* (Figura 34).

Cuando quisimos estudiar por citometría de flujo la respuesta a los 7 péptidos individuales de este pool, tanto en el bovino 473 como en el bovino 483, no se observó producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+ (datos no mostrados). Este resultado nos indica que sería necesario evaluar la respuesta en cultivos estimulados durante más tiempo (entre 7 y 10 días).

Por último, evaluamos de manera bioinformática si los 7 péptidos que indujeron la producción de IFN- $\gamma$  tienen alta afinidad de unión con los alelos encontrados con alta frecuencia en el análisis realizado en el NOA y NEA, detallado en el punto 1.1 de resultados. Para esto utilizamos los 7 alelos *DRB3.2* presentes en el programa NetBoLAllpan, para los cuales, como mencionamos anteriormente, este programa fue entrenado con información proveniente de diversos análisis experimentales por espectrometría de masas y por ese motivo el cálculo de la afinidad de unión es muy exacto. Como también determinamos durante este trabajo de tesis dos motivos de unión, correspondientes a los alelos \*018:01 y \*026:01 (Tabla 16), a partir de los péptidos de *B. bovis* naturalmente presentados por el BoLAll de macrófagos bovinos, sumamos entonces la evaluación de la afinidad de unión de estos 7 péptidos a estos dos últimos alelos.

Como se puede observar en la Tabla 17, los péptidos 29 (RAP-1) y 40 (Proteína de membrana) tuvieron una probabilidad de unión fuerte no sólo al alelo \*001:01 de los bovinos de los cuales provinieron los datos experimentales de liberación de IFN- $\gamma$  sino que también el programa predice una unión débil a otros alelos de alta frecuencia en el muestreo realizado en esta tesis sobre las razas cebuinas utilizadas en el norte argentino.

Tabla 17: Predicción de afinidad de unión de los péptidos T identificados a diferentes alelos del BoLA-DRB3.

Péptido	*001:01	*010:01	*011:01	*012:01	*015:01	*016:01	*018:01	*020:01	*026:01
2	UF								
5	UF								
7	UF								
10	UF								
29	UF			UD		UD			
38	UF								
40	UF						UD		UD

Referencias: UF: unión predicha fuerte (puntaje de afinidad de unión <0.5); UD unión predicha débil (puntaje de afinidad de unión <5.0). Sombreado rosa: alelos disponibles en el NetBoLAllpan, celeste: motivos de unión a alelos generados en este trabajo.

En resumen, en esta tesis identificamos por primera vez 7 péptidos de *B. bovis* mediante herramientas bioinformáticas específicas para alelos clase II bovinos y realizamos su posterior validación experimental con relación a su capacidad de inducir una respuesta inmune específica de linfocitos con perfil Th1.

### 3- Identificación de epitopes T de *Babesia bovis* mediante inmunopeptidómica

Como se vió en la sección anterior, es posible predecir péptidos T con alta exactitud utilizando algoritmos bioinformáticos. Sin embargo, el abordaje de identificación de péptidos T que más se asemeja a lo que sucede naturalmente y por lo tanto aporta información más precisa sobre los mecanismos naturales de presentación antigénica es la inmunopeptidómica. Además, la información experimental obtenida resulta muy útil para a su vez entrenar los algoritmos de predicciones bioinformáticas de epitopes T para mejorar sustancialmente el desempeño de estos programas. Por estos motivos, decidimos estudiar el inmunopeptidoma T clase II de *B. bovis* presentado naturalmente por macrófagos bovinos cultivados en presencia del parásito.

#### 3.1 Ensayos de fagocitosis

Para realizar esta identificación de epitopes T de *B. bovis* en un contexto de infección natural, en primer lugar, resulta necesario obtener células presentadoras de antígenos (en nuestro caso macrófagos bovinos) los cuales son co-incubados con eritrocitos parasitados con *B. bovis*. El objetivo de estos ensayos es que los macrófagos fagociten eritrocitos parasitados imitando lo que sucede en condiciones naturales y que los macrófagos presenten sus péptidos en el contexto del BoLAll para luego poder proceder a la purificación de los mismos.

Para estos ensayos de fagocitosis, se utilizó un bovino sano (número 383) presente en el campo experimental de INTA, el cual fue genotipado para ambos alelos del gen BoLA-*DRB3*. Esta genotipificación se realizó mediante secuenciación del exón 2 gen BoLA-*DRB3* según descrito en la sección 3 de M y M. La secuenciación determinó que el bovino 383 resultó ser heterocigota para los alelos BoLA-*DRB3*\*018:01 y BoLA-*DRB3*\*026:01. A partir de este punto se obtuvieron cultivos de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos de dicho animal en cantidad suficiente para los posteriores análisis proteómicos. Para ello, se puso a punto un sistema de co-cultivos de macrófagos derivados de monocitos con glóbulos rojos infectados con *B. bovis* cepa S2P (la misma cepa que fue secuenciada y utilizada para las predicciones bioinformáticas) o con glóbulos rojos normales a modo de control. A partir de ensayos previos de co-cultivos en distintas condiciones (datos no mostrados), estimamos que a una MOI de 20:1 el porcentaje de fagocitosis era del 70%. Esta determinación se obtuvo con extendidos de macrófagos teñidos con Giemsa (Figura 19). El rendimiento de los cultivos primarios fue de aproximadamente  $16 \times 10^6$  macrófagos cada 450 ml de sangre extraída, la cual se obtuvo de manera quincenal. Para los análisis proteómicos se utilizaron  $1 \times 10^8$  macrófagos por condición (GR infectados con el parásito y GR control).

### 3.2 Expresión de BoLAII en macrófagos

Debido a que a partir de los ensayos de fagocitosis era necesario purificar el BoLAII expresado por los macrófagos para luego obtener los péptidos T de *B. bovis*, resultó de relevancia confirmar que los macrófagos bovinos obtenidos con nuestra metodología expresen efectivamente el BoLAII. Esto fue confirmado por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo monoclonal específico para esta molécula. El análisis se realizó en macrófagos solos, macrófagos incubados con eritrocitos infectados con *B. bovis*, y macrófagos incubados con eritrocitos normales. En la Figura 34 se puede observar que en todas las condiciones los macrófagos expresaron las moléculas de BoLAII. Además, la citometría de flujo permite cuantificar la media de expresión de dicha molécula, la cual mostró que, de acuerdo con lo esperado, los macrófagos incubados con el parásito expresaron niveles más elevados de MHC II que los macrófagos incubados con eritrocitos normales. También el menor valor de expresión estuvo dado por los macrófagos normales sin ningún agregado (Figura 35).

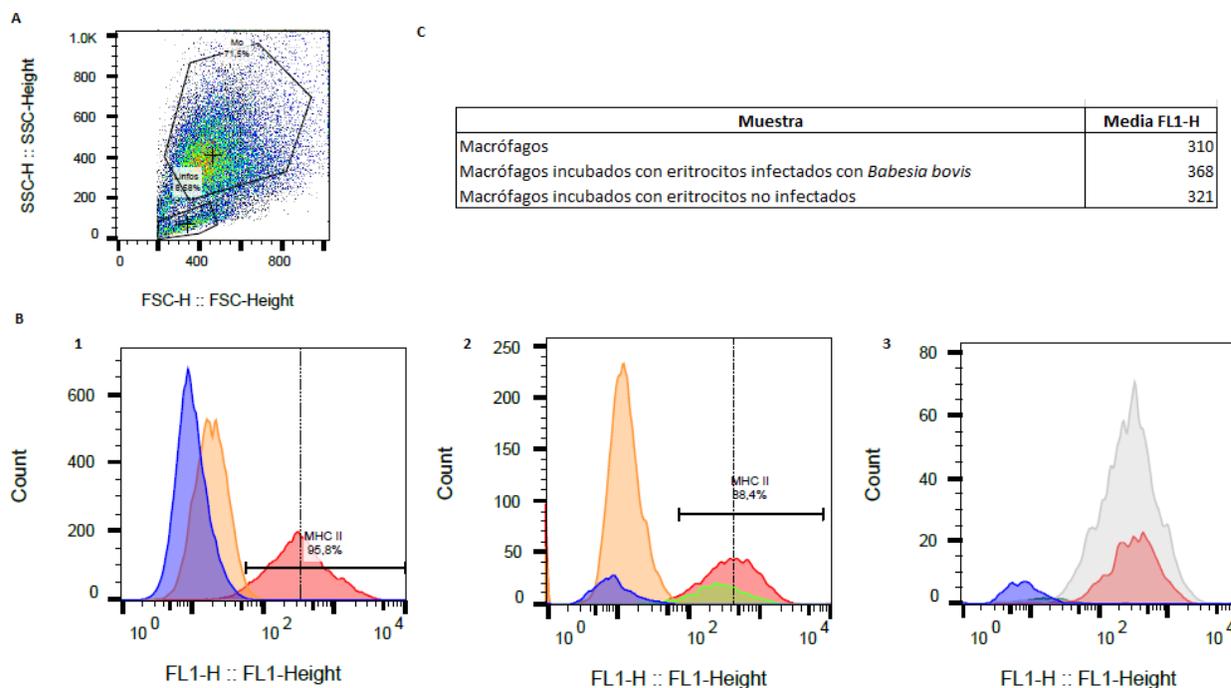


Figura 35: Citometría de flujo para confirmar la expresión del BoLAII. **A:** Selección de gate macrófagos. **B:** Gráfico de número de eventos en base a la fluorescencia. B1: Macrófagos solos B2: Macrófagos + eritrocitos infectados con *Babesia bovis*. B3: Macrófagos + eritrocitos no infectados. **C:** indicación de la media en cada una de las condiciones utilizadas. Referencias: Azul: control de autofluorescencia. Naranja: control conjugado. Rojo: macrófagos incubados con cada condición. En B2 y B3, respectivamente, el color verde y gris refieren a un duplicado de los macrófagos incubados con eritrocitos.

### 3.3 Identificación de epitopes T de *B. bovis*

Luego de la co- incubación de los macrófagos con los eritrocitos parasitados, las monocapas se levantaron y luego de una centrifugación, los pellets celulares obtenidos se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estos pellets se enviaron como tales a la Universidad de Oxford donde realizaron la inmunoprecipitación de los complejos BoLA-péptido descrita en el punto 12.3 de M y M, con la posterior separación de los péptidos para su análisis en el espectrómetro de masas. Este equipo como resultado devuelve espectros de masas, que debieron ser analizados mediante el software Peaks para asignarle a cada espectro la secuencia de un péptido. Estos análisis se realizaron utilizando el proteoma predicho de *B. bovis* y *Bos taurus*. Se incluyó este último genoma ya que muchos de los péptidos presentados por los macrófagos serán propios del bovino como parte del proceso de eliminación de eritrocitos envejecidos por parte de los macrófagos esplénicos.

Luego de este análisis, se identificaron un total de 23.036 péptidos totales, los cuales corresponden a péptidos propios del bovino y a péptidos derivados de *B. bovis*. Utilizando la información de estos péptidos se realizó el análisis descrito más abajo que permitió identificar los dos motivos consenso

de unión correspondiente a los dos alelos del BoLAII-*DRB3.2* presentes en el bovino 383 utilizado para obtener los macrófagos del experimento de co-cultivo (Figura 36). Este análisis se realizó de forma bioinformática determinando cuáles aminoácidos aparecen en cada posición del péptido y con qué frecuencia aparecen.

Si bien pudimos determinar los dos motivos de unión en BoLAII-*DRB3*, el bovino utilizado es heterocigota, por lo que no podemos determinar cuál motivo de unión corresponde a cada alelo. Sin embargo, pudimos analizar que los dos motivos de unión a los alelos BoLAII en este animal resultaron diferentes en su funcionalidad a los conocidos hasta el momento por información experimental en infecciones en otras células bovinas (Fisch y col, 2020) y refuerzan la utilidad de este tipo de abordajes para el descubrimiento de nuevos epitopes T en patógenos bovinos.

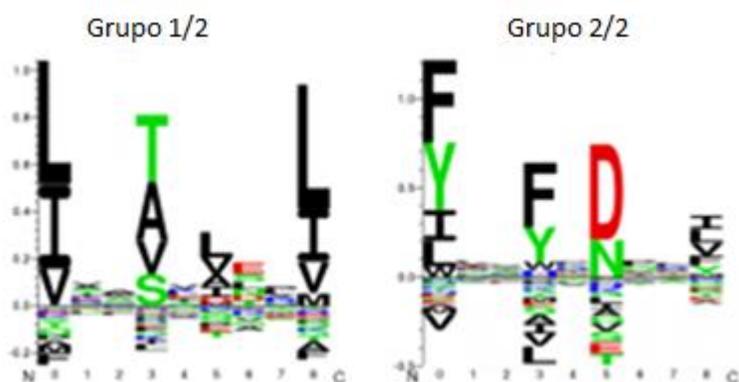


Figura 36: Motivos de unión a los alelos BoLA-*DRB3* \*018:01 y \*026:01 generados a partir de los datos obtenidos por inmunopeptidómica.

Con el objetivo de identificar los péptidos específicos de *B. bovis* se realizaron sucesivos filtrados del listado de péptidos totales original, identificando un total de 134 péptidos específicos asociados al parásito. Estos péptidos fueron evaluados en su capacidad de unirse a los dos motivos de unión a los alelos aprendidos anteriormente asignándoles un puntaje. Aquellos péptidos con un puntaje menor a 1 fueron eliminados y fue el caso de 3 péptidos: IPIPTYLAYSLAGISD, PATMNYGYKVTVS y DPATMNYGYKVTVS, lo cual resultó en un total de 131 péptidos específicos de *B. bovis* correspondientes a 43 proteínas (Tabla 18).

Tabla 18: Péptidos específicos de *Babesia bovis* presentados por el BoLAII.

Péptido	Proteína	Gen	Nombre
KLHKILPTKVDPL	EDO05142.1	BBOV_I000480	proteína de familia del proteasoma 26S
LHKILPTKVDPL			
DKFIGFDNAGYPA	EDO05231.1	BBOV_I001470	familia Adenosina/AMP deaminasa

HRDKFIGFDNAGYPA			
HRDKFIGFDNAGYPAD			
HRDKFIGFDNAGYPADF			
DQEIQMAELHKVPG	EDO05258.1	BBOV_I001740	S-adenosil-L-homocistein hidrolasa
GDQEIQMAELHKVPG			
ISNLESTRVLPV			
ISNLESTRVLPVV	EDO05290.2	BBOV_I002070	oxoglutaratodehidrogenasa
VISNLESTRVLPV			
VISNLESTRVLPVV			
LFTIALSKVVDL	EDO05293.2	BBOV_I002100	proteína hipotética
DSGALRIASEELIK	EDO05384.1	BBOV_I003020	MSA-2c
SGALRIASEELIK			
ETVLRQALGERIR			
ETVLRQALGERIRP	EDO05391.1	BBOV_I003090	factor de elongación 2 (EF-2)
ETVLRQALGERIRPV			
VNVIIATYNDELMG			
DIFGFVFKNNSLEQ	EDO05431.1	BBOV_I003490	miosina A
NVEIGATSVGDIDDA			
EGGILIFKNPEF			
EGGILIFKNPEFN			
EGGILIFKNPEFNI			
EGGILIFKNPEFNIT			
EITEGGILIFKNPEFNIT			
FNSFITARDVIM			
FNSFITARDVIMD			
FNSFITARDVIMDLK	EDO05502.1	BBOV_I004210	proteína del cuerpo esférico 3 (SBP3)
GGILIFKNPEFN			
ITEGGILIFKNPEFN			
ITEGGILIFKNPEFNIT			
ITEGGILIFKNPEFNITD			
TEGGILIFKNPEFN			
TEGGILIFKNPEFNIT			
TEGGILIFKNPEFNITD			
DDVLVPTVVESLSGN	EDO05575.2	BBOV_I004940	regulador de la condensación de cromosomas (RCC1)
LDDVLVPTVVESLSGN			
AIGIAATRVEEMPS	EDO05622.1	BBOV_IV000220	proteína hipotética

AIGIAATRVEEMPSE			
IGIAATRVEEMPS			
NSEIANAYISRLNG	EDO05627.1	BBOV_IV000270	proteína de unión al ARN
TPNDVTSSDATAIDDKK			
TQETLNSTSISALK	EDO05708.2	BBOV_IV001110	proteína hipotética
DRFEFTGSTVEEL	EDO05830.1	BBOV_IV002330	prot. con dominio disulfuro-isomerasa
DRFEFTGSTVEELVE			
GNDREFTGSTVEELVE			
DAELVHSKLAPL	EDO05839.2	BBOV_IV002420	oxireductasa del retículo endoplasmático
ISLALSKVERLPE	EDO05867.1	BBOV_IV002700	proteína integral de membrana
VEISLALSKVERLPE			
TQKLSQAALLYIGSK	EDO05917.1	BBOV_IV003210	proteína kinasa 4 dependiente de calcio (CDPK-4)
IDGTYRVLNDDVM	EDO05918.1	BBOV_IV003220	superfamilia hidrolasa HAD
IDGTYRVLNDDVMN			
RGAIIAKLSLIPVR	EDO05950.1	BBOV_IV003540	superfamilia de proteína ribosomal S5
DEVFIPAPTNLIS	EDO05961.1	BBOV_IV003650	proteína hipotética
DEVFIPAPTNLISG			
FDLSLSKSELID	EDO06103.1	BBOV_II001460	JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 ubiquitin proteasas
LANLQFALAEHLNA			
STFDLSLSKSEL			
STFDLSLSKSELID			
TFDLSLSKSEL			
TFDLSLSKSELID			
DNLEVVAINDPFM	EDO06209.1	BBOV_II002540	GADPH3
EGLMTTVHATTANQLT			
EGLMTTVHATTANQLTVD			
GLMTTVHATTANQLT			
GLMTTVHATTANQLTVD			
GLMTTVHATTANQLTVDG			
IVEGLMTTVHATTANQLT			
IVSAVKAASEGELK			
LMTTVHATTANQLTVDG			
MTTVHATTANQL			

MTTVHATTANQLT			
MTTVHATTANQLTVD			
MTTVHATTANQLTVDG			
TTVHATTANQLT			
TVHATTANQLTVD			
VEGLMTTVHATTANQLT			
VEGLMTTVHATTANQLTVD			
VHATTANQLTVD			
DQSKFDVFPTGFITN	EDO06400.1	BBOV_II004450	familia con dominio aminopeptidasa
YDTYNIFEDPELR	EDO06693.1	BBOV_II007430	familia de proteínas glutaredoxina
KGSITSVQAVVVPADD	EDO06944.1	BBOV_IV005830	ATP sintetasa F1 cadena beta
SSTFAKFGDEMVB	EDO06985.2	BBOV_IV006260	proteína con dominios GCC2 y GCC3
GTAVVRTYIDQLAQ	EDO07000.1	BBOV_IV006410	antígeno variante de superficie del eritrocito-1, subunidad alfa (VESA)
TAVVRTYIDQLAQ			
GPNDVVATLLNHL	EDO07051.1	BBOV_IV006950	familia factor de splicing 3B
GPNDVVATLLNHLR			
DDCAFVLYDTGRY	EDO07205.1	BBOV_IV008510	proteína hipotética
DDCAFVLYDTGRYV			
HGDYHYFVTGLLNN	EDO07341.1	BBOV_IV009870	RAP-1
HGDYHYFVTGLLNNN			
SKTIVGTSITSFAD	EDO07356.1	BBOV_IV010020	ATPasa 4 putativa
SKTIVGTSITSFADN			
YNTIVNAKLDLSR	EDO07384.1	BBOV_IV010300	proteína integral de membrana
YNTIVNAKLDLSRKL			
YNTIVNAKLDLSRKT			
ERGEITQAELD KIAE	EDO07479.1	BBOV_IV011270	L-lactato dehidrogenasa putativa
ERGEITQAELD KIAER			
ERGEITQAELD KIAERT			
GEITQAELD KIAE			
GEITQAELD KIAER			
GEITQAELD KIAERT			
IERGEITQAELD KIAE			
IERGEITQAELD KIAER			

IERGEITQAELDKIAERT			
RGEITQAELDKIAE			
RGEITQAELDKIAER			
RGEITQAELDKIAERT			
VHPINTTQLKIIPF	EDO07765.1	BBOV_III001980	proteína hipotética
VHPINTTQLKIIPFA			
AVIVGTITDDIR			
TAVIVGTITDDIR	EDO08027.1	BBOV_III001980	proteína ribosomal L18 putativa
TAVIVGTITDDIRVT			
TTAVIVGTITDDIR			
IMETFSVPSPKVSdT	EDO08048.1	BBOV_III004850	cadena beta de tubulina
VSEYQQYQEATIDDD			
ITSRISPYLDVEM	EDO08139.1	BBOV_III005760	factor de iniciación de la traducción 3, subunidad 6
TSRISPYLDVEM			
GNVYTFQDSQVIK	EDO08390.1	BBOV_III008300	familia ATPasa tipo B
SDTYIIFGEAKVED	EDO08507.1	BBOV_III009510	Proteína con dominio NAC
ANVIRYFPTQAF			
ANVIRYFPTQAFN			
ANVIRYFPTQAFNFA	EDO08562.1	BBOV_III010060	proteína hipotética
MANVIRYFPTQAFN			
NVIRYFPTQAFN			
IGTIWFSDAEIKQS	EDO08644.1	BBOV_III010920	proteína hipotética
YTTLQVTRLSELTNT	EDO08708.1	BBOV_III011560	proteína con dominio PCI
SPPLVIAYALAGKIN			
STDIVLAVTSLLR	EDO08731.1	BBOV_III011790	familia aconitatohidratasa 1
STDIVLAVTSLLRSG			

Los péptidos sombreados en violeta son péptidos solapados.

A partir del análisis de los péptidos obtenidos, observamos que 26 péptidos fueron identificados por única vez y por lo tanto no requirieron procesamientos posteriores. Por su parte, los 105 péptidos restantes corresponden a péptidos que fueron identificados al menos 2 veces, pero son idénticos, sino que sólo difieren en la presencia de algunos aminoácidos en sus extremos.

De acuerdo con experiencia previa se sabe que los péptidos presentados naturalmente y que fueron identificados más de una vez por el equipo de espectrometría de masas tienen más probabilidad de ser verdaderos ligandos presentados por el MHC en estudio. Entonces, dado que varios grupos de péptidos de *B. bovis* son muy similares entre sí y se solapan, y para reducir el número de péptidos pensando en su posterior validación, se generaron 28 péptidos consenso a partir de los 105 péptidos solapados (Tabla 19). Para esto se utilizó la herramienta Epitope Cluster Analysis del IEDB que compara las secuencias similares, las alinea y las une generando un péptido consenso único a partir de las mismas. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 20.

Tabla 19: Ejemplo de péptidos T solapados correspondientes a la proteína L- lactato deshidrogenasa. En la primera línea se describe el péptido consenso obtenido y en las filas 1 a 12 los distintos péptidos identificados en la muestra.

Número de péptido	Secuencia
péptido consenso	IERGEITQAELDKIAERT
1	IERGEITQAELDKIAERT
2	IERGEITQAELDKIAER-
3	IERGEITQAELDKIAE--
4	-ERGEITQAELDKIAERT
5	-ERGEITQAELDKIAER-
6	-ERGEITQAELDKIAE--
7	--RGEITQAELDKIAERT
8	--RGEITQAELDKIAER-
9	--RGEITQAELDKIAE--
10	---GEITQAELDKIAERT
11	---GEITQAELDKIAER-
12	---GEITQAELDKIAE--

Tabla 20: Péptidos consenso generados.

Número	Consenso
1	AIGIAATRVEEMPSE
2	DDCAFVLYDTGRYV
3	DEVFIPAPTNLISG
4	DSGALRIASEELIK
5	EITEGGILIFKNPEFNITD
6	ETVLRQALGERIRPV
7	FNSFITARDVIMDLK
8	GDQEIQMAELHKVPG
9	GNDRFEGTGSTVEELVE

10	GPNDVVATLLNHLR
11	GTAVVRTYIDQLAQ
12	HGDYHYFVTGLLNNN
13	HRDKFIGFDNAGYPADF
14	IDGTYRVLNDDVMN
15	IERGEITQAELDKIAERT
16	ITSRISPYLDVEM
17	IVEGLMTTVHATTANQLTVDG
18	KLHKILPTKVDPL
19	LDDVLVPTVVESLSGN
20	MANVIRYFPTQAFNFA
21	SKTIVGTSITSFADN
22	STDIVLAVTSLLRSG
23	STFDLSLSKLELID
24	TTAVIVGTITDDIRVT
25	VEISLALSVERLPE
26	VHPINTTQLKIIPFA
27	VISNLESTRVLPVV
28	YNTIVNAKLDLRLKT

Cabe descartar que el péptido consenso correspondiente a la proteína RAP-1 hallado en estos experimentos forma parte de un péptido más largo que ya fue validado *in vitro* midiendo la producción de IFN- $\gamma$  (Norimine y col., 2002; Norimine y col., 2003) (Figura 37).

MRIISGVVGCFLVFSHHVSAFRHNQRVGS LAPAEVVGDLTSTLETADTLMTLRDHMHNITKDMKH  
VLSNGREQIVNDVCSNAPEDSNCREVVNNYADRCEMYGCFTIDNVKYPLYQEYQPLSLPNPYQLDA  
AFRLFKEASANPAKNSVKREWLRFRNGANHGDIHYFVTGLLNNNVVHEEGTTDVEYLVNKVLYMAT  
MNYKTYLTVNSMNAKFNRFSFTTKIFSRIRQTLSDIIRWNPEDFEERSIERITQLTSSYEDYM  
LTQIPTLSKFARRYADMVKKVLLGSLT SYVEAPWYKRWIKKFRDFFSKNVTQPTKFFIEDTNEVTK  
NYLKANVAEPTKKFMQDTHEKTKGYLKENVAEPTKTF FKEAPQVTKHFDDNTGQPTKEFFREAPQ  
ATKHFLDENIGQPTKEFFREAPQVTKHFLDENIAQPTKEFFRDVPQVTKK VITENIAQPTKEFLKE  
VPHTTMKVLNENIAQPAKEI IHEFGTGAKNFISAAHEGKQFLNETVGQPTKEFLNGALETTKDAL  
HHLGKSSDEANIYDASENTTQSNDSTTSNGEDTAGYL

Figura 37: Secuencia de aminoácidos de la proteína RAP-1. (nº de acceso: ACM44005.1). Referencias: subrayado celeste: péptidos predichos mediante herramientas bioinformáticas en este trabajo; subrayado rosa: péptido identificado en Norimine y col., 2002; violeta: péptido identificado mediante inmunoinformática en este trabajo.

## 3.4- Análisis de las proteínas correspondientes a los péptidos T identificados.

De las 43 proteínas correspondientes a los 131 péptidos identificados, las 3 con mayor cobertura (es decir mayor cantidad de péptidos encontrados en las mismas) fueron: GAPDH, SBP3 y L- lactato deshidrogenasa (Figura 38, A, B y C respectivamente), con 18, 15 y 12 péptidos, respectivamente. La GAPDH y L-lactato deshidrogenasa son dos proteínas intervinientes en el paso 6 y último paso (glucólisis anaerobia) de la glucólisis, respectivamente. Por su parte la SBP3 es una proteína ya descrita localizada en la membrana del eritrocito y en la vacuola parasitófora y se demostró que es secretada por el complejo apical del parásito (Ruef y col., 2000). De las 40 proteínas restantes, solo se obtuvo entre 1 y 2 péptidos para cada una.

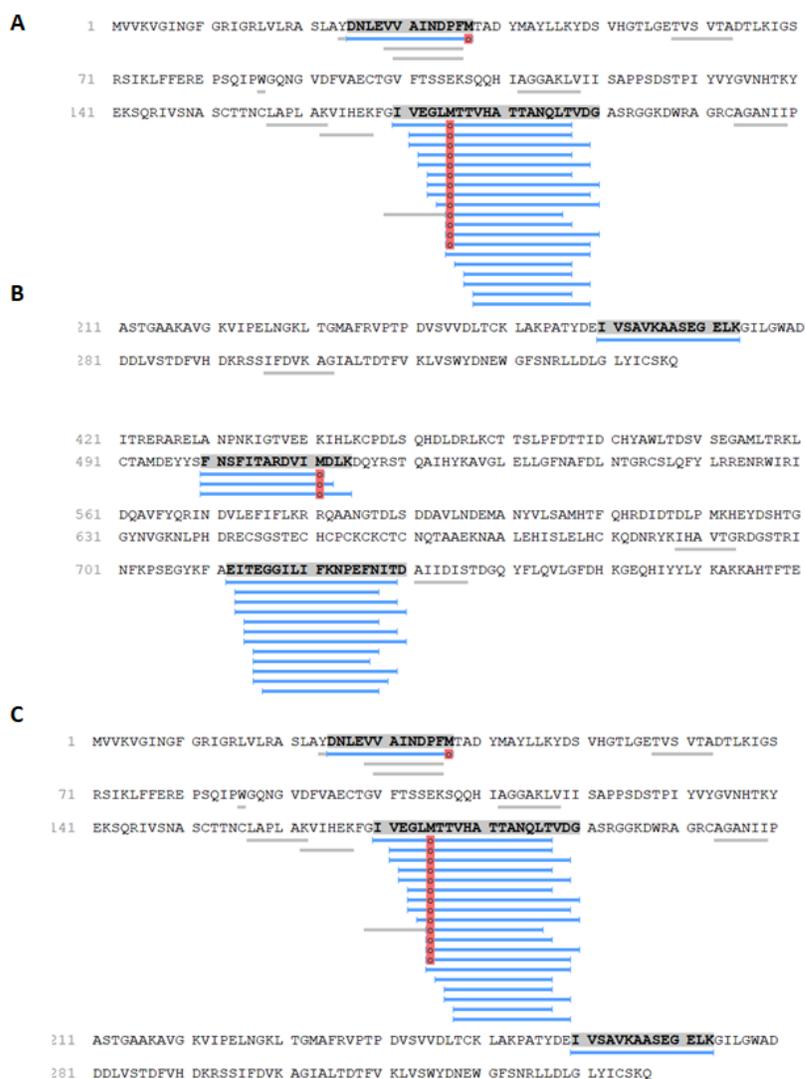


Figura 38: Esquema que señala los péptidos identificados en las 3 proteínas con mayor cobertura. A: GAPDH; B: SBP3; C: L- Lactato deshidrogenasa.

### 3.4.1 Análisis de Ontología Genética

La Ontología genética es una representación formal del conocimiento en la que los conceptos se describen por su significado y las relaciones que se guardan entre ellos. Es especialmente útil para identificar qué tienen en común un conjunto de genes identificados. Con este objetivo, las proteínas de *B. bovis* cuyos péptidos fueron encontrados como epitopes T durante este análisis, fueron asociadas a términos de Ontología Genética (GO) para conocer su función y localización celular (Tabla suplementaria C) mediante la herramienta Gene Ontology Resource (<http://geneontology.org>). Del total de 43 proteínas, 39 pudieron ser asociadas a términos GO. Las 4 proteínas que no se encuentran en la Tabla suplementaria C (EDO05708.2, EDO05961.1, EDO08644.1) no pudieron ser vinculadas a estos términos y son proteínas hipotéticas. Por análisis de dominios sabemos que la proteína EDO05293.2 posee una arquitectura con dominios incluyendo un dominio Zinc Finger, es decir de unión a ADN, ARN, proteínas o lípidos.

Para una mejor visualización de este análisis, los términos de este listado se agruparon según las 3 principales clasificaciones de los términos GO: ubicación celular, proceso biológico en el que participan y su función molecular. Con respecto a su ubicación celular, la mayoría de las proteínas (26 de 39 proteínas que pudieron ser asociadas a términos GO) provienen del citoplasma, ribosoma, mitocondria o membrana (Figura 39). Dos proteínas (SBP3 y RAP-1) se han identificado experimentalmente como pertenecientes al complejo apical, aunque no existe actualmente un término GO específico para asignar proteínas a esta localización propia de los parásitos Apicomplejos.

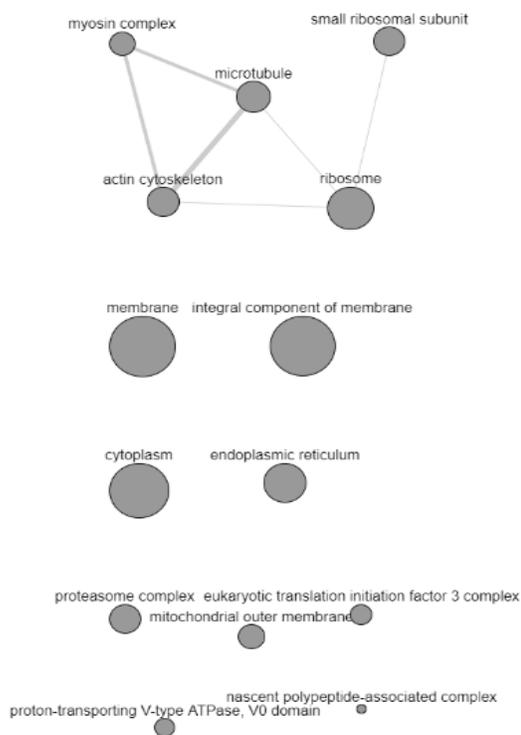


Figura 39: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes de acuerdo con su localización celular.

En segundo lugar, el agrupamiento de acuerdo con el proceso biológico en el cual participan indicó que varias proteínas (14/39) participan en la glucólisis, transporte transmembrana y el proceso de traducción y procesamiento del ARN (Figura 40).



Figura 40: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes de acuerdo al proceso biológico del cual participa.

Finalmente, con respecto a la función molecular, las funciones encontradas son variadas (Figura 41), incluyendo factores de iniciación de la traducción, transporte de electrones, transportadores transmembrana, entre otros sin que haya un predominio de alguna función sobre otra.



Figura 41: Agrupamiento de proteínas por términos GO correspondientes su función molecular.

En resumen, a través de tecnologías novedosas como la inmunopeptidómica y utilizando un modelo biológico de interacción célula presentadora de antígeno-parásito, identificamos 131 péptidos T específicos de *B. bovis* presentados naturalmente en el contexto de MHC clase II bovino, a partir de los cuales se generaron 28 péptidos consenso. Estos epitopes T son totalmente novedosos y los mismos deberán ser validados a través de experimentos *in vitro* para evaluar su capacidad de inducir una respuesta de tipo Th1 con la consiguiente producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+. Al momento de la escritura de esta tesis y por motivos ajenos a nuestro trabajo, nos fue imposible contar con los péptidos sintéticos derivados de la inmunopeptidómica para realizar la validación tal como la hicimos con los péptidos predichos por inmunoinformática. Sin embargo, este análisis se realizará durante el transcurso de este año y los resultados serán incorporados al manuscrito que se enviará a publicar a una revista de la especialidad.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

---

Actualmente en la Argentina, la vacunación con cepas vivas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina* sigue siendo el método de prevención más eficaz para inducir una respuesta inmune protectora contra la babesiosis bovina. Si bien una sola dosis es capaz de conferir protección durante toda la vida útil del bovino, estas vacunas presentan una serie de dificultades y desventajas que limitan su uso. Entre ellas se encuentra el uso de bovinos esplenectomizados dadores para el caso de las vacunas producidas por pasajes en animales y también el uso de sangre y suero autólogo para suplementar los cultivos *in vitro* de las cepas vacunales. En estos casos, si bien se realizan testeos de los animales dadores de sangre o suero, siempre existe el período ventana donde un diagnóstico puede ser falso negativo y por ende causar la contaminación con otros patógenos. Estas dificultades técnicas y riesgos en la elaboración de este tipo de vacunas sumado al requerimiento de animales vivos son aspectos relevantes que resaltan la necesidad de generar nuevas vacunas seguras y efectivas que reemplacen el uso de parásitos atenuados.

El diseño racional de una vacuna está orientado al desarrollo de inmunógenos que sean capaces de despertar una respuesta inmune efectora y de memoria, y por lo tanto de conferir protección frente a la exposición al patógeno. Este diseño radica principalmente en la elección de antígenos adecuados que sean capaces de despertar la protección deseada y que los mismos estén formulados para optimizar una respuesta inmune protectora. Debido a la complejidad antigénica que presentan los parásitos protozoarios como *Babesia* y los resultados infructuosos obtenidos con vacunaciones utilizando una o más proteínas recombinantes, una estrategia racional sería utilizar una vacuna que contenga varios antígenos expresados en sistemas capaces de inducir una respuesta efectora y de memoria de tipo B y T ya que se ha demostrado que ambos tipos de respuestas son necesarias para conferir protección en los bovinos (Brown et al., 1999).

Hasta el momento, cuatro grupos de antígenos del género *Babesia* se han caracterizado y se ha probado su potencial inmunoprotector: los presentes en la superficie de eritrocitos infectados o de los merozoitos; los presentes en las organelas del complejo apical y los excretados- secretados en el sobrenadante de cultivos *in vitro*. Sin embargo, aún se desconoce si otros antígenos que no necesariamente están tan expuestos al sistema inmune podrían despertar una respuesta protectora. Si bien la identificación de antígenos de *B. bovis* con potencial inmunogénico ha avanzado en los últimos años gracias a la disponibilidad de información genómica (Brayton y col.,

2007), transcriptómica (Ueti y col., 2020) y proteómica (Hakimi y col., 2020), la caracterización detallada de los epitopes B y T de los antígenos candidatos es un paso indispensable para el diseño de vacunas multiepitópicas. Es el caso de algunos epitopes de antígenos como RAP-1 y MSA2-C, que han sido mapeados por expresión recombinante de fragmentos truncados o directamente predichos *in silico* (Norimine y col., 2002; Hidalgo Ruiz y col., 2020), pero hasta la fecha no se habían utilizado enfoques bioinformáticos asociados con tecnologías de alta procesividad para identificar los antígenos de *Babesia* presentados naturalmente por células del sistema inmune bovino. Es por ello que en este trabajo nos centramos entonces en la identificación de epitopes T de *B. bovis*, cuya predicción resulta mucho más compleja que la de los epitopes B, ya que requiere tener en cuenta las características genéticas del hospedador.

En este sentido, el estudio de la diversidad del BoLA- *DRB3.2* toma relevancia ya que es un paso crucial poder predecir con la mayor exactitud posible, cuáles son los alelos más frecuentes en la población productiva local y para determinar posteriormente qué epitopes T del parásito podrán ser presentados a los linfocitos CD4+, lo cual es un paso clave para el diseño de estrategias vacunales con una aproximación racional.

Las distintas razas bovinas utilizadas en la producción ganadera poseen un repertorio variado de los distintos alelos de este gen. Es por ello que se han realizado varios estudios de diversidad del gen BoLA- *DRB3.2* en razas utilizadas en Asia, Africa y Europa (Mikko y col., 1995; De S y col., 2006; Das y col., 2012, Takeshima y col., 2003 y 2015). En América del Sur, la diversidad de este gen ha sido caracterizada en razas del tipo taurino: Criollo Uruguayo, Yacumeño en Bolivia y Harton del Valle, Morucha y Normande en Colombia (Kelly y col., 2002, Giovambattista y col., 2013, Bohorquez y col., 2020); y en razas del tipo cebuino (Nelore x Brahman en Perú, Gir en Brasil y Bolivia, y Nelore en Bolivia (Da mota y col. 2002; Takeshima y col., 2018). Sin embargo, la información sobre la diversidad de este gen no se encontraba disponible en estas y otras razas utilizadas frecuentemente en las regiones NOA y NEA de nuestro país.

En este trabajo, reportamos por primera vez la diversidad del gen *BoLA-DRB3.2* de cinco razas de ganado de elección en el noreste de Argentina pero que también se utilizan en muchas regiones tropicales y subtropicales de América del Sur (Stonaker y col., 1971; Barbera y col., 2018). Este grupo comprende Nelore y Brahman que son razas cebuinas, así como Braford y Brangus, que son cruza entre razas taurinas y cebuinas. La raza Criollo (taurina) se incluyó como un *outgroup*, una raza no relacionada que *a priori* estimamos como diferenciada del resto de los grupos en estudio. Las razas cebuinas y sus cruza se caracterizan por la resistencia al calor y a los ectoparásitos, facilidad de

parto, longevidad, bajo desempeño reproductivo y menor ternera de la carne en comparación con las haciendas de origen británico. El ganado europeo taurino supera a los cebuinos en precocidad sexual y calidad de carne, pero en regiones con alta temperatura ambiental demuestra intolerancia al calor, menor vitalidad de los terneros al nacer y debilidad ante los ecto y hemoparásitos. Por estos motivos se realizan cruzamientos entre razas taurinas y cebuinas, lo que deriva en un producto sintético que resalta las características positivas de ambos tipos y minimiza las negativas. Además, los animales híbridos demuestran un vigor adicional en rasgos productivos como porcentaje de preñez o de parición, peso al destete, producción de leche y longevidad productiva de la vaca en el rodeo (Lopez y col., 2002).

Como mencionamos, uno de los motivos de la adopción de las razas cebuinas por los ganaderos argentinos está relacionado con su resistencia natural a ciertos artrópodos (Barbera y col., 2018), entre ellos la garrapata bovina *Rhipicephalus microplus*, que se encuentra ampliamente distribuida en la zona y la cual es vector de patógenos como los protozoos *B. bovis* y *B. bigemina* y la bacteria *A. marginale* (Utech y col., 1978; Bock y col., 2004). En este sentido, algunos reportes han asociado ciertos alelos *BoLA-DRB3.2* de razas utilizadas para la producción de carne y leche de ambientes tropicales con susceptibilidad o resistencia a estas enfermedades transmitidas por garrapatas (Duangjinday col., 2013; Bolaños y col., 2017). Por ejemplo, los alelos \*042:01, \*011:01 y \*020:01:02 se asociaron con la tolerancia a las infecciones por *B. bigemina*, mientras que los alelos \*027:03 y \*013:01 se vincularon con la susceptibilidad a las infecciones por *B. bigemina* y a *A. marginale*, respectivamente. En nuestro estudio, los alelos mencionados se encontraron en frecuencias bajas en las razas Brangus y Braford. Esta diferencia en las frecuencias alélicas encontradas puede deberse a que las razas utilizadas para los análisis de asociación genética con tolerancia o susceptibilidad a los patógenos fueron razas lecheras, mientras que en este trabajo estudiamos razas destinadas a la producción de carne.

En cuanto a los estudios de distribución de los alelos *BoLA-DRB3.2*, los datos revelaron que las frecuencias difieren significativamente entre las razas. Todas las razas tienen alelos exclusivos, lo que sugiere que son poblaciones bien diferenciadas con niveles muy bajos de flujo de genes, relacionado con la cría bovina intensiva. Por esta razón, nuestros datos refuerzan la utilidad de caracterizar la diversidad de *BoLA-DRB3.2* en las distintas razas bovinas de importancia económica como un procedimiento de rutina de los sistemas de producción animal, ya que constituye información relevante para el establecimiento de programas de mejora genética que eleven la productividad de los criadores de la región.

Por otra parte, nos interesaba poner en contexto nuestros resultados con los resultados de otros autores que estudiaron razas similares en Latinoamérica, y así poder analizar la distribución alélica de este gen de manera más global. Para ello, realizamos un análisis de una matriz de datos ampliada que incluye datos de razas taurinas, cebuinas y mixtas de otros países de América Latina. La misma mostró que los alelos exclusivos de razas mixtas disminuyen en comparación con nuestros propios datos (Figura 24). Esto podría indicar que los individuos de razas cebuinas involucrados en el origen histórico de los mestizos serían diferentes a los que hoy están presentes en la región.

La diversidad genética dentro de las razas se midió por el número de alelos, la riqueza alélica y la heterocigosidad en el gen *BoLA-DRB3.2*. En todas las razas, el  $N_e$  es inferior a la riqueza alélica, probablemente debido a una distribución desigual de las frecuencias alélicas. En general, Braford es la raza con mayor diversidad genética. Aunque el número de alelos detectados fue superior a los estimados para otras razas bovinas sudamericanas (Giovambattista y col., 2013; Takeshima y col., 2015; Bohórquez y col., 2020), los valores de heterocigosidad obtenidos en este trabajo son inferiores, lo que indica que existió una contribución de alelos de baja frecuencia. El análisis de la diversidad genética a nivel de nucleótidos arrojó resultados similares. En nuestros datos, los valores de  $H_d$ ,  $\pi$  y  $k$  resultan más altos en las razas mixtas que en las puras, lo que demuestra que las razas mixtas capturan más diversidad genética, como era esperado para este tipo de cruza.

Para evaluar la estructuración de la variación de *BoLA-DRB3.2*, lo cual permite inferir si la composición genética de cada población permanece en equilibrio, calculamos el coeficiente de consanguinidad de Wright (Weir y Cockerham, 1984). Aunque el muestreo de ADN al que tuvimos acceso se realizó considerando que los individuos seleccionados para esta investigación no estuvieran relacionados genéticamente, consideramos que el exceso de homocigotas observado en la mayoría de las razas analizadas en esta tesis puede ser indicativo de la consanguinidad derivada de los tamaños efectivos de población pequeños generalmente asociados con la práctica ganadera. Estudios previos sobre este aspecto informaron desviaciones tanto positivas como negativas de HWE en diferentes razas (Takeshima y col., 2015).

También realizamos una prueba de neutralidad para *BoLA-DRB3.2* dentro de cada población, en los que no detectamos un exceso de alelos en frecuencias intermedias, lo que sería de esperar si existiera una selección balanceadora. Los resultados anteriores de otras razas de ganado tanto para la producción lechera como de carne han mostrado resultados variables (Giovambattista y col., 2013; Takeshima y col., 2015; Takeshima y col., 2018). Esta variabilidad podría indicar que las

presiones selectivas que actúan sobre las razas desde antes de la domesticación pueden no dejar huellas detectables en las poblaciones actuales.

El índice  $F_{ST}$  muestra diferencias significativas entre todas las razas de ganado. Esto es similar lo reportado en estudios anteriores para razas latinoamericanas (Giovambattista y col., 2013; Takeshima y col., 2018). Los niveles de diferenciación están de acuerdo con lo esperado considerando el origen diverso de las razas. Aunque Nelore y Brahman son las dos razas cebuinas, tienen un origen histórico y geográfico muy diferente ya que una proviene de India y la otra de Estados Unidos, respectivamente (Livio Sala, tesis doctoral, 2009).

Estudios previos realizados por otros grupos demuestran que las poblaciones que tienen alelos *BoLA-DRB3.2* altamente divergentes tendrán un repertorio de unión a péptidos más amplio que aquellos que tienen alelos muy similares (Klein y col., 2007; Lenz y col., 2013). En este sentido, nuestro análisis de AMOVA revela que la diferenciación entre razas es menor cuando la analizamos a nivel de secuencia. Esto indica que estas poblaciones tienden a tener alelos funcionalmente más similares.

Esta observación tiene varias implicancias: por un lado, indica que puede disminuir eventualmente la capacidad de respuesta inmune de la raza contra patógenos debido a que el repertorio de péptidos presentados por el BoLA será menor. Por otro lado, implica que los péptidos presentados por los diferentes alelos del BoLA serían más similares entre sí, por lo que facilitaría entonces la selección de epitopes T necesaria para el desarrollo de vacunas.

Las relaciones genéticas entre razas fueron calculadas mediante el cálculo de las distancias genéticas de Nei y visualizadas realizando árboles UPGMA y análisis MDS. Los resultados por ambos métodos son concordantes y muestran, de acuerdo con lo esperado, una fuerte distinción entre las razas taurinas y cebuinas. En el árbol UPGMA, la menor distancia entre Braford y Brahman, con respecto a Brangus, podría indicar que el ancestro cebuino utilizado para la creación de Braford era genéticamente diferente al utilizado para Brangus, ya que en términos de tiempos evolutivos el período de tiempo de creación de las razas es demasiado corto para la aparición de nuevos alelos. El hallazgo de alelos ausentes de los individuos Brahman en las razas mixtas puede respaldar esta hipótesis, pero se requieren más estudios para confirmarlo.

Las conclusiones sobre los resultados obtenidos en el análisis filogenético realizado mediante la construcción de árboles de Máxima Verosimilitud a partir de secuencias de nucleótidos de *BoLA-DRB3.2* deben tomarse con cautela porque los valores de remuestreo son bajos, como es de esperar cuando se estudia la variación intraespecífica entre razas. No se encontraron clústeres que

agruparan alelos por razas y los alelos agruparon según su nomenclatura como se esperaba (Davies y col., 1997).

La diversidad aminoacídica en las posiciones del PBR determina a qué péptidos puede unirse un alelo *BoLA-DRB3.2* dado y esta información es crucial para mejorar las predicciones de epitopes T, necesario en el diseño de vacunas basadas en péptidos. Por este motivo estudiamos la diversidad del PBR para las razas estudiadas y en los alelos más representados en las mismas. A pesar de que las razas taurinas y cebuinas son tipos bovinos bien diferenciados, nuestro análisis de correlación muestra que, según las secuencias de aminoácidos de PBR, ambos tipos bovinos agrupan juntos. Además, el análisis de secuencias de los aminoácidos en los bolsillos de unión y los resultados de los análisis del PCC y el MDS muestran que, a excepción de Braford, las razas restantes tienden a tener un repertorio de péptidos similar en el PBR, a pesar de la diferenciación genética observada a nivel nucleotídico. Esto está sostenido por el análisis de AMOVA y del análisis de dn/ds. Esta conservación es particularmente evidente en los aminoácidos ubicados en las posiciones 70, 71 y 74 del bolsillo 4, que ocupan una posición central dentro del surco de unión del péptido en el BoLA clase II. Estos 3 aminoácidos jugarían un papel importante en el reconocimiento de los péptidos por parte de los linfocitos T CD4+ (Ou y col., 1998), pero también se correlacionarían con las respuestas a vacunas y la susceptibilidad o tolerancia a enfermedades infecciosas en bovinos como fiebre aftosa, paratuberculosis y leucemia (García-Briones y col., 2000; Baxter y col., 2009; Rastislav y Mangesh, 2012; Carignano y col., 2017).

En conclusión, caracterizamos genéticamente cinco razas bovinas criadas bajo uso extensivo en el norte de Argentina y otras regiones subtropicales de América del Sur. Los resultados muestran diferencias alélicas entre todas las poblaciones de ganado siendo Braford la raza con la mayor diversidad genética. Sin embargo, el análisis de secuencias en el PBR a nivel de aminoácidos no muestra diferencias entre poblaciones, excepto para Braford, indicando, como mencionamos anteriormente, una ventaja al momento de diseñar vacunas multiepitópicas ya que podría indicar que un mismo epitope podría unirse a más de un alelo del BoLA.

En conjunto, estos resultados contribuyen en general a aportar información básica para catalogar las frecuencias de los alelos BoLA según la raza y la ubicación, en particular en razas de uso extendido en el norte de Argentina, una importante zona de ganadería actual debido al creciente proceso de agriculturización. En particular, la identificación de los alelos presentes en estas razas resultó un primer paso en las investigaciones realizadas en esta tesis doctoral para la predicción bioinformática

de epitopes de células T del parásito *B. bovis* enfocado en el diseño racional de vacunas para este tipo de enfermedades tropicales bovinas.

En relación a este último punto, el paso siguiente consistió en analizar la funcionalidad de los alelos más frecuentes en las poblaciones bovinas estudiadas presentes en el NOA y NEA. A pesar de que observamos una gran similitud en las secuencias de aminoácidos del PBR entre las distintas razas, los árboles funcionales muestran algo diferente: que existen 3 grupos bien diferenciados de alelos que podrían unir péptidos diferentes. Quedaría por confirmar experimentalmente si esto es efectivamente así (lo que llevaría a una mayor dificultad al momento seleccionar los epitopes T en las vacunas multiepitópicas) o si por el contrario existiría la posibilidad de encontrar epitopes T promiscuos. En esta clase de epitopes, los péptidos son capaces de unirse a varias moléculas de histocompatibilidad diferentes, lo que permitiría, a partir de una vacuna conteniendo un número limitado de epitopes T, lograr una alta cobertura de la población bovina (Sanchez-Trincado y col., 2017).

Para avanzar en los análisis se realizó la predicción inmunoinformática de los epitopes T de *B. bovis* en bovinos. La inmunoinformática es una disciplina comenzó a desarrollarse a fines de la década de los 90 y hoy se ha transformado en un área de investigación muy activa internacionalmente, con gran potencial para acelerar el descubrimiento de nuevos antígenos y contribuir al desarrollo de vacunas más seguras y eficaces para hacer frente a las numerosas enfermedades infecciosas y también neoplásicas para las cuales actualmente no existen alternativas en el mercado.

A pesar del amplio avance de la disciplina en el campo de la predicción de epitopes T en el MHC I y II humanos (De Groot y col., 2020), hasta el año 2020 no se habían desarrollado programas para la predicción de epitopes T basados en información experimental proveniente de bovinos. En el año 2020, los primeros experimentos de identificación de epitopes T naturalmente expresados en bovinos (Conneley y col., 2022) permitieron mejorar la capacidad predictiva de estos algoritmos para lograr diseñar el primer programa de alta eficacia en las predicciones de epitopes T bovinos, el NetBoLAIIpan (Fisch y col., 2020). Por esta razón, elegimos este servidor para realizar predicciones de epitopes T de *B. bovis*. Sin embargo, esta información experimental que permite que las predicciones sean altamente exactas y confiables está disponible sólo en 7 de los 365 alelos conocidos del BoLA (BoLA-DRB3\*001:01; \*010:01; \*011:01; \*012:01; \*015:01; \*016:01 y \*020:02). Afortunadamente, 6 de estos 7 alelos se encontraron presentes en alta frecuencia en el set de datos generado en este trabajo correspondiente a los alelos de este gen presentes en al menos una de las razas estudiadas. De estos 6 alelos decidimos seleccionar solamente el alelo \*001:01 para realizar

las predicciones. Esta elección se basó en que en nuestros análisis encontramos que es uno de los más representados en el norte argentino (Tabla 3) y se encontraba representado en uno de los tres grandes grupos del árbol funcional (Figura 27). Además, tuvimos en cuenta que era un alelo presente en los bovinos disponibles del campo experimental de INTA para realizar los experimentos de validación *in vitro* con los péptidos sintéticos.

Hasta esta instancia analizamos los factores genéticos del hospedador que determinan la capacidad de presentar epitopes T teniendo en cuenta su diversidad genética. En una segunda etapa decidimos continuar con la predicción de este tipo de epitopes en el parásito aprovechando la información disponible y empleando abordajes inmunoinformáticos e inmunoproteómicos.

En cualquiera de estos abordajes, para realizar las predicciones bioinformáticas de epitopes T con la mayor exactitud posible se debe contar con la información genómica del microorganismo en cuestión. En nuestro caso procedimos a obtener la secuencia completa del genoma de la cepa S2P, una cepa patógena aislada en Argentina, con fenotipo virulento y ampliamente utilizada en varios trabajos (Gimenez y col., 2010; Baravalle y col., 2012; Gimenez y col., 2013; Gimenez y col., 2016) y que se utilizó para los ensayos *in vitro* e *in vivo* en esta tesis.

La secuenciación del genoma de S2P se realizó con la tecnología Illumina que permite generar secuencias cortas con gran precisión en la identificación de bases. El método para el ensamblado de las pseudomoléculas fue utilizado en un trabajo previo exitosamente para el ensamblado del genoma de otro parásito, *Leishmania orientalis* (Anuntasomboon y col., 2022). Sin embargo, luego de este ensamblado quedaron muchas zonas de no cobertura, un problema frecuente durante el ensamblado de genomas de organismos eucariotas que contienen secuencias repetitivas (Liao y col., 2020). Esta dificultad fue reportada durante el ensamblado del genoma de la cepa norteamericana de *B. bovis* T2B (Ueti y col., 2020), problema que fue subsanado al utilizar la tecnología Oxford Nanopore. Actualmente se encuentra en proceso la re-secuenciación del genoma de la cepa S2P en nuestro laboratorio con dicha tecnología lo que permitirá obtener secuencias más largas que permitan optimizar el ensamblado combinando los dos métodos de secuenciación.

En cuanto a los resultados de secuenciación con la tecnología Illumina, los mismos resultaron similares a los obtenidos para otras cepas de *B. bovis* de orígenes geográficos diversos en cuanto a cantidad de cromosomas y genes anotados (Brayton y col., 2007; Lau y col., 2011) confirmando lo que estos autores postularon en su momento en cuanto a una alta conservación de genomas entre cepas geográficamente distantes. Por su parte, conocer la secuencia genómica de diferentes cepas de esta especie provee una herramienta de gran utilidad para entender en mayor profundidad

aspectos estructurales y funcionales del parásito, y por lo tanto facilita el descubrimiento de blancos potenciales para desarrollo de nuevos fármacos y vacunas.

Una vez que contamos con la información detallada de este genoma hicimos una selección de genes sobre los cuales realizar las predicciones con el fin de reducir el número total de secuencias sobre las que realizar los análisis y elegir de manera racional aquellos genes cuyas proteínas sean las mejores candidatas para despertar una respuesta inmune frente al parásito. Para esto decidimos seguir un flujo de trabajo adaptado del trabajo de Gohil y col., 2013 en *B. bovis*, pero con modificaciones propias. A diferencia de estos autores, nuestro análisis consideró incorporar datos de transcriptómica que fueron publicados por el grupo de Ueti y col., 2020 en el cual se describen unos 2222 genes con expresión diferencial en el estadio de merozoito sobre un total de 3857 genes anotados. Para ello, diseñamos un algoritmo partir de un grupo de genes sobreexpresados al menos 20 veces en merozoitos con el racional de priorizar por un lado aquellos genes cuyos transcriptos no se encuentren en los kinetos del parásito (estadio presente en el vector), y dentro de ellos seleccionar aquellos genes codificantes para proteínas que contengan señales de secreción, ya que es probable que desempeñen papeles importantes en la interacción con el hospedador (Goff y col., 1998; Suarez y col., 1991 a y b; Allred y col., 2000; Brayton y col., 2007; Paoletta y col., 2021).

Los genes seleccionados positivamente a partir del algoritmo diseñado en este trabajo codifican para proteínas presentes en la membrana del merozoíto, proteínas hipotéticas, y, tal como se había descrito anteriormente, proteínas presentes en la superficie del merozoíto. Entre ellas encontramos antígenos bien caracterizados como la familia de las MSA (Yavuz y col., 2011), secretadas por el complejo apical (RAP, SBP) (Brown y col., 1996; Ruef y col., 2000) y el antígeno 12D3 (Harper y col., 1996). Estos resultados coinciden con trabajos previos ya publicados en donde se comprobó la expresión de estos antígenos en merozoítos. A su vez los mismos fueron caracterizados a nivel estructural e inmunológico, y algunos de sus epitopes B o T fueron identificados (Court y col., 1998; Norimine y col., 2002; Wilkowsky y col., 2003; Hidalgo Ruiz y col., 2021). En síntesis, el algoritmo predictivo en base al análisis bioinformático del transcriptoma de merozoítos de *B. bovis* nos permitió contar con una lista de 40 genes candidatos para luego realizar las predicciones de epitopes T por inmunoinformática.

Una vez que contamos con la secuencia del genoma, y habiendo seleccionado el alelo \*001:01 bovino, pasamos a concretar la predicción de epitopes T utilizando las 40 proteínas de *B. bovis* seleccionadas a partir del algoritmo diseñado anteriormente. Como resultado de las predicciones obtuvimos un total de 41 péptidos que serían capaces de unirse con alta afinidad al alelo elegido.

Este número de péptidos resultó entonces adecuado debido a que es un número aceptable para realizar los ensayos *in vitro* con los péptidos sintéticos y para su análisis posterior. En particular, el péptido correspondiente a la proteína EDO05384.1 (MSA-2c) se superpone parcialmente con el péptido HDALKAVKQLIKTDAPFNTSDFDT reportado previamente, el cuál demostró ser inductor de la producción de anticuerpos e IFN- $\gamma$  en ensayos de ELISA y citometría de flujo (Hidalgo Ruiz y col., 2022) (Tabla 18 y Figura 32), confirmando que nuestro abordaje de selección de genes y predicción de epitopes resultó exitoso. Este fue el único caso en que un péptido de nuestra selección coincidió con péptidos anteriormente descritos por otros grupos, mientras que los otros 40 péptidos resultaron novedosos.

Para determinar si los péptidos predichos por bioinformática son verdaderos epitopes T es necesario realizar la validación experimental, es decir realizar estudios *in vitro* que confirmen que los péptidos puedan ser cargados en la molécula BoLAII correspondiente y además ser reconocidos por los linfocitos T CD4+ que hayan estado previamente en contacto con antígenos de *B. bovis*. En este caso, estos se activarán ante el reestímulo específico (en este caso los péptidos predichos) y producirán citoquinas de perfil Th1 como IFN- $\gamma$  y FNT- $\alpha$  además de activar linfocitos B.

Para realizar esta validación experimental es necesario contar con bovinos infectados experimentalmente con *B. bovis*, para lo cual tuvimos en cuenta antecedentes propios con la misma cepa (Jaramillo-Ortiz y col., 2018) que mostraron que una dosis de  $5 \times 10^6$  eritrocitos parasitados si bien resultó suficiente para que los animales desarrollen sintomatología clínica, los animales no requirieron tratamiento farmacológico ya que resolvieron naturalmente la infección. Por este motivo, en nuestros experimentos decidimos utilizar una dosis más alta (que no había sido evaluada hasta el momento) para inducir una infección aguda.

Este cambio resultó exitoso y todos los animales requirieron tratamiento (incluso más de una dosis) indicando por primera vez para esta cepa que una dosis de  $1 \times 10^7$  eritrocitos parasitados es adecuada para inducir un cuadro clínico agudo en los animales. Esta información resulta muy útil para futuros experimentos que utilicen bovinos adultos con esta cepa ya que se evitan pruebas innecesarias de distintas dosis de desafío.

La validación de los 41 péptidos predichos se realizó por ELISA para medir la producción de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos sintéticos como reestímulo. Como resultado de estos análisis, encontramos 7 péptidos que estimulaban la liberación de IFN- $\gamma$  en bovinos heterocigotas que tienen en común el alelo \*001:01: 4 péptidos estimularon células del bovino conteniendo el alelo \*018:01 mientras que 3 lo hicieron con el alelo \*026:01. Nuestras predicciones en base a los datos obtenidos

por inmunoproteómica para los alelos \*018:01 y \*026:01 (presentes en el bovino de donde se obtuvieron los macrófagos para los experimentos de inmunopeptidómica) indicaron que los 7 péptidos se unirían con baja afinidad a estos alelos. Considerando entonces los resultados del ELISA de IFN- $\gamma$ , podríamos concluir entonces que el alelo capaz de unir estos 7 péptidos con alta afinidad es el \*001:01. Sin embargo, esto no ocurrió así ya que los 7 péptidos no estimularon las células de ambos bovinos.

Estos resultados podrían explicarse por 2 motivos: por un lado que la secreción de IFN- $\gamma$  no provenga necesariamente de los linfocitos CD4 presentes en la sangre entera donde se realiza la estimulación con péptidos en el ELISA o bien que la unión *per se* del péptido T a un alelo BoLA determinado no necesariamente implica una respuesta inmunológica específica. Resultados similares a los nuestros fueron reportados anteriormente en estudios realizados con el virus influenza (Lundegaard y col., 2008) y demuestran que no siempre que un alelo se expresa en un individuo, el mismo presentará péptidos capaces de unirse al mismo.

Un caso especial fue el bovino 475 en el que 3 pools de péptidos indujeron la producción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, al realizar la estimulación cada uno de los péptidos en forma individual, ninguno por sí sólo indujo la producción de la citoquina. Esto puede indicar o que los péptidos individualmente generan una liberación de IFN- $\gamma$  menor al umbral de detección por ELISA, o bien que los péptidos en pools generan un efecto de sinergia, potenciando la respuesta generada. Cabe aclarar que este bovino respondió adecuadamente a los controles positivos del experimento.

En particular, el péptido mencionado anteriormente y que pertenece a la proteína MSA-2c no indujo producción de IFN- $\gamma$ , mientras que se ha publicado un trabajo donde un péptido similar al mismo sí lo hizo (Hidalgo Ruiz y col., 2020). Esto puede deberse a que no es exactamente el mismo péptido dado que ambos varían en 11 aa (el péptido reportado en la bibliografía se superpone en los 15 aminoácidos con el predicho por nosotros y es más largo). Se conoce que unos pocos aminoácidos pueden modificar la afinidad de unión de un péptido al CMH (Andreatta y Nielsen, 2018) (Figura 32).

Por último, cabe destacar que para conformar que esta producción de IFN- $\gamma$  sea por parte de los linfocitos T colaboradores, se deben realizar estudios de citometría de flujo con marcadores específicos para estas células como los CD4. Al realizar pruebas preliminares con esta técnica, PBMC y pools de péptidos observamos que, estimulando las células durante 4 días, los mismos indujeron la producción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4+, aunque en niveles muy bajos. Lamentablemente, observamos que al incubar los linfocitos con los péptidos individuales no hubo estimulación. Ya que estas mediciones están limitadas a las células CD4+ IFN- $\gamma$  +, estos resultados

podrían indicar que las células productoras de IFN- $\gamma$  no son linfocitos T colaboradores, sino otras células capaces de secretar esta citoquina como las natural killer o linfocitos T citotóxicos. Otra explicación posible, respaldada por bibliografía previa (Maggioli y col., 2015) es que, al ser muy pocos los clones de linfocitos T colaboradores específicos para cada péptido presentes a los 4 días de cultivo, se necesiten cultivos más largos, de 7 a 10 días, para que estos clones proliferen a niveles detectables por citometría de flujo. Para mantener los linfocitos en cultivo durante tanto tiempo es necesario estimular su proliferación con una citoquina como IL-2, la cual no tuvimos disponible en nuestro laboratorio al momento de escritura de esta tesis, pero está previsto realizar estos experimentos una vez que contemos con el reactivo.

En resumen, en este trabajo realizamos la predicción inmunoinformática de 40 péptidos entre los cuales identificamos 7 potenciales epitopes T de *B. bovis* (17,5 % de los péptidos totales predichos). El único estudio previo de predicción e identificación de epitopes T de un patógeno intracelular bovino fue realizado utilizando un modelo que involucra la bacteria *M. bovis* (Farrel y col., 2016).

Si bien la estrategia de selección de péptidos que utilizaron no fue igual a la nuestra, ya que son patógenos muy diferentes, lograron predecir 268 péptidos a partir del genoma bacteriano, de los cuales 11 fueron confirmados como verdaderos epitopes T durante la validación (4,10%). La estrategia que utilizaron fue exitosa, aunque fue poco efectiva en cuanto a su rendimiento ya que sólo un pequeño porcentaje de los péptidos predichos inicialmente fueron capaces de activar a los linfocitos T de bovinos infectados. En nuestro caso, el rendimiento en términos de epitopes potencialmente estimuladores de respuesta T CD4 fue mucho mayor y es esperable que los programas de predicción de epitopes T entrenados con información experimental mejoren sustancialmente dichas predicciones. Experimentos en curso evaluando nuevas condiciones de cultivo de los PBMC, tiempos de estimulación y usando marcadores para otros tipos celulares podrán finalmente determinar cuál es la subpoblación celular involucrada en la respuesta a los péptidos y cuáles de ellos son candidatos para su inclusión en una futura vacuna.

Finalmente, continuamos con la identificación de péptidos T mediante enfoques inmunopeptidómicos. Estos análisis representaron un gran desafío metodológico debido a que hasta la fecha no se había realizado ningún trabajo de identificación exhaustiva del inmunopeptidoma T de parásitos del género *Babesia*.

En el modelo bovino, sólo un trabajo en el año 2020 estudió el inmunopeptidoma de los hemoparásitos *Theileria parva* y *T. anulata* (Fisch y col, 2020), aunque el modelo biológico que utilizaron fue diferente debido a que los parásitos del género *Babesia* infectan y replican únicamente

dentro de los eritrocitos, mientras que los del género *Theileria* también infectan linfocitos. Por este motivo, en primer lugar, diseñamos un modelo biológico que intentara imitar el proceso de presentación de antígenos que sucede naturalmente en el bovino. Para ello utilizamos un modelo *ex vivo* de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos ya que es un sistema que permite disponer de gran cantidad de células manteniendo vivo al animal. Una vez establecidas las condiciones óptimas pudimos confirmar que los macrófagos que fagocitaron GR parasitados tienen una mayor expresión de moléculas BoLA que los macrófagos que no fagocitaron ninguna célula o que fagocitaron GR normales. Este resultado coincide con los reportes sobre sistemas similares en patógenos como *T. parva* y *Brucella abortus*, donde los macrófagos u otras células presentadoras de antígeno activadas expresan niveles más altos de MHCII que las células normales (DeMartini y col., 1993; Murphy y col., 2002). En infecciones con otros patógenos como micobacterias (Stenger y col., 1998) y virus (York y col., 1994; Fruh y col., 1995; Becerra-Artiles y col., 2022), se ha observado el efecto contrario, disminuyendo la expresión de CMH en CPA infectadas, como parte de un sistema de evasión del sistema inmune desarrollado por el patógeno. En base a estos resultados podemos concluir que no existe en *B. bovis* un mecanismo de evasión de la respuesta inmune similar al reportado en virus o micobacterias que involucre la disminución de la expresión de BoLA clase II. Esto estaría relacionado con que el macrófago no es la célula definitiva donde reside el parásito, sino que su presencia allí está relacionada con la respuesta inmune de las células del bazo o el hígado a la presencia de un glóbulo rojo con alteraciones en su membrana (Hakimi y col., 2020).

Luego de realizar el paso de inmunoprecipitación e identificación de péptidos por espectrometría de masas, obtuvimos un set de 131 péptidos de *B. bovis* expresados en el contexto BoLAII. Cabe destacar que, de los 23.036 péptidos totales encontrados, ningún péptido específico de *B. bovis* fue presentado en clase I. Este hallazgo confirma que los macrófagos bovinos presentes de manera abundante en el bazo e hígado del animal reconocen y fagocitan eritrocitos infectados con el parásito, de esta manera presentando sus antígenos únicamente en el contexto del BoLA clase II (Brown y col., 1993).

Como fue reportado en estudios previos (Clement y col., 2016), encontramos sets de péptidos solapados que difieren en longitud, lo cual es una característica de los peptidomas asociados al MHC clase II. Este hallazgo implica necesidad de generar péptidos consenso, lo que fue realizado de forma bioinformática. Como paso final, este estudio requiere la validación experimental utilizada anteriormente para las predicciones bioinformáticas. Esto está previsto de realizar en el laboratorio en el corriente año.

A pesar de no haber podido realizar las validaciones *in vitro* con los péptidos sintéticos derivados de los encontrados en los macrófagos, podemos hipotetizar que, aunque los péptidos no despierten por sí mismos una respuesta por parte de los linfocitos T CD4+, su formulación con un adyuvante adecuado permitiría despertar una respuesta inmune adecuada, por lo que todos los péptidos obtenidos mediante ensayos de proteómica podrían ser incluidos como candidatos vacunales para su análisis experimental *in vivo*.

Nuestro abordaje inmunoproteómico permitió identificar algunos péptidos provenientes de antígenos previamente reportados y caracterizados en el parásito, como los de la familia MSA, RAP y SBP.

La proteína RAP-1, es un antígeno extensamente caracterizado y se encuentra descrito en muchas especies de babesias: *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. caballi* y *B. divergens* (Dalrymple y col., 1993a; Skucey col., 1996; Kappmeyer y col., 1999) y se ha postulado su uso en tests diagnósticos (Zhou y col., 2007; Rapoport y col., 2014; Niu y col., 2016a; Niu y col., 2016b). En *B. bovis*, la proteína RAP-1 es uno de los antígenos más estudiados ya que es altamente inmunogénica, está involucrada en la unión al eritrocito para su posterior invasión (Yokoyama y col., 2002) y despierta activación de las células T y B (Brown y col., 1998b; Hidalgo Ruiz y col., 2022). En este sentido, se han realizado ensayos de inmunización y posterior desafío con esta proteína de manera recombinante, observándose que RAP-1 estimuló la producción de IFN- $\gamma$  y anticuerpos específicos que resultaron ser insuficientes para proporcionar inmunidad protectora en bovinos frente el desafío con una cepa virulenta de *B. bovis* (Norimine y col., 2003).

Por otra parte, un fragmento de esta proteína fue incluida por nuestro grupo en la formulación de un multiantígeno junto con las proteínas MSA-2c y HSP20 (Jaramillo Ortiz y col., 2014). En el modelo murino la respuesta a este multiantígeno fue caracterizada por altos títulos de anticuerpos IgG específicos y un alto grado de activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ T, los cuales secretaban IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Jaramillo Ortiz y col., 2016). En bovinos, este multiantígeno indujo una fuerte respuesta Th1, aunque no generó protección frente al parásito (Jaramillo Ortiz et al., 2019).

Mediante nuestros experimentos de inmunoproteómica identificamos 2 péptidos de RAP-1 que se encontraron de manera solapada. El epitope T consenso hallado en este trabajo de tesis forma parte de un péptido más largo que ya fue validado *in vitro* midiendo la producción de IFN- $\gamma$  (Norimine y col., 2002; Norimine y col., 2003). A su vez, nuestro péptido difiere de los 2 péptidos de la misma proteína predichos en los experimentos de bioinformática de este trabajo de tesis dado que estos últimos se encuentran en diferentes regiones de la proteína (Figura 37). Una explicación posible a

estas diferencias es no sólo el abordaje utilizado, sino que el alelo seleccionado para la predicción (\*001:01) fue diferente a los alelos utilizados en los ensayos experimentales (\*018:01 y \*026:01). Por su parte, otra proteína correspondiente a la superficie del merozoíto e identificada en nuestros experimentos es la proteína MSA-2C. La familia de proteínas MSA consiste en al menos 5 proteínas que se definen por una secuencia hidrofóbica N-t, una región central hidrofílica y una región conservada en el extremo C-t que contiene una señal de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Florin-Christensen y col., 2002). Estas proteínas están involucradas en el proceso de invasión de *B. bovis* a la célula del hospedador, el cual comienza con la adhesión, en donde se establecen interacciones débiles entre la superficie de la célula hospedadora y las proteínas MSA. Entre ellas, la proteína MSA-2C, es la más conservada de la familia y diversos estudios (Mosqueda y col., 2002; Wilkowsky y col., 2003) han demostrado que anticuerpos contra esta proteína neutralizan la invasión en el eritrocito. Adicionalmente, esta proteína ha sido incluida en el multiantígeno mencionado en el párrafo anterior. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha identificado 1 epítipo T presente en este antígeno durante un estudio reciente (Hidalgo Ruiz y col., 2022), el cual permitió la identificación de péptidos B y T conservados entre diferentes cepas de *B. bovis* que inducen anticuerpos neutralizantes, secreción de IFN- $\gamma$  y generación de linfocitos T de memoria en bovinos. En el estudio de inmunopeptidómica realizado en esta tesis identificamos 2 nuevos péptidos solapados correspondientes a esta proteína. Además, esta proteína también había sido priorizada por nuestro algoritmo para los análisis inmunoinformáticos, aunque, como sucedió con los péptidos identificados de la proteína RAP-1, los péptidos identificados no fueron los mismos, posiblemente también debido a la diferencia entre los alelos utilizados en los experimentos informáticos y proteómicos (Figura 32).

Como nombramos anteriormente, otra familia de proteínas perteneciente al complejo apical es la familia SBP, las cuales son proteínas liberadas por los gránulos densos después de la invasión al merozoíto e intervienen en la formación de un entorno parasitario estable (Guo y col, 2018). Los genes codificantes para estas proteínas fueron utilizados para estudiar la diversidad genética de los parásitos y recientemente se han identificado epítopos B de la proteína SBP2 de *B. bovis* (Mendes y col., 2019; Srionrod y col., 2022). Hasta la fecha, no han sido descritos en *B. bovis* ni en otras especies de *Babesia* ningún epítipo T en esta familia de proteínas. En este trabajo de tesis se predijeron dos posibles epítopos T de la proteína SBP2 en los estudios bioinformáticos, de los cuales uno de estos péptidos sintéticos indujo la producción de IFN- $\gamma$  en los ensayos de validación de los mismos. En nuestros estudios de inmunoproteómica identificamos 15 epítopos T de la proteína

SBP3, la cual también pertenece a la familia de SBP y se localiza en la membrana del eritrocito infectado (Ruef y col., 1998). Esta característica podría explicar la cantidad de péptidos identificados en nuestro análisis.

Debido a que los antígenos nombrados en los párrafos anteriores son inmunodominantes en los sueros de bovinos infectados, era de esperar que en los análisis proteómicos surgieran péptidos de estos antígenos. Sin embargo, una de las ventajas de las tecnologías -ómicas como la proteómica es su sensibilidad. Así, es capaz de identificar antígenos que no necesariamente son inmunodominantes y que no han resultado de interés para su estudio con mayor profundidad. Es por ello que la irrupción de las tecnologías masivas de detección como la proteómica en el descubrimiento de nuevos antígenos implica la detección de otro tipo de moléculas menos abundantes pero que pueden representar alternativas para futuras aplicaciones vacunales.

En este sentido, introduciremos el concepto de “antígenos ocultos” o “concealed antigens”. En parasitología, este término fue utilizado por Willadsen y col. en 1993 en estudios sobre antígenos candidatos para vacunas contra garrapatas para diferenciarlos de los antígenos 'expuestos'. En el trabajo de Willadsen y col. realizaron formulaciones vacunales con antígenos ocultos del intestino de *R. microplus*, generando que los anticuerpos presentes en el suero de los bovinos infectados ocasionen la ruptura de estos órganos cuando la garrapata muerde al bovino y asociado a esto, su muerte (Nuttall y col., 2006). Los antígenos ocultos comprenden cualquier antígeno que no es presentado habitualmente al hospedador y es considerado un potencial blanco terapéutico si está asociado a alguna función vital del parásito. En consecuencia, si el mismo es producido de manera recombinante y administrado junto con un adyuvante adecuado, podría despertar una respuesta inmune por parte del hospedador, diferente a la inducida por los antígenos expuestos. Con esta estrategia se obtuvo la primera vacuna contra la garrapata *R. microplus* que mostró un buen desempeño, disminuyendo sustancialmente el número de animales infectados con patógenos transmitidos por el artrópodo.

Entre los péptidos que aparecieron abundantemente presentados por moléculas BoLAI1 en macrófagos que fagocitaron eritrocitos infectados, encontramos los correspondientes a 2 proteínas que podrían considerarse como antígenos “ocultos” en *B. bovis*. Las mismas están asociadas al metabolismo de glucosa: la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y la L- lactato deshidrogenasa (LDH). Estas se encuentran además entre las 3 proteínas con mayor cobertura en nuestro set de datos (18 y 12 péptidos respectivamente), indicando que son proteínas presentes en abundancia en la célula. Aunque actualmente no se dispone de datos proteómicos de merozoitos

libres de *B. bovis*, los datos de transcriptómica disponibles indican que la transcripción de estas proteínas está incrementada entre 3.6 y 4 veces en el estadio de merozoíto respectivamente (Ueti y col., 2020).

La GADPH una de las enzimas importantes en la glucólisis y participa en la conversión de gliceraldehído 3-P en 1,3-bis-fosfoglicerato, sin embargo, se conoce que tiene otras funciones que podrían explicar su identificación en este trabajo. En el género *Plasmodium*, esta molécula desempeña un papel fundamental durante el proceso de invasión del patógeno a los hepatocitos. A su vez se ha demostrado que un anticuerpo dirigido al péptido 39 de esta proteína inhibe la invasión del parásito (Cha y col., 2016) sin generar reacción cruzada con GADPH humana. Resultados similares se observaron en el género *Eimeria*, otro género de parásitos apicomplejos que infectan aves. En estos parásitos, la molécula también está relacionada con la invasión a los enterocitos (Lakho y col., 2020), y, además, cuando se la utilizó como antígeno vacunal, GADPH recombinante demostró proteger a los pollos contra *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, y la infección mixta de las tres especies (Tian y col., 2017; Liu y col., 2020). La GAPDH se considera además un blanco atractivo para los fármacos contra los parásitos protozoarios, ya que los parásitos carecen de un ciclo de ácido cítrico funcional por lo que dependen únicamente de la glucólisis para satisfacer sus necesidades energéticas. Por su parte, los fármacos que se desarrollen serían seguros ya que su estructura cristalina es diferente a la del humano (Akinyi y col., 2008).

La LDH es otra proteína interviniente en el proceso de glucólisis en microbios, plantas, células tumorales y células animales. Al igual que la GADPH y por los mismos motivos, es considerada como un candidato potencial para el desarrollo de drogas terapéuticas. En *B. bovis*, la LDH se expresa tanto en el citoplasma de los parásitos como en la superficie de la membrana de glóbulos rojos infectados (Bork et al., 2004), lo que también puede explicar la alta cantidad de péptidos identificados a partir de esta proteína. En *E. acervulina*, se ha desarrollado una vacuna de ADN que lleva el gen del antígeno LDH, la cual indujo inmunidad protectora contra la infección en ensayos de desafío (Song y col., 2010). En base a estas experiencias con *Eimeria*, se podría hipotetizar entonces que, si bien las proteínas GADPH y LDH no son inmunodominantes, una vacuna que dirija la respuesta hacia estas enzimas podría ser considerada una alternativa contra otros parásitos apicomplejos, incluyendo *B. bovis*.

Por su parte, la proteína EDO07000.1 corresponde a la familia de las proteínas VESA, las cuales están involucradas en las alteraciones adhesivas de los eritrocitos infectados con *B. bovis* (Jackson y col., 2014). El parásito varía estos antígenos de superficie de forma ilimitada a través de un mecanismo

de recombinación segmental, lo que permite que los eritrocitos parasitados se unan a una variedad de diferentes receptores del hospedador, facilitando el secuestro y la evasión del sistema inmune (Al-Khedery y Allred, 2006; Dzikowski y Deitsch, 2006). Al ser tan variables, estas proteínas no serían de elección para candidatos vacunales.

Otras proteínas identificadas en nuestro estudio (EDO05142.1; EDO05627.1; EDO05391.1; EDO05950.1; EDO07765.1; EDO07051.1) tienen relación con los ribosomas, procesamiento del ARN, traducción y proteólisis. A menudo, estas proteínas suelen identificarse en estudios proteómicos en alta abundancia (Conneley y col., 2022) y esto suele estar relacionado con la proporción de éstas en la célula. En los datos de transcriptómica reportados por Ueti y col., 2020, estas proteínas se encuentran sobreexpresadas entre 1 y 2 veces en el estadio de merozoíto, lo que podría explicar la abundancia de las mismas.

La miosina A fue la única proteína identificada en nuestro análisis con actividad motora. Esta proteína se describió inicialmente en *T. gondii* (Heintzelman y col., 1999) y posteriormente en *P. falciparum* (Bergman y col., 2003). En *B. bovis* se demostró que es esencial para la motilidad, la invasión y la salida del eritrocito (Lew y col., 2002). Por su importancia en el ciclo de vida del parásito podría ser un blanco terapéutico, y resulta de interés su rol como antígeno.

Por otro lado, detectamos un péptido de la proteína CDPK4. La misma fue la única identificada con actividad kinasa en este estudio y se conoce que en *T. gondii* participa en varios procesos celulares como en la salida de la célula huésped del parásito, en la motilidad de la membrana externa, en la invasión, y en la división celular (Foroutan y col., 2021). La familia CDPK es considerada como una buena opción terapéutica contra *T. gondii* y una opción apropiada para el diseño de vacunas. En este sentido, estudios recientes predijeron bioinformáticamente epitopes T de esta proteína en el parásito (Foroutan y col., 2021). Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún informe sobre la inmunización con CDPK4 en animales de experimentación, si bien sí existen varios estudios en los que la vacunación con CDPK1, CDPK2, CDPK3, CDPK5 y CDPK6 indujo fuertes respuestas humorales y celulares y han prolongado el tiempo de supervivencia del parásito en modelo de ratón. En particular, en *B. bovis* se demostró que esta proteína se encuentra sobreexpresada en etapas sexuales del parásito inducidas *in vitro* y durante el desarrollo del parásito dentro del intestino medio de la garrapata, aunque no hay estudios en estadios sanguíneos del parásito (Hussein y col., 2021). Por lo tanto, resulta interesante estudiar el rol de la misma en estos estadios si se demuestra su potencial antigénico.

Por otra parte, la proteína EDO06944.1 está asociada a la membrana de la mitocondria con función de transporte transmembrana. Hasta el momento no se han utilizado proteínas mitocondriales como candidatos vacunales en apicomplejos, por lo que no conocemos su capacidad antigénica, pero sí varias proteínas mitocondriales fueron estudiadas como blancos terapéuticos en *Plasmodium* (Koumpoura y col., 2021).

Las proteínas que fueron identificadas durante los estudios inmunoproteómicos en este trabajo de tesis y que no se encuentran detalladas en esta discusión, carecen de evidencia en estudios previos como su rol como antígenos o candidatos terapéuticos. La información correspondiente a éstas y el resto de las proteínas mencionadas se encuentra disponible en la Tabla 18 de Resultados.

En conclusión, en el presente trabajo de tesis se obtuvieron los siguientes logros:

Se analizó por primera vez la diversidad genética de razas bovinas índicas y mixtas, que son de interés productivo para el sector ganadero del NOA y NEA y donde se ha aportado información básica para catalogar de manera detallada a las mismas, así como también se analizó con un enfoque aplicado la conservación de regiones críticas del BoLA-DRB3.2 para la predicción de epitopes T en estas razas.

Se ha realizado una predicción *in silico* de epitopes T del parásito *B. bovis* utilizando los datos de los alelos frecuentes en razas índicas y mixtas, y la información del genoma de una cepa argentina virulenta del patógeno. Esta predicción permitió obtener 7 péptidos que fueron evaluados *in vitro* en su capacidad de inducir la secreción de una citoquina característica del perfil Th1 de linfocitos CD4+.

Ideamos y pusimos a punto un modelo de interacción parásito-célula hospedadora bovina para la identificación de péptidos T de *B. bovis*, que permitió la identificación de 28 péptidos consenso novedosos por una estrategia de inmunopeptidómica. Este abordaje permitió identificar péptidos T del parásito novedosos que no habían sido descritos hasta la fecha y que no podrían haberse identificado en tiempos razonables mediante las técnicas comúnmente utilizadas.

Si bien restan por analizar la capacidad de estos péptidos de generar una respuesta inmunológica asociada a su condición, cabe recalcar la importancia de los datos obtenidos mediante estos análisis ya que podrán ser utilizados en distintas plataformas de expresión para su evaluación como candidatos vacunales. Además, los datos obtenidos por inmunopeptidómica permitirán en un futuro entrenar algoritmos informáticos para predicciones futuras que involucren otros agentes infecciosos que afectan al bovino de distinto origen, lo cual, como demostramos anteriormente, aumenta sustancialmente la calidad de las predicciones.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Akinyi S, Gaona J, Meyer EV, Barnwell JW, Galinski MR, Corredor V. (2008). Phylogenetic and structural information on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) in *Plasmodium* provides functional insights. *Infect Genet Evol.*;8(2):205-12. doi: 10.1016/j.meegid.2007.10.003. PMID: 18472435.
- Alcaraz, E., Rizzi, C. y Draghi, M. G. (2004). Aborto bovino por transmisión transplacentaria de *B. bovis*. XV Simposio de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (pp. 1–2).
- Allred, D.R., Hines, S.A., Ahrens, K.P. (1993). Isolate-specific parasites antigens of *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. *Mol Biochem Parasitol.*;60(1):121-32. doi: 10.1016/0166-6851(93)90035-v. PMID: 8366886.
- Al-Khedery B, Allred DR. (2006). Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the *ves* multigene family, within a bidirectional locus of active transcription. *Mol. Microbiol. Jan*;59(2):402-14. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04993. x. PMID: 16390438.
- Alspach E, Lussier DM, Miceli AP, Kizhvatov I, DuPage M, Luoma AM, Meng W, Lichti CF, Esaulova E, Vomund AN, Runci D, Ward JP, Gubin MM, Medrano RFV, Arthur CD, White JM, Sheehan KCF, Chen A, Wucherpfennig KW, Jacks T, Unanue ER, Artyomov MN, Schreiber RD. (2019). MHC-II neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy. *Nature*; 574(7780):696-701. doi: 10.1038/s41586-019-1671-8. PMID: 31645760; PMCID: PMC6858572.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- Andreatta M, Alvarez B, Nielsen M (2017). GibbsCluster: unsupervised clustering and alignment of peptide sequences. *Nucleic Acids Res.*;45(W1): W458-W463. doi: 10.1093/nar/gkx248. PMID: 28407089; PMCID: PMC5570237.
- Andreatta M, Nielsen M. (2018). Bioinformatics Tools for the Prediction of T-Cell Epitopes. *Methods Mol Biol.* 1785:269-281. doi: 10.1007/978-1-4939-7841-0\_18. PMID: 29714025.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Anuntasomboon P, Siripattanapipong S, Unajak S, Choowongkomon K, Burchmore R, Leelayoova S, Mungthin M, E-Kobon T (2022). Making the Most of Its Short Reads: A Bioinformatics Workflow for Analysing the Short-Read-Only Data of *Leishmania orientalis* (Formerly Named *Leishmania siamensis*) Isolate PCM2 in Thailand. *Biology (Basel)*. 11(9):1272. doi: 10.3390/biology11091272. PMID: 36138751; PMCID: PMC9495971.
- Anziani y Grupo de Parasitología de la EEA - INTA Rafaela. (2003). Tristeza de los bovinos; prevención de la babesiosis y la anaplasmosis bovinas. *Revista Hereford*, 67(630):60-62.
- Anziani (2011). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina, INTA, EEA Rafaela.

- Asada, M., Goto, Y., Yahata, K., Yokoyama, N., Kawai, S., Inoue, N., Kawazu, S. I. (2012). Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. *PLoS ONE*, 7(4), e35227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035227>.
- Assefa S., Keane T.M., Otto T.D., Newbold C., and M. Berriman. (2009). ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics*. 25 (15):1968-1969. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp347>.
- Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobulinurie bacterienne boeuf. *Compt. Rend. Acad. Sci. C R Acad Sci Ser III Sci Vie*. 1888; 107:692–694.
- Baravalle ME, Thompson C, Valentini B, Ferreira M, Torioni de Echaide S, Christensen MF, Echaide I. (2012). *Babesia bovis* biological clones and the inter-strain allelic diversity of the *Bv80* gene support subpopulation selection as a mechanism involved in the attenuation of two virulent isolates. *Vet Parasitol*;190(3-4):391-400. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.037. PMID: 22820058.
- Barbera, Benedersky, Cetrá, Flores, Hug, Perellano, Pizzio, Rosatti, Sampedro, Sarmiento. (2018). *Cría Vacuna en el NEA*, INTA Ediciones.
- Baxter R, Hastings N, Law A, Glass EJ. (2008). A rapid and robust sequencebased genotyping method for *BoLA-DRB3* alleles in large numbers of heterozygous cattle. *Anim Genet*.;39(5):561-3. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01757. x. PMID: 18637877.
- Baxter R, Craigmile SC, Haley C, Douglas AJ, Williams JL, Glass EJ. (2009). *BoLA-DR* peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*. Dec 10;28(1):28-37. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.131. PMID: 19833250.
- Becerra-Artiles A, Nanaware PP, Muneeruddin K, Weaver GC, Shaffer SA, Calvo-Calle JM, Stern LJ. (2022). Immunopeptidome profiling of human coronavirus OC43-infected cells identifies CD4 T cell epitopes specific to seasonal coronaviruses or cross-reactive with SARS-CoV-2. *bioRxiv [Preprint]*. 1:2022.12.01.518643. doi: 10.1101/2022.12.01.518643. PMID: 36482973; PMCID: PMC9727760.
- Behl JD, Verma NK, Tyagi N, Mishra P, Behl R, Joshi BK. (2012). The major histocompatibility complex in bovines: a review. *ISRN Vet Sci*. May 28; 2012:872710. doi: 10.5402/2012/872710. PMID: 23738132; PMCID: PMC3658703.
- 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. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028. PMID: 15223320.
- Benoist CO, Mathis DJ, Kanter MR, Williams VE 2nd, McDevitt HO. (1983). Regions of allelic hypervariability in the murine A alpha immune response gene. *Cell*.;34(1):169-77. doi: 10.1016/0092-8674(83)90147-2. PMID: 6309407.
- Bergman LW, Kaiser K, Fujioka H, Coppens I, Daly TM, Fox S, Matuschewski K, Nussenzweig V, Kappe SH. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of sporozoites. *J Cell Sci*.;116(Pt 1):39-49. doi: 10.1242/jcs.00194. PMID: 12456714.
- Bettencourt P, Müller J, Nicastrì A, Cantillon D, Madhavan M, Charles PD, Fotso CB, Wittenberg R, Bull N, Pinpathomrat N, Waddell SJ, Stylianou E, Hill AVS, Ternette N, McShane H. (2020). Identification of antigens presented by MHC for vaccines against tuberculosis. *NPJ Vaccines*.;5(1):2. doi: 10.1038/s41541-019-0148-y. PMID: 31908851; PMCID: PMC6941960.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*.;329(6139):506-12. doi: 10.1038/329506a0. PMID: 3309677.

- Bock R, Jackson L, de Vos A, J.W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, Suppl: S247–69. doi: 10.1017/s0031182004005190. PMID: 15938514.
- Boero, J. J. (1976). *Piroplasmosis* (Eudeba). Buenos Aires, Argentina.
- Bohórquez MD, Ordoñez D, Suárez CF, Vicente B, Vieira C, López-Abán J, Muro A, Ordóñez I, Patarroyo MA. (2020). Major Histocompatibility Complex Class II (*DRB3*) Genetic Diversity in Spanish Morucha and Colombian Normande Cattle Compared to Taurine and Zebu Populations. *Front Genet.* doi: 10.3389/fgene.2019.01293. PMID: 31998362; PMCID: PMC6965167.
- Bolaños I.; Hernandez D.; Alvarez L. (2017). Asociación de los alelos del gen *BoLA-DRB3* con la infección natural de *Babesia* spp en el ganado criollo Hartón del Valle. *Arch Zootec.*;66(253):113–20.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.*;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Wagner, G. y Igarashi, I. (2002). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3771–3775. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3771-3775.2002>.
- Bork S, Okamura M, Boonchit S, Hirata H, Yokoyama N, Igarashi I. (2004). Identification of *Babesia bovis* L-lactate dehydrogenase as a potential chemotherapeutical target against bovine babesiosis. *Mol Biochem Parasitol.*;136(2):165-72. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.03.009. PMID: 15478796.
- Bowman S, Lawson D, Basham D, Brown D, Chillingworth T, et al. (1999). The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 400: 532–538. doi: 10.1038/22964. PMID: 10448855.
- Brayton, K. A., Lau, A. O. T., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L. S., Berens, S. J., y Nene, V. M. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathogens*, 3(10), e148. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, et al. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33–39. doi: 10.1038/364033a0. PMID: 8316295.
- Brown, W C y Palmer, G. H. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology Today*, 15(7), 275–281. doi: 10.1016/s0169-4758(99)01471-4. PMID: 10377530.
- Brown, W. C, Norimine, J., Knowles, D. P. y Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041>.
- Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J. C. y Florin-Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 147(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.031>.
- Callow, L. L., Mellors, L. T. y Mcgregor, W. (1979). Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *International Journal for Parasitology*, 9(4), 333–338. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(79\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(79)90083-3).
- Carignano HA, Beribe MJ, Caffaro ME, Amadio A, Nani JP, Gutierrez G, Alvarez I, Trono K, Miretti MM, Poli MA. (2017). *BoLA-DRB3* gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection

- levels in Holstein and Holstein × Jersey crossbreed dairy cattle. *Anim Genet*;48(4):420-430. doi: 10.1111/age.12566. PMID: 28568505.
- Cha SJ, Kim MS, Pandey A, Jacobs-Lorena M. (2016). Identification of GAPDH on the surface of *Plasmodium* sporozoites as a new candidate for targeting malaria liver invasion. *J Exp Med.*;213(10):2099-112. doi: 10.1084/jem.20160059. PMID: 27551151; PMCID: PMC5030802.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. y Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: Adaptation to long lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>.
- Clement CC, Becerra A, Yin L, Zolla V, Huang L, Merlin S, Follenzi A, Shaffer SA, Stern LJ, Santambrogio L. (2016). The Dendritic Cell Major Histocompatibility Complex II (MHC II) Peptidome Derives from a Variety of Processing Pathways and Includes Peptides with a Broad Spectrum of HLA-DM Sensitivity. *J Biol Chem.* ;291(11):5576-5595. doi: 10.1074/jbc.M115.655738. PMID: 26740625; PMCID: PMC4786700.
- Connelley T, Nicastri A, Sheldrake T, Vrettou C, Fisch A, Reynisson B, Buus S, Hill A, Morrison I, Nielsen M, Ternette N. (2022). Immunopeptidomic Analysis of BoLA-I and BoLA-DR Presented Peptides from *Theileria parva* Infected Cells. *Vaccines (Basel).*;10(11):1907. doi: 10.3390/vaccines10111907. PMID: 36423003; PMCID: PMC9699068.
- Court RA, Sitte K, Opdebeeck JP, East IJ. (1998). Mapping the T cell epitopes of the *Babesia bovis* antigen 12D3: implications for vaccine design. *Parasite Immunol.*;20(1):1-8. doi: 10.1046/j.1365-3024.1998.t01-1-00116. x. PMID: 9491412.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Asenzo, G., Benitez, D., Florin-Christensen, M., Gonzalez-Oliva, A. y Madruga, C.R. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Veterinary Parasitology*, 162(3–4), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.040>.
- Crooks G, Hon G, Chandonia J, Brenner S. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.*;14:1188–90. doi: 10.1101/gr.849004. PMID: 15173120; PMCID: PMC419797.
- Cutullé, C., Lovis, L., Inés, B., Agostino, D., Gerardo, G., Morici, G. y Luis, J. (2013). In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.014>.
- Da Mota AF, Gabriel JE, Martinez ML, Coutinho LL. (2002). Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-*DRB3*) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *Eur J Immunogenet.*;29(3):2237. doi: 10.1046/j.1365-2370.2002.00294. x. PMID: 12047358.
- Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, Dimmock CM, Gale KR, Boese R, Wright IG (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(2):181-92. doi: 10.1016/0166-6851(93)90194-3. PMID: 8433711.
- Das DN, Sri Hari VG, Hatkar DN, Rengarajan K, Saravanan R, Suryanarayana VV, Murthy LK. (2012). Genetic diversity and population genetic analysis of bovine MHC class II *DRB3.2* locus in three *Bos indicus* cattle breeds of Southern India. *Int J Immunogenet.*;39(6):508-19. doi: 10.1111/j.1744-313X.2012.01126.x. PMID: 22607523.

- Davies CJ, Andersson L, Ellis SA, Hensen EJ, Lewin HA, Mikko S, et al. (1996). Nomenclature for factors of the BoLA system: Report of the ISAG BoLa Nomenclature Committee. *Anim Genet.* 1997;28(3):159–68
- De Groot AS, Moise L, Terry F, Gutierrez AH, Hindocha P, Richard G, Hoft DF, Ross TM, Noe AR, Takahashi Y, Kotraiah V, Silk SE, Nielsen CM, Minassian AM, Ashfield R, Ardito M, Draper SJ, Martin WD. (2020). Better Epitope Discovery, Precision Immune Engineering, and Accelerated Vaccine Design Using Immunoinformatics Tools. *Front Immunol.*;11:442. doi: 10.3389/fimmu.2020.00442. PMID: 32318055; PMCID: PMC7154102.
- de la Fournière S, Paoletta MS, Guillemi EC, Sarmiento NF, Donati PA, Wilkowsky SE, Farber MD. (2021). Development of highly sensitive one step-PCR tests for improved detection of *B. bigemina* and *B. bovis*. *Vet Parasitol*; 296:109493. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109493. PMID: 34130095.
- de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enríquez A, Canales M, Ramos E, Boué O, Machado H, Leonart R. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal.*;15(3-5):143-8. doi: 10.1016/s1050-3862(99)00018-2. PMID: 10596754.
- De S, Singh RK. (2006). Identification of new MHC-*DRB3* alleles from Indian (*Bos indicus*) cattle. *Anim Genet.*;37(6):605. doi: 10.1111/j.1365-2052.2006.01539. x. PMID: 17121616.
- De Vos, A.J.D.E., Lew, A., Kingston, T.G., Eraser, R., Grey, M. (1995). Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. *Aust Vet J.*;72(8):296-300. doi: 10.1111/j.1751-0813.1995.tb03558.x. PMID: 8579560.
- DeMartini JC, MacHugh ND, Naessens J, Teale AJ. (1993). Differential in vitro and in vivo expression of MHC class II antigens in bovine lymphocytes infected by *Theileria parva*. *Vet Immunol Immunopathol.*;35(3-4):253-73. doi: 10.1016/0165-2427(93)90038-6. PMID: 8430496.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME. (1997). Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.*;80(2):406–12. doi: 10.3168/jds. S0022-0302(97)75951-4. PMID: 9058284.
- Duangjinda M, Jindatajak Y, Tipvong W, Sriwarothai J, Pattarajinda V, Katawatin S, Boonkum W. (2013). Association of BoLA-*DRB3* alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. *Vet Parasitol.*;196(3-4):314-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.005.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V. y Fourmaux, M. N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1007–1013. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00076-9).
- Dzikowski R, Deitsch KW. (2009). Genetics of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Curr Genet.*;55(2):103-10. doi: 10.1007/s00294-009-0233-2. PMID: 19242694; PMCID: PMC3640992.
- Echaide, I. (2008). Bovine babesiosis: Vaccines. Curitiba. Brasil. <http://cniia.inta.gob.ar/helminto/index.htm>.
- Ellis SA, Ballingall KT. (1999). Cattle MHC: evolution in action? *Immunol Rev.*; 167:159-68. doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01389. x. PMID: 10319258.
- Ellis SA, Codner G. (2011). The impact of MHC diversity on cattle T cell responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Jul 15;148(1-2):74-7. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.009. Mar 12. PMID: 21466899.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*;131(2):479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*;1:47-50. PMID: 19325852; PMCID: PMC2658868.
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290–6. doi: 10.1038/351290a0. PMID: 1709722.
- Farrell D, Jones G, Pirson C, Malone K, Rue-Albrecht K, Chubb AJ, Vordermeier M, Gordon SV (2016). Integrated computational prediction and experimental validation identifies promiscuous T cell epitopes in the proteome of *Mycobacterium bovis*. *Microb Genom*. 2016 Aug 25;2(8): e000071. doi: 10.1099/mgen.0.000071. PMID: 28348866; PMCID: PMC5320590.
- Favero R, Menezes GRO, Torres RAA, Silva LOC, Bonin MN, Feijó GLD, Altrak G, Niwa MVG, Kazama R, Mizubuti IY, Gomes RC. (2019). Crossbreeding applied to systems of beef cattle production to improve performance traits and carcass quality. *Animal*. ;13(11):2679-2686. doi: 10.1017/S1751731119000855. PMID: 31064578.
- Felsenstein j. (1989). PHYLIP- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5.;164–6.
- Figueroa, J. V. y Buening, G. M. (1991). In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(5), 997–1003. doi: 10.1128/jcm.29.5.997-1003.1991. PMID: 2056067; PMCID: PMC269922.
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson G. S y Buening, G. M. (1992). Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 2097–2103. doi: 10.1128/jcm.30.10.2576-2582.1992. PMID: 1400956; PMCID: PMC270481.
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S. y Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50(1–2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90008-B](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90008-B).
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., S., J. G., Goff, W. L. y Buening, G. M. (1994). Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *B. bovis*. *Rev. Latinoam Microbiol*, 36, 47–55. PMID: 7938942.
- Fisch A, Reynisson B, Benedictus L, Nicastrì A, Vasoya D, Morrison I, Buus S, Ferreira BR, Kinney Ferreira de Miranda Santos I, Ternette N, Connelley T, Nielsen M. (2021). Integral Use of Immunopeptidomics and Immunoinformatics for the Characterization of Antigen Presentation and Rational Identification of BoLA-DR-Presented Peptides and Epitopes. *J Immunol*. 2021;206(10):2489-2497. doi: 10.4049/jimmunol.2001409. PMID: 33789985; PMCID: PMC8113073.
- Florin-Christensen M, Suarez CE, Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF. (2002). The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infect Immun*. Jul;70(7):3566-75. doi: 10.1128/IAI.70.7.3566-3575.2002. PMID: 12065497; PMCID: PMC128111.
- Florin-christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A. y Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141, 1563–1592. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>.

- Foroutan M, Ghaffari AD, Soltani S, Majidani H, Taghipour A, Sabaghan M. (2021). Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase 4 (CDPK4) as *Toxoplasma gondii* vaccine target. BMC Res Notes.;14(1):50. doi: 10.1186/s13104-021-05467-1. PMID: 33549149; PMCID: PMC7865105.
- Fremont, D. H., Matsumura, M., Stura, E. A., Peterson, P. A., & Wilson, I. A. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*, 257(5072), 919–927. Doi: 10.1126/science.1323877
- Frénal, K., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M. y Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 645–660. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.86>.
- Fruh, K., Kwangseog, A., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P.M., Tampe, R., Peterson, P.A. and Yang, Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*.;375(6530):415-8. doi: 10.1038/375415a0. PMID: 7760936.
- Gaffar, F., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J. y De Vries, E. (2004). A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.02.006>.
- García-Briones MM, Russell GC, Oliver RA, Tami C, Taboga O, Carrillo E, Palma EL, Sobrino F, Glass EJ. (2000). Association of bovine *DRB3* alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine*.;19(9-10):1167-71. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00313-3. PMID: 11137253.
- Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, et al. (2005). Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* 309: 134–137.
- Gelhaus A, Schnittger L, Mehlitz D, Horstmann RD, Meyer CG. (1995). Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-*DRB3* alleles. *Anim Genet*. 1995 Jun;26(3):147-53. doi: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb03154.x. PMID: 7793681.
- Gilchuk, P., Spencer, C. T., Conant, S. B., Hill, T., Gray, J. J., Niu, X., Zheng, M., Erickson, J. J., Boyd, K. L., McAfee, K. J., Oseroff, C., Hadrup, S. R., Bennink, J. R., Hildebrand, W., Edwards, K. M., Crowe, J. E. Jr, Williams, J. V., Buus, S., Sette, A., Schumacher, T. N. M., Joyce, S. (2013). Discovering naturally processed antigenic determinants that confer protective T cell immunity. *Journal of Clinical Investigation*, 123(5), 1976–1987. Doi: 10.1172/JCI67388.
- Gimenez G, Magalhães KG, Belaunzarán ML, Poncini CV, Lammel EM, Gonzalez Cappa SM, Bozza PT, Isola EL. (2010). Lipids from attenuated and virulent *Babesia bovis* strains induce differential TLR2-mediated macrophage activation. *Mol Immunol*. ;47(4):747-55. doi: 10.1016/j.molimm.2009.10.014. PMID: 19910051.
- Gimenez G, Belaunzarán ML, Poncini CV, Blanco FC, Echaide I, Zamorano PI, Lammel EM, González Cappa SM, Isola EL (2013). *Babesia bovis*: lipids from virulent S2P and attenuated R1A strains trigger differential signalling and inflammatory responses in bovine macrophages. *Vet Parasitology*.;140(4):530-40. doi: 10.1017/S003118201200193X.
- Gimenez G, Belaunzarán ML, Magalhães KG, Poncini CV, Lammel EM, González Cappa SM, Bozza PT, Isola EL. (2016). Involvement of TLR6 in the induction of COX-2, PGE2 and IL-10 in macrophages by lipids from virulent S2P and attenuated R1A *Babesia bovis* strains. *Vet Parasitol*.15;223:127-32. doi: 10.1016/j.vetpar.04.033. PMID: 27198789.

- Giovambattista G, Takeshima S nosuke, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LAA, Saito H. (2013). Characterization of bovine MHC *DRB3* diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene*;519(1):150–8. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.002. PMID: 23333729.
- Glass EJ, Oliver RA, Russell GC. (2000). Duplicated DQ Haplotypes Increase the Complexity of Restriction Element Usage in Cattle. *J Immunol.*;165(1):134–8. doi: 10.4049/jimmunol.165.1.134. PMID: 10861045.
- Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Elsasser, T. H., Davis, W. C. y Valdez, R. A. (2002). IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- $\gamma$ - and TNF- $\alpha$ -dependent nitric oxide production from bovine mononuclearphagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 84(3–4), 237–251. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00413-5).
- Gohil, S., Kats, L. M., Sturm, A. y Cooke, B. M. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: Moovin' forward. *Trends in Parasitology*, 26(12), 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>.
- Goudet. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered.*;91(6):509–10.
- Guo J, Hu J, Sun Y, Yu L, He J, He P, Nie Z, Li M, Zhan X, Zhao Y, Luo X, Liu J, He L, Zhao J. (2018). A novel *Babesia orientalis* 135-kilodalton spherical body protein like: identification of its secretion into cytoplasm of infected erythrocytes. *Parasit Vectors.*;11(1):205. doi: 10.1186/s13071-018-2795-7. PMID: 29580261; PMCID: PMC5870374.
- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbecq, S., Kleuskens, J. y Precigout, E. (2007). Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology*, 134(2), 187–196. <https://doi.org/10.1017/s0031182006001399>.
- Hakimi H, Templeton TJ, Sakaguchi M, Yamagishi J, Miyazaki S, Yahata K, Uchihashi T, Kawazu SI, Kaneko O, Asada M. (2020). Novel *Babesia bovis* exported proteins that modify properties of infected red blood cells. *PLoS Pathog.* Oct 5;16(10): e1008917. doi: 10.1371/journal.ppat.1008917.
- Harper GS, Hibbs AR, East IJ, Waltisbuhl DJ, Jorgensen WK, Riddles PW. (1996). *Babesia bovis*: biosynthesis and localisation of 12D3 antigen in bovine erythrocytes. *Int J Parasitol.*;26(11):1255–62. doi: 10.1016/s0020-7519(96)00105-1. PMID: 9024870.
- Hedrick PW. (1998). Balancing selection and MHC. *Genetica*;104(3):207–14. doi: 10.1023/a:1026494212540. PMID: 10386384.
- Hein, W.R., Mackay, C.R. (1991). Prominence of Gamma-Delta T-cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12, 30–34. [https://doi.org/10.1016/0167-1355\(91\)90109-7](https://doi.org/10.1016/0167-1355(91)90109-7).
- Heintzelman MB, Schwartzman JD. (1999). Characterization of myosin-A and myosin-C: two class XIV unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *Cell Motil Cytoskeleton.*;44(1):58–67. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(199909)44:1<58: AID-CM5>3.0.CO;2-R. PMID: 10470019.
- Henderson RA, Cox AL, Sakaguchi K, Appella E, Shabanowitz J, et al. (1993). Direct identification of an endogenous peptide recognized by multiple HLA-A2.1-specific cytotoxic T cells. *PNAS* 90:10275–79 44.
- Hidalgo-Ruiz M, Mejia-López S, Pérez-Serrano RM, Zaldívar-Lelo de Larrea G, Ganzinelli S, Florin-Christensen M, Suarez CE, Hernández-Ortiz R, Mercado-Uriostegui MA, Rodríguez-Torres A, Carvajal-Gamez BI, Camacho-Nuez M, Wilkowsky SE, Mosqueda J. (2020). *Babesia bovis* AMA-1,

MSA-2c and RAP-1 contain conserved B and T-cell epitopes, which generate neutralizing antibodies and a long-lasting Th1 immune response in vaccinated cattle. *Vaccine*. 16;40(8):1108-1115. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.01.023.

Hodgson, J. L. (1992). Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 653(1), 42–51. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb19628.x>.

Hope, M., Riding, G., Menzies, M., Colditz, I., Reverter, A., Willadsen, P., Precinct, Q.B., Lucia, S. (2005). Potential for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate 439–445. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00795. x. PMID: 16255742.

Hunt, D. F., Michel, H., Dickinson, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M., & Sette, A. (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science*, 256(5065), 1817–1820. Doi: 10.1126/science.1319610.

Hussein HE, Johnson WC, Taus NS, Capelli-Peixoto J, Suarez CE, Mousel MR, Ueti MW. (2021). Differential expression of calcium-dependent protein kinase 4, tubulin tyrosine ligase, and methyltransferase by xanthurenic acid-induced *Babesia bovis* sexual stages. *Parasit Vectors*. Aug 10;14(1):395. doi: 10.1186/s13071-021-04902-3. PMID: 34376245; PMCID: PMC8353865.

Jackson AP, Otto TD, Darby A, Ramaprasad A, Xia D, Echaide IE, Farber M, Gahlot S, Gamble J, Gupta D, Gupta Y, Jackson L, Malandrin L, Malas TB, Moussa E, Nair M, Reid AJ, Sanders M, Sharma J, Tracey A, Quail MA, Weir W, Wastling JM, Hall N, Willadsen P, Lingelbach K, Shiels B, Tait A, Berriman M, Allred DR, Pain A. (2014). The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host-parasite interaction. *Nucleic Acids Res.*;42(11):7113-31. doi: 10.1093/nar/gku322. PMID: 24799432; PMCID: PMC4066756.

Jacob SS, Sengupta PP, Paramanandham K, Suresh KP, Chamuah JK, Rudramurthy GR, Roy P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol.*; 283:109136. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109136. PMID: 32574977.

Jaramillo Ortiz, J.M., Del Médico, M. P., Zanetti, F. A., Molinari, M. P., Gravisaco, M. J., Calamante, G. y Wilkowsky, S. E. (2014). Vaccine strategies against *Babesia bovis* based on prime-boost immunizations in mice with modified vaccinia Ankara vector and recombinant proteins. *Vaccine*, 32(36), 4625–4632. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.075>.

Jaramillo Ortiz, J.M., Molinari, M. P., Gravisaco, M. J., Paoletta, M. S., Montenegro, V. N. y Wilkowsky, S. E. (2016). Evaluation of different heterologous prime – boost immunization strategies against *Babesia bovis* using viral vectored and protein-adjuvant vaccines based on a chimeric multi-antigen. *Vaccine*, 34(33), 3913–3919. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.053>.

Jaramillo Ortiz, M., Montenegro, V. N., de la Fournière, S.A., Sarmiento, N.F. Farber, M.D. y Wilkowsky, S.E. (2018). Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Veterinary Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010013>.

Jaramillo Ortiz, J. M., Paoletta, M. S., Gravisaco, M. J., López Arias, L. S., Montenegro, V. N., de la Fournière, S. A. M. y Wilkowsky, S. E. (2019). Immunisation of cattle against *Babesia bovis* combining a multi-epitope modified vaccinia Ankara virus and a recombinant protein induce strong Th1 cell

responses but fails to trigger neutralizing antibodies required for protection. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(6), 101270. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101270>

Jongsma MLM, Guarda G, Spaapen RM. (2019). The regulatory network behind MHC class I expression. *Mol Immunol. Sep*; 113:16-21. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.005. PMID: 29224918.

Joyce S, Ternette N. (2021). Know thy immune self and non-self: Proteomics informs on the expanse of self and non-self, and how and where they arise. *Proteomics*. 21(23-24): e2000143. doi: 10.1002/pmic.202000143. PMID: 34310018; PMCID: PMC8865197.

Kappmeyer LS, Perryman LE, Hines SA, Baszler TV, Katz JB, Hennager SG, Knowles DP. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rho-try-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.*;37(7):2285-90. doi: 10.1128/JCM.37.7.2285-2290.1999. PMID: 10364599; PMCID: PMC85139.

Keeley A, Soldati D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.*;14(10):528-32. doi: 10.1016/j.tcb.2004.08.002. PMID: 15450974.

Kelly L, D'Angelo M, Nimo A, Piaggio J, Postiglioni A, Nicolini P. (2003). Polimorfismo del gen *DRB3.2* en bovinos criollos del Uruguay. *Arch Zootec.*;52(197):77–80. ISSN: 0004-0592.

Khodadoust MS, Olsson N, Wagar LE, Haabeth OA, Chen B, Swaminathan K, Rawson K, Liu CL, Steiner D, Lund P, Rao S, Zhang L, Marceau C, Stehr H, Newman AM, Czerwinski DK, Carlton VE, Moorhead M, Faham M, Kohrt HE, Carette J, Green MR, Davis MM, Levy R, Elias JE, Alizadeh AA. (2017). Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. *Nature*; 543(7647):723-727. doi: 10.1038/nature21433. PMID: 28329770; PMCID: PMC5808925.

Kimura (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press.

Klein J, Sato A, Nikolaidis N. (2007). MHC, TSP, and the origin of species: From immunogenetics to evolutionary genetics. *Annu RevGenet.*;41:281–304. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130137. PMID: 18076327.

Koumpoura CL, Robert A, Athanassopoulos CM, Baltas M. (2021). Antimalarial Inhibitors Targeting Epigenetics or Mitochondria in *Plasmodium falciparum*: Recent Survey upon Synthesis and Biological Evaluation of Potential Drugs against Malaria. *Molecules.*;26(18):5711. doi: 10.3390/molecules26185711. PMID: 34577183; PMCID: PMC8467436.

Krause PJ. (2019). Human babesiosis. *Int J Parasitol.*;49(2):165-174. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.11.007. PMID: 30690090.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315. PMID: 11152613.

Kubiniok, P., Marcu, A., Bichmann, L., Kuchenbecker, L., Schuster, H., Hamelin, D., Despault, J., Kovalchik, K., Wessling, L., Kohlbacher, O., Stevanovic, S., Rammensee, H., Neidert, M. C., Sirois, I., & Caron, E. (2020). The global architecture shaping the heterogeneity and tissue-dependency of the MHC class I immunopeptidome is evolutionarily conserved. *bioRxiv*, 10.1101/2020.1109.1128.317750.

Kumar A, O'Bryan J, Krause PJ. (2021). The Global Emergence of Human Babesiosis Pathogens;10(11):1447. doi: 10.3390/pathogens10111447.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.*;35(6):1547–9. doi: 10.1093/molbev/msy096. PMID: 29722887; PMCID: PMC5967553.

Kuttler, K. (1988). World-wide impact of babesiosis. *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press Inc., Boca Ratón Ristic, M. (ed). 1 – 22.

Lakho SA, Haseeb M, Huang J, Yang Z, Hasan MW, Aleem MT, Naqvi MA, Memon MA, Song X, Yan R, Xu L, Li X. (2020). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Eimeria acervulina* modulates the functions of chicken dendritic cells to boost Th1 type immune response and stimulates autologous CD4<sup>+</sup> T cells differentiation in-vitro. *Vet Res.*51(1):138. doi: 10.1186/s13567-020-00864-z. PMID: 33203464; PMCID: PMC7672913.

Lau AO, Kalyanaraman A, Echaide I, Palmer GH, Bock R, Pedroni MJ, Rameshkumar M, Ferreira MB, Fletcher TI, McElwain TF. (2011). Attenuation of virulence in an apicomplexan hemoparasite results in reduced genome diversity at the population level. *BMC Genomics*. doi: 10.1186/1471-2164-12-410. PMID: 21838895; PMCID: PMC3166950.

Lenz TL, Mueller B, Trillmich F, Wolf JB. (2013). Divergent allele advantage at MHC-. through direct and maternal genotypic effects and its consequences for allele pool composition and mating. *Proc Biol Sci.*;280(1762):20130714. doi: 10.1098/rspb.2013.0714. PMID: 23677346; PMCID: PMC3673058.

Levy, M., Ristic, M.G., (1980). *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science* 207, 1218–1220. doi: 10.1126/science.7355284. PMID: 7355284.

Lew AE, Dluzewski AR, Johnson AM, Pinder JC. (2002). Myosins of *Babesia bovis*: molecular characterisation, erythrocyte invasion, and phylogeny. *Cell Motil Cytoskeleton.*;52(4):202-20. doi: 10.1002/cm.10046. PMID: 12112135.

Liao X, Gao X, Zhang X, Wu FX, Wang J. RepAHR: an improved approach for de novo repeat identification by assembly of the high-frequency reads. *BMC Bioinformatics*. 2020 Oct 19;21(1):463. doi: 10.1186/s12859-020-03779-w. PMID: 33076827; PMCID: PMC7574428.

Librado P, Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.*;25(11):1451–2. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187. PMID: 19346325.

Liu, A., Guan, G., Du, P., Gou, H., Liu, Z., Liu, J. y Luo, J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology International*, 61(4), 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.004>.

Liu J, Tuo W, Wu X, Xiong J, Yu E, Yin C, Ma Z, Liu L. (2020). Immunoproteomic and mass spectrometric analysis of *Eimeria acervulina* antigens recognized by antisera from chickens infected with *E. acervulina*, *E. tenella* or *E. necatrix*. *Parasit Vectors.*;13(1):93. doi: 10.1186/s13071-020-3965-y. PMID: 32085718; PMCID: PMC7035704.

Lopez D. (2002) Razas bovinas africanas, nueva herramienta genética para aumentar la producción de carne en el trópico y subtropical. *Sitio Argentino de Producción Animal*.

Lovis, L., Reggi, J., Berggoetz, M., Betschart, B. y Sager, H. (2013). Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; (Acari: Ixodidae). Field Populations of Argentina, South Africa, and Australia with the Larval Tarsal Test. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 326–335. <https://doi.org/10.1603/ME12127>.

- Lozina, L., Balbín, G. y Chamale, G. (2015). Exitoso debut para el programa de prevención de la tristeza bovina. *Motivar*. <http://www.motivar.com.ar/tag/tristeza-bovina/>
- Luciani C. (2003). Babesiosis y anaplasmosis, la “tristeza bovina”. Public. de la Estación Experimental Agropecuaria INTA, Colonia Benítez, Chaco, Argentina, p. 5-8.
- Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. (2008). NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res*;36(Web Server issue): W509-12. doi: 10.1093/nar/gkn202. PMID: 18463140; PMCID: PMC2447772.
- Maccari G, Robinson J, Bontrop RE, Otting N, de Groot NG, Ho CS. (2018). IPD-MHC: nomenclature requirements for the non-human major histocompatibility complex in the next-generation sequencing era. *Immunogenetics*.;70(10):619–23. doi: 10.1007/s00251-018-1072-4. PMID: 30027299; PMCID: PMC6182402.
- Maggioli MF, Palmer MV, Thacker TC, Vordermeier HM, Waters WR. (2015). Characterization of effector and memory T cell subsets in the immune response to bovine tuberculosis in cattle. *PLoS One*.;10(4): e0122571. doi: 10.1371/journal.pone.0122571. PMID: 25879774; PMCID: PMC4400046.
- Mahoney, D. F. y Ross, D. R. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, 48,292–298. Schneider, D. A., Yan, H., Bastos, R. G., Johnson, W. C., Gavin, P. R., Allen, A. J. y Goff, W. L. (2011). Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: An immunohistological study. *Parasite Immunology*, 33(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01249.x>.
- Maillard JC, Renard C, Chardon P, Chantal I, Bensaid A. (1999). Characterization of 18 new BoLA-*DRB3* alleles. *Anim Genet*.;30(3):200-3. doi: 10.1046/j.1365-2052.1999.00446. x. PMID: 10442982.
- Marques, R., Krüger, R.F., Peterson, A.T. (2020). Climate change implications for the distribution of the babesiosis and anaplasmosis tick vector, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Res* 51, 81. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00802-z>.
- Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A., & Wilson, I. A. (1992). Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 257(5072), 927–934. Doi:10.1126/science.1323878.
- McGuire, T.C., Musoke, A.J. and Kurtti, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunology* 38, 249–256. PMID: 511218; PMCID: PMC1457935.
- McMurtrey, C., Trolle, T., Sansom, T., Remesh, S. G., Kaeffer, T., Bardet, W., Jackson, K., McLeod, R., Sette, A., Nielsen, M., Zajonc, D. M., Blader, I. J., Peters, B., & Hildebrand, W. (2016). *Toxoplasma gondii* peptide ligands open the gate of the HLA class I binding groove. doi: 10.7554/eLife.12556. PMID: 26824387; PMCID: PMC4775218.
- Mendes NS, de Souza Ramos IA, Herrera HM, Campos JBV, de Almeida Alves JV, de Macedo GC, Machado RZ, André MR. (2019). Genetic diversity of *Babesia bovis* in beef cattle in a large wetland in Brazil. *Parasitol Res*.;118(7):2027-2040. doi: 10.1007/s00436-019-06337-3. PMID: 31079252.
- Mikko S, Andersson L. (1995). Extensive MHC class II *DRB3* diversity in African and European cattle. *Immunogenetics*.;42(5):408-13. doi: 10.1007/BF00179403. PMID: 7590975.

- Miltiadou D, Law AS, Russell GC. (2003). Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens*. ;62(1):55-65. doi: 10.1034/j.1399-0039.2003.00080. x. PMID: 12859595.
- Montenegro Valeria, tesis doctoral. (2020). Optimización de la respuesta inmune contra parásitos del género *Babesia* utilizando estrategias vacunales “prime-boost” con vectores virales y proteínas recombinantes. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Montenegro VN, Paoletta MS, Jaramillo Ortiz JM, Suarez CE, Wilkowsky SE. (2020). Identification and characterization of a *Babesia bigemina* thrombospondin-related superfamily member, TRAP-1: a novel antigen containing neutralizing epitopes involved in merozoite invasion. *Parasit Vectors*;13(1):602. doi: 10.1186/s13071-020-04469-5. PMID: 33261638; PMCID: PMC7705850.
- Morzaria S, Katende J, Kairo A, Nene V, Musoke A. (1992). New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.;87 Suppl 3:201-5. doi: 10.1590/s0074-02761992000700033. PMID: 1343691.
- 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. doi: 10.1128/IAI.70.3.1599-1603.2002. PMID: 11854249; PMCID: PMC127786.
- Mosqueda, A. Olvera-Ramírez, G. Aguilar-Tipacamú y G. J. Cantó. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>.
- Mossaad, E., Asada, M., Nakatani, D., Inoue, N., Yokoyama, N., Kaneko, O. y Kawazu, S. (2015). Calcium ions are involved in egress of *Babesia bovis* merozoites from bovine erythrocytes. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(1), 53–58. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0391>.
- Murphy E, Robertson GT, Parent M, Hagius SD, Roop RM 2nd, Elzer PH, Baldwin CL. (2002). Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. *FEMS Immunol Med Microbiol*.; 33(3):191-200. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00590. x. PMID: 12110481.
- Musoke, A., Rowlands, J., Nene, V., Nyanjui, J., Katende, J., Spooner, P. y Morzaria, S. (2005). Subunit vaccine based on the p67 major surface protein of *Theileria parva* sporozoites reduces severity of infection derived from field tick challenge. *Vaccine*, 23(23), 3084–3095. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.039> .
- Nathenson, S. G., Uehara, H., Ewenstein, B. M., Kindt, T. J., & Coligan, J. E. (1981). Primary structural: Analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 1025–1052. 10.1146/annurev.bi.50.070181.005113.
- Nava, S., Mastropaolo, M. y Mangold., A. J. (2003). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. Ficha n°5. INTA, EEA Rafaela.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. (2011). Towards a system to understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*.; 11(12):823-36. doi: 10.1038/nri3084. PMID: 22076556.
- Nei M, Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*.;3(5):418–26. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410. PMID: 3444411.

- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*;89(3):583–90. doi: 10.1093/genetics/89.3.583. PMID: 17248844; PMCID: PMC1213855.
- Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Lamberth K, Harndahl M, Justesen S, Røder G, Peters B, Sette A, Lund O, Buus S. (2007). NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS One*;2(8): e796. doi: 10.1371/journal.pone.0000796. PMID: 17726526; PMCID: PMC1949492.
- Niu Q, Bonsergent C, Rogniaux H, Guan G, Malandrin L, Moreau E. (2016a). RAP-1a is the main rhoptry-associated-protein-1 (RAP-1) recognized during infection with *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) (B. motasi-like phylogenetic group), a pathogen of sheep in China. *Vet Parasitol*;232:48-57. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.013. PMID: 27890082.
- Niu Q, Liu Z, Yang J, Yu P, Pan Y, Zhai B, Luo J, Moreau E, Guan G, Yin H. (2016b). Expression analysis and biological characterization of *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) (*Babesia motasi*-like) rhoptry-associated protein 1 and its potential use in serodiagnosis via ELISA. *Parasit Vectors*;9(1):313. doi: 10.1186/s13071-016-1573-7. PMID: 27245213; PMCID: PMC4888343.
- Norimine J, Suarez CE, McElwain TF, Florin-Christensen M, Brown WC. (2002). Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4(+)T-lymphocyte responses in B. bovis-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infect Immun*. Apr;70(4):2039-48. doi: 10.1128/IAI.70.4.2039-2048.2002. PMID: 11895969; PMCID: PMC127881.
- Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G. H., McElwain, T. F., Mbassa, G. y Brown, W. C. (2003). Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity again. *Infection and Immunity*, 71(9), 5021–5032. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5021-5032.2003>.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*;302(1):205–17. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042. PMID: 10964570.
- Núñez, J. L., Muñoz Cobeñas, M. E. y Moltedo, H. L. (1982). *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. (B. A. Editorial Hemisferio Sur, Ed.).
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol*. Apr;28(4):155-63. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00806. x. PMID: 16542317.
- Ou D, Mitchell LA, Décarie D, Tingle AJ, Lacroix M, Zrein M. (1998). Point mutation of a rubella virus E1 protein T-cell epitope by substitution of single amino acid reversed the restrictive HLA-DR polymorphism: a possible mechanism maintaining HLA polymorphism. *Viral Immunol*;11(2):93-102. doi: 10.1089/vim.1998.11.93. PMID: 9765031.
- Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, et al. (2005). Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* 309: 131–133. doi: 10.1126/science.1110418. PMID: 15994557.
- Paoletta MS, Laughery JM, Arias LSL, Ortiz JMJ, Montenegro VN, Petrigh R, Ueti MW, Suarez CE, Farber MD, Wilkowsky SE. (2021). The key to egress? *Babesia bovis* perforin-like protein 1 (PLP1) with hemolytic capacity is required for blood stage replication and is involved in the exit of the parasite from the host cell. *Int J Parasitol*;51(8):643-658. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.12.010.

- Paul D, Achouri S, Yoon YZ, Herre J, Bryant CE, Cicuta P. (2013). Phagocytosis dynamics depends on target shape. *Biophys J.* 105(5):1143-50. doi: 10.1016/j.bpj.2013.07.036. PMID: 24010657; PMCID: PMC3762343.
- Peakall R, Smouse PE. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes.*;6(1):288–95. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460. PMID: 22820204; PMCID: PMC3463245.
- Peters B, Nielsen M, Sette A. (2020). T Cell Epitope Predictions. *Annu Rev Immunol.*; 38:123-145. doi: 10.1146/annurev-immunol-082119-124838. PMID: 32045313.
- Posada D, Crandall KA. (1998). MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.*;14(9):817–8. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817. PMID: 9918953.
- Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. y Jarra, W. (2000). The apical organelles of malaria merozoites: Host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes and Infection*, 2(12), 1461–1477. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01301-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01301-0).
- Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus D., and A. Korobeynikov. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current protocols in Bioinformatics.* 70 (1): e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.
- Purcell AW, Ramarathinam SH, Ternette N. (2019). Mass spectrometry-based identification of MHC-bound peptides for immunopeptidomics. *Nat Protoc.*;14(6):1687-1707. doi: 10.1038/s41596-019-0133-y. PMID: 31092913.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria.
- Rambaut A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rapoport A, Aharonson-Raz K, Berlin D, Tal S, Gottlieb Y, Klement E, Steinman A. (2014). Molecular characterization of the *Babesia caballi* rap-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. *Infect Genet Evol.*:115-20. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.033. PMID: 24524984.
- Rastislav M, Mangesh B. (2012). BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle. *Vet J.* 2012 Jun;192(3):517-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.07.005. PMID: 21930402.
- Riek, R. F. (1963). Piroplasms: Immunity to babesiosis. Blackwell Scientific Publications, 160–179.
- Ristic, M. (1988). Babesiosis of domestic Animal and Man. (CRC Press,). Florida.
- Rodríguez-Mallon A. (2016). Developing Anti-tick Vaccines. *Methods Mol Biol.*; 1404:243-259. doi: 10.1007/978-1-4939-3389-1\_17. PMID: 27076303.
- Ross F, Waller y Fadden, G. I. M. (2005). The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid. *Curr. Issues Mol. Biol.*,7, 57–80. PMID: 15580780.
- Rousset (2008). F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008;8(1):103–62006;58(7):542–58. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x. PMID: 21585727.
- Ruef, B. J., Dowling, S. C., Conley, P. G., Perryman, L. E., Brown, W. C., Jasmer, D. P. y Rice-Ficht, A. C. (2000). A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00167-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00167-X)

- Sachman-Ruiz B, Lozano L, Lira JJ, Martínez G, Rojas C, Álvarez JA, Figueroa JV. (2021). A Comparative Genomic Study of Attenuated and Virulent Strains of *Babesia bigemina*. *Pathogens*;10(3):318. doi: 10.3390/pathogens10030318. PMID: 33800466; PMCID: PMC7999288.
- Sala Livio, tesis doctoral. (2009). Polimorfismo en el gen BoLA-DRB3.2 y su relación con la leucosis en un rodeo de bovinos Criollos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Salama, A. A., Terkawi, M. A., Kawai, S., AbouLaila, M., Nayel, M., Mousa, A. y Igarashi, I. (2013). Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Experimental Parasitology*, 135(3), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.017>.
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*, 12(8), 308–316. [https://doi.org/10.1016/01694758\(96\)10030-2](https://doi.org/10.1016/01694758(96)10030-2).
- Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res.*; 2017:2680160. doi: 10.1155/2017/2680160. PMID: 29445754; PMCID: PMC5763123.
- Sartori R., Bastos M.R., and Wiltbank M.C. (2010). Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.*;22(1):151-8. doi: 10.1071/RD09221. PMID: 20003858.
- Scudiero, L., Mercado-Rojano, W. D. J., Rudolph, A., Wang, J., Laughery, J. M. y Suarez, C. E. (2018). Comparisons of the topographic characteristics and electrical charge distributions among *Babesia*-infected erythrocytes and extraerythrocytic merozoites using AFM. *Journal of Microscopy*, 271(1), 84–97. <https://doi.org/10.1111/jmi.12697>.
- Sette A, Buus S, Appella E, Smith JA, Chesnut R, Miles C, Colon SM, Grey HM (1989). Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. *PNAS* 86(9):3296-300. doi: 10.1073/pnas.86.9.3296.
- Sette, A., Ceman, S., Kubo, R. T., Sakaguchi, K., Appella, E., Hunt, D. F., et al. (1992). Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science*;258(5089):1801-4. doi: 10.1126/science.1465617. PMID: 1465617.
- Sitte K, East IJ, Lavin MF, Jazwinska EC. (1995) Identification and characterization of new BoLA-DRB3 alleles by heteroduplex analysis and direct sequencing. *Anim Genet.*;26(6):413-7. doi: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb02693.x. PMID: 8572364.
- Skuce PJ, Mallon TR, Taylor SM. (1996). Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol Biochem Parasitol.*;77(1):99-102. doi: 10.1016/0166-6851(96)02570-4. PMID: 8784776.
- Smith T., Kilborne F.L. (1983). Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892. Government Printing Office; Washington, DC, USA. Investigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever; pp. 177–304.
- Soldati, D., Dubremetz, J. F. y Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 31(12), 1293–1302. [https://doi.org/10.1016/S00207519\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S00207519(01)00257-0).

- Song H, Yan R, Xu L, Song X, Shah MA, Zhu H, Li X. (2010). Efficacy of DNA vaccines carrying *Eimeria acervulina* lactate dehydrogenase antigen gene against coccidiosis. *Exp Parasitol.*;126(2):224-31. doi: 10.1016/j.exppara.2010.05.015.. PMID: 20566413.
- Späth, E. J. A., Guglielmone, A. A., Signorini, A. R. y Mangold, A. J. (1994). Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Terios*, 23, 116–119.
- Srionrod N, Nooroong P, Poolsawat N, Minsakorn S, Watthanadirek A, Junsiri W, Sangchuai S, Chawengkirttikul R, Anuracpreeda P. (2022). Molecular characterization and genetic diversity of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* of cattle in Thailand. *Front Cell Infect Microbiol.*;12:1065963. doi: 10.3389/fcimb.2022.1065963. PMID: 36523637; PMCID: PMC9744959.
- Steinbiss S, Silva-Franco F, Brunk B, Foth B, Hertz-Fowler C et al. (2016). Companion: a web server for annotation and analysis of parasite genomes. *Nucleic Acids Research*. 44: W29-W34. doi: 10.1093/nar/gkw292.
- Stenger, S., Niazi, K.R. and Modlin, R.L. (1998) Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.*;161(7):3582-8. PMID: 9759880.
- Stonaker HH (1971). Animal breeding in the tropics of Latin America. *J Anim Sci.*;33(1):1-6. doi: 10.2527/jas1971.3311. PMID: 5106270.
- Suarez, CE., McElwain, T. F., Stephens, E. B., Mishra, V. S. y Palmer, G. H. (1991a). Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49(2), 329–332. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90077-J](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90077-J).
- Suarez CE, Palmer GH, Jasmer DP, Hines SA, Perryman LE, McElwain TF. (1991b). 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. doi: 10.1016/0166-6851(91)90197-e. PMID: 1712911.
- Suarez, CE., McElwain, T. F., Echaide, I., Torioni de Echaide, S. y Palmer, G. H. (1994). Interstrain conservation of babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism. *Infect Immun.*;62(8):3576-9. doi: 10.1128/iai.62.8.3576-3579.1994. PMID: 7518810; PMCID: PMC302997.
- Suarez, CE., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C. y McElwain, T. F. (2000). Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive msa-1 epitope. *Infection and Immunity*, 68(12), 6865–6870. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6865-6870.2000>.
- Suárez CF, Patarroyo ME, Trujillo E, Estupiñán M, Baquero JE, Parra C, Rodríguez R. (2006). Owl monkey MHC-*DRB* exon 2 reveals high similarity with several HLA-*DRB* lineages. *Immunogenetics.*; 58(7):542-58. doi: 10.1007/s00251-006-0127-0. Epub 2006 Jun 22. Erratum in: *Immunogenetics*. 2006 Oct;58(10):857. PMID: 16791623.
- Swofford DL. (2003). *Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates Sunderland.
- Tajima. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics.*;585–595.

- Takeshima SN, Giovambattista G, Okimoto N, Matsumoto Y, Rogberg-Muñoz A, Acosta TJ, Onuma M, Aida Y. (2015). Characterization of bovine MHC class II *DRB3* diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*. Dec;86(6):419-30. doi: 10.1111/tan.12692. PMID: 26514650.
- Takeshima SN, Corbi-Botto C, Giovambattista G, Aida Y. (2018). Genetic diversity of BoLA-*DRB3* in South American Zebu cattle populations. *BMC Genet.*;19(1):33. doi: 10.1186/s12863-018-0618-7. PMID: 29788904; PMCID: PMC5964877.
- Thomsen M, Lundegaard C, Buus S, Lund O, Nielsen M. (2013). MHCcluster, a method for functional clustering of MHC molecules. *Immunogenetics*.;65(9):655-65. doi: 10.1007/s00251-013-0714-9. PMID: 23775223; PMCID: PMC3750724.
- Tian L, Li W, Huang X, Tian D, Liu J, Yang X, Liu L, Yan R, Xu L, Li X, Song X. (2017). Protective Efficacy of Coccidial Common Antigen Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) against Challenge with Three *Eimeria* Species. *Front Microbiol.*;8:1245. doi: 10.3389/fmicb.2017.01245. PMID: 28769877; PMCID: PMC5513941.
- Timms P, Stewart NP, De Vos AJ. (1990). Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. *Infect Immun.*;58(7):2171-6. doi: 10.1128/iai.58.7.2171-2176.1990. PMID: 2365457; PMCID: PMC258793.
- Torina, A., Agnone, A., Sireci, G., Mosqueda, J. J., Blanda, V., Albanese, I. y Caracappa, S. (2010). Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(1–2), 52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01118.x>
- Trueman KF, McLennan MW. (1987). Bovine abortion due to prenatal *Babesia bovis* infection. *Aust Vet J.*;64(2):63. doi: 10.1111/j.1751-0813.1987.tb16136.x. PMID: 3606511.
- Ueti MW, Johnson WC, Kappmeyer LS, Herndon DR, Mousel MR, Reif KE, Taus NS, Ifeonu OO, Silva JC, Suarez CE, Brayton KA. (2020). Comparative analysis of gene expression between *Babesia bovis* blood stages and kinetes allowed by improved genome annotation. *Int J Parasitol.* Feb;51(2-3):123-136. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.08.006. PMID: 33069745.
- Uilenberg, G. (1995). Significance of Tick-Borne Hemoparasitic Diseases To World Animal Health. *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), 19–41. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03107-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03107-8).
- Utech, K. B. W., Wharton, R. H., & Kerr, J. D. (1978) Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*;29(4), 885–895.
- van Deutekom HW, Keşmir C. (2015). Zooming into the binding groove of HLA molecules: which positions and which substitutions change peptide binding most? *Immunogenetics*;67(8):425-36. doi: 10.1007/s00251-015-0849-y. PMID: 26040913; PMCID: PMC4498290.
- Wan X, Vomund AN, Peterson OJ, Chervonsky AV, Lichti CF, Unanue ER. (2020). The MHC-II peptidome of pancreatic islets identifies key features of autoimmune peptides. *Nat Immunol.* 21(4):455-463. doi: 10.1038/s41590-020-0623-7.
- Weir y Cockerham (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of PopulationStructure. *Evolution.*;38(6):1358–70.
- 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. doi: 10.1016/s0166-6851(02)00329-8. PMID: 12672522.

Willadsen P, Eisemann CH, Tellam RL. (1993). 'Concealed' antigens: expanding the range of immunological targets. *Parasitol Today*.;9(4):132-5. doi: 10.1016/0169-4758(93)90177-h. PMID: 15463735.

World Organisation of Animal Health, 2021, <https://www.woah.org/en/disease/bovine-babesiosis/>

Wright IG, Goodger BV, Clark IA. (1988). Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitol Today*.;4(8):214-8. doi: 10.1016/0169-4758(88)90161-5. PMID: 15463101.

Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. (1993). Polymorphism in BoLA-*DRB3* exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol*. 15;151(12):6977-85. PMID: 8258704.

Yavuz A, İnci A, Düzlü Ö, Bişkin Z, Yıldırım A. (2011) Molecular characterization of *Babesia bovis* msa-2c gene. *Türkiye Parazitol Derg.*;35(3):140-4. Turkish. doi: 10.5152/tpd.2011.35. PMID: 22203502. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies *Infect. Immun.*, 56 (1988), pp. 2363-2368.

Yeruham, I., Avidar, Y., Aroch, I. y Hadani, A. (2003). Intra-uterine infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old calf. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(2), 60–62. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00597.x>.

Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C. y Igarashi, I. (2002). Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infection and Immunity*, 70(10), 5822–5826. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5822-5826.2002>.

York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell*.; 77(4):525-35. doi: 10.1016/0092-8674(94)90215-1. PMID: 8187174.

Zhang L, Chen Y, Wong HS, Zhou S, Mamitsuka H, Zhu S. (2012). TEPITOPEpan: extending TEPITOPE for peptide binding prediction covering over 700 HLA-DR molecules. *PLoS One*.7(2): e30483. doi: 10.1371/journal.pone.0030483. PMID: 22383964; PMCID: PMC3285624.

Zhou J, Jia H, Nishikawa Y, Fujisaki K, Xuan X. (2007). *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. *Vet Parasitol*. Apr 10;145(1-2):16-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.022. PMID: 17127008.

## ANEXO

Tabla suplementaria A: Lista de los alelos BoLA- *DRB3.2* utilizados en este estudio y su número de acceso a la base de datos IPD-MHC.

<b><i>DRB3.2</i> Allele</b>	<b>IPD accession number</b>
BoLA- <i>DRB3</i> *001:01	BoLA03100
BoLA- <i>DRB3</i> *002:01	BoLA03102
BoLA- <i>DRB3</i> *003:01	BoLA03103
BoLA- <i>DRB3</i> *005:01	BoLA03106
BoLA- <i>DRB3</i> *005:02	BoLA03107
BoLA- <i>DRB3</i> *005:04	BoLA03270
BoLA- <i>DRB3</i> *007:01	BoLA03110
BoLA- <i>DRB3</i> *008:01	BoLA03111
BoLA- <i>DRB3</i> *009:01	BoLA03112
BoLA- <i>DRB3</i> *009:02	BoLA03113
BoLA- <i>DRB3</i> *010:01	BoLA03114
BoLA- <i>DRB3</i> *010:02	BoLA03115
BoLA- <i>DRB3</i> *011:01	BoLA03116
BoLA- <i>DRB3</i> *011:03	BoLA03273
BoLA- <i>DRB3</i> *012:01	BoLA03117
BoLA- <i>DRB3</i> *013:01	BoLA03119
BoLA- <i>DRB3</i> *014:01:01	BoLA03120
BoLA- <i>DRB3</i> *014:02	BoLA03275
BoLA- <i>DRB3</i> *015:01	BoLA03122
BoLA- <i>DRB3</i> *015:02	BoLA03123
BoLA- <i>DRB3</i> *016:01	BoLA03124
BoLA- <i>DRB3</i> *016:02	BoLA03277
BoLA- <i>DRB3</i> *017:01	BoLA03125
BoLA- <i>DRB3</i> *017:03	BoLA03127
BoLA- <i>DRB3</i> *018:01	BoLA03128
BoLA- <i>DRB3</i> *019:01	BoLA03130
BoLA- <i>DRB3</i> *019:02	BoLA03278
BoLA- <i>DRB3</i> *020:01:02	BoLA03132

BoLA-DRB3*020:03	BoLA03134
BoLA-DRB3*021:01	BoLA03135
BoLA-DRB3*022:01	BoLA03136
BoLA-DRB3*023:01	BoLA03138
BoLA-DRB3*024:03	BoLA03284
BoLA-DRB3*026:01	BoLA03142
BoLA-DRB3*027:03	BoLA03145
BoLA-DRB3*027:04	BoLA03146
BoLA-DRB3*027:05	BoLA03147
BoLA-DRB3*027:07	BoLA03286
BoLA-DRB3*027:10	BoLA03289
BoLA-DRB3*028:01	BoLA03149
BoLA-DRB3*028:02	BoLA03150
BoLA-DRB3*029:01	BoLA03151
BoLA-DRB3*030:01	BoLA03152
BoLA-DRB3*030:21	AB610133.1 (Genebank)
BoLA-DRB3*030:22	BoLA03268
BoLA-DRB3*031:01	BoLA03154
BoLA-DRB3*032:01	BoLA03155
BoLA-DRB3*032:02	BoLA03156
BoLA-DRB3*032:03	BoLA03291
BoLA-DRB3*033:01	BoLA03157
BoLA-DRB3*034:01	BoLA03158
BoLA-DRB3*035:01	BoLA03160
BoLA-DRB3*036:01	BoLA03161
BoLA-DRB3*037:01	BoLA03162
BoLA-DRB3*039:01	BoLA03164
BoLA-DRB3*042:01	BoLA03294
BoLA-DRB3*043:01	BoLA03295
BoLA-DRB3*044:01	BoLA03296
BoLA-DRB3*048:01	BoLA03300
BoLA-DRB3*048:02	BoLA03301
BoLA-DRB3*057:02	BoLA03238

Tabla suplementaria B: Predicciones de epitopes T para el alelo 001:01 utilizando el programa NetBoLAllpan. El sombreado violeta indica los péptidos que fueron seleccionados para la posterior validación. El sombreado celeste señala los puntajes de unión menores a 1.

Proteína	Péptidos	Puntaje de unión al alelo *001:01
BBOV_I001020	sin predicciones	
BBOV_I001680	KEMLISYVKNLLKAG	0,39
	MKEMLISYVKNLLKA	0,71
	EMLISYVKNLLKAGL	0,71
	VKNLLKAGLKHALPH	2,51
	YVKNLLKAGLKHALP	3,72
	KNLLKAGLKHALPHI	3,01
BBOV_I002880	VKPIKTPSPRSKRNR	0,38
	YVKPIKTPSPRSKRNR	0,43
	PYVKPIKTPSPRSKR	0,66
	KPIKTPSPRSKRNRK	0,70
	KQPVQYITLSQIKSN	6,45
	MKQPVQYITLSQIKS	8,46
BBOV_I002990	LDILVVLKEEIPFE	17,59
	NDILVVLKEEIPFET	19,69
	KALNDILVVLKEEIP	16,66
	ALNDILVVLKEEIPF	21,18
BBOV_I003000	LKDILVVLKEEIPFE	14,70
	KDILVVLKEEIPFET	16,90
	KALKDILVVLKEEIP	13,30
	ALKDILVVLKEEIPF	19,30
	QDQDQIFKSLLERVP	9,44
	DQDQIFKSLLERVPL	10,14
BBOV_I003010	LRVPLIKTKLSAFNA	4,98
	RLRVPLIKTKLSAFN	6,39
	RVPLIKTKLSAFNAF	6,10
BBOV_I003020	HDALKAVKQLIKTDA	0,26
	THDALKAVKQLIKTD	0,28
	DALKAVKQLIKTDAP	0,49
	KTHDALKAVKQLIKT	0,79
	SGALRIASEELIKFE	13,42
	GMEIIIKTHSFVGE	5,34
BBOV_I003060	YDDFVTAKKLARVNT	0,19
	SYDDFVTAKKLARVN	0,20
	DDFVTAKKLARVNTF	0,33
	ISYDDFVTAKKLARV	0,40

BBOV_I003130	AKWLED SGIVKKEEG	0,56
	IAKWLED SGIVKKEE	0,82
BBOV_II001760	no hay SB	
BBOV_II002570	KKGDV DLSVLKERIS	0,76
	KGDV DLSVLKERISV	0,87
	FDKIRK HISSSLGRK	6,35
	SFDKIRK HISSSLGR	9,50
BBOV_II002580	ASYMRK SLKNKLKFD	4,42
	NLASYMRK SLKNKLK	4,23
	LASYMRK SLKNKLK	5,91
BBOV_II002820	KKGEVD L SMLKKRIS	0,71
	KGEVD L SMLKKRISL	0,99
	YDKVRKHVLSALTRK	3,98
	KKYLFWSKKGEVDLS	2,20
	ALKKYLFWSKKGEVD	2,39
	LKKYLFWSKKGEVDL	2,44
	SYDKVRKHVLSALTR	5,51
BBOV_II004730	VDKRIMNKIKEAYKV	6,90
	MNKIKEAYK VLSNPA	3,15
	IMNKIKEAYK VLSNP	3,65
	SVDKRIMNKIKEAYK	10,44
	RLPRVNSATR GQINQ	1,30
	SGRVYKSTEVEIKIP	1,39
	PAGIKVGSTLKVKGK	2,11
	LPRVNSATR GQINQY	1,33
BBOV_II007340	KRDDILWSEKRQVGG	1,79
	RDDILWSEKRQVGGI	1,97
	AKRDDILWSEKRQVG	2,70
	DDILWSEKRQVGGIF	3,18
	RVPIKLATNMVVNNS	9,20
	ERVPIKLATNMVVNN	10,92
BBOV_II007850	VLGIVVAVIKPTNGG	3,26
	LGIVVAVIKPTNGGE	3,74
	IVLGIVVAVIKPTNG	4,10
BBOV_III001600	sin predicciones	
BBOV_III003290	DTDTANTAIKVSCTK	0,99
	APVIYLT PPVLPDE	7,16
	EAPVIYLT PPVLPD	8,68
	AIKVSCTKIDNLRHK	4,57
	TAIKVSCTKIDNLRH	4,59

	NTAIKVSCTKIDNLR	3,78
BBOV_III003710	VRIIRLAQHYKGQFR	1,71
BBOV_III006480	DDQPIKSKISAKKTR	0,37
	DQPIKSKISAKKTRR	0,47
	EDDQPIKSKISAKKT	0,58
	HDPAAVAIVNSRGKS	0,85
	QPIKSKISAKKTRRS	0,98
	QDKIREAEMKKMVAK	3,95
BBOV_III006500	DDQPIKSKISAKKTR	0,37
	DQPIKSKISAKKTRR	0,47
	EDDQPIKSKISAKKT	0,58
	HDPAAVAIVNSRGKS	0,85
BBOV_IV000670	sin predicciones	
BBOV_IV000770	RNKQLEKTRNNVKEY	0,43
	WRNKQLEKTRNNVKE	0,58
	NKQLEKTRNNVKEYL	0,61
BBOV_IV000780	TRYITEAILS LKNFP	0,56
	MLTRYITEAILS LKN	0,88
	LTRYITEAILS LKNF	0,99
BBOV_IV001030	VERIVNHEPKKKWQD	0,46
	IVERIVNHEPKKKWQ	0,68
	ERIVNHEPKKKWQDY	0,87
BBOV_IV001040	SIDILWLSLNKIAKQ	1,48
	LSIDILWLSLNKIAK	6,67
BBOV_IV001070	KSTISSHAIKRREVD	0,02
	KKSTISSHAIKRREV	0,04
	CKKSTISSHAIKRRE	0,07
	STISSHAIKRREVDQ	0,09
	NDLVHYAYKMHLSE	0,26
	KNDLVHYAYKMHLRS	0,30
	NKNDLVHYAYKMHLR	0,40
	DLVHYAYKMHLSEE	0,46
	ECKKSTISSHAIKRR	0,48
	TISSHAIKRREVDQE	0,54
	ANKNDLVHYAYKMHR	0,73
	KHQPIQYTGKIVMED	1,18
	HQPIQYTGKIVMEDL	1,49
	DGKIRHFVKSEMPIP	4,64
	RDGKIRHFVKSEMPI	6,25
	AKHQPIQYTGKIVME	2,05

	MRDGKIRHFVKSEMP	6,36
	QPIQYTGKIVMEDLA	2,36
	GKIRHFVKSEMPIPE	9,19
	YNMGFMIANKNDLVH	14,50
	NMGFMIANKNDLVHY	14,55
	GYNMGFMIANKNDLV	17,96
	RVKGMESVVVAKFDA	5,94
	ALIMAWITKERICDP	18,04
	VKGMESVVVAKFDAY	8,21
	RRVKGMESVVVAKFD	7,40
	GAKHQPIQYTGKIVM	7,93
BBOV_IV001370	MDNVFKSLLGRKSKK	0,09
	DMDNVFKSLLGRKSK	0,16
	DNVFKSLLGRKSKKS	0,23
	NPPVTIASMQSKTGP	0,29
	HDMDNVFKSLLGRKS	0,44
	ANPPVTIASMQSKTG	0,45
	PPVTIASMQSKTGPP	0,65
	EKPVNPGARKNKPDD	0,79
	KSKLKKAASKLKKG	0,87
	DANPPVTIASMQSKT	0,89
	KEKPVNPGARKNKPD	0,98
	FKSKLKKAASKLKK	1,12
	GFKSKLKKAASKLK	1,57
	SKLKKAASKLKKGA	1,34
	DGFKSKLKKAASKL	6,07
	KLKKAASKLKKGAK	2,87
BBOV_IV004810	SVSDINIGEVVNKDS	0,29
	VSDINIGEVVNKDSL	0,46
	PSVSDINIGEVVNKD	0,55
	SDINIGEVVNKDSL	0,78
	GKLFVTEIGALLDK	3,35
	NGKLFVTEIGALLD	5,31
BBOV_IV005120	FRELKADMAQKVDD	0,39
	RELKADMAQKVDDL	0,58
	KFRELKADMAQKVD	0,68
	HSVNVTTAQVEKFRE	3,75
	ENWIADAVKPPVTP	3,54
	SVNVTTAQVEKFREL	4,65
	NIKKIVKTAVMAMLK	6,23
	NENIKKIVKTAVMAM	6,72

	IKKIVKTAVMAMMLKH	4,85
	GHSVNVTTAQVEKFR	5,65
	VNENIKKIVKTAVMA	5,78
	FENWIADAVKPPVTT	4,57
	ENIKKIVKTAVMAML	8,99
	IFENWIADAVKPPVT	0,144
	GVNENIKKIVKTAVM	0,50
	KKIVKTAVMAMMLKHL	0,75
	VNVTTAQVEKFRELI	7,77
	YGMLVRPIGKSIFDN	7,73
	NWIADAVKPPVTTPT	5,99
BBOV_IV005390	APAILHADLQNKFID	0,56
BBOV_IV005950	RSAVKIHVGDRRKRA	0,55
	SAVKIHVGDRRKRAI	0,57
	AVKIHVGDRRKRAIE	0,58
	TVTVTISKKEIPPT	1,48
	KKTVTIVTISKKEIPP	1,63
	FYSIVIAAASAYEED	9,97
	KTVTIVTISKKEIPT	1,86
BBOV_IV008150	DSVMKYSPTGAKEHP	0,14
	IDSVMKYSPTGAKEH	0,20
	SVMKYSPTGAKEHPS	0,33
	KIDSVMKYSPTGAKE	0,34
	ANDIIAFTTTEANPS	7,93
	KANDIIAFTTTEANP	11,99
BBOV_IV008970	DKIAVLSVAPKKGHK	0,34
	FDKIAVLSVAPKKGH	0,40
	SFDKIAVLSVAPKKG	0,54
	KDKIDEVLIRLKSDS	0,66
	EKDKIDEVLIRLKSD	0,77
	FSVDVVSFDKIAVLS	8,60
BBOV_IV009170	no hay SB	
BBOV_IV009240	RERNLNKSRIQVKRT	0,07
	ERNLNKSRIQVKRTV	0,09
	PRERNLNKSRIQVKR	0,11
	RNLNKSRIQVKRTVV	0,27
	YRPMIYARIGRIRND	0,91
	TPRERNLNKSRIQVK	0,94
	TPGINSASTTLIKGD	3,36
	RYPMIYARIGRIRN	1,47

	RPMIYARIGRIRNDP	1,15
	QRRLVHMVERIRLPH	2,96
	KRYRPMIYARIGRIR	2,48
	LTPGINSASTTLIKG	4,99
	RRLVHMVERIRLPHL	4,09
	PQRRLVHMVERIRLP	4,31
	PGINSASTTLIKGDR	4,39
	TLTPGINSASTTLIK	8,88
	QKRYRPMIYARIGRI	8,53
BBOV_IV009860 y BBOV_IV009870	AKNFISAAHEGTKQF	0,57
	GAKNFISAAHEGTKQ	0,80
	PYQLDAAFRLFKESA	0,85
	NPYQLDAAFRLFKES	0,93
BBOV_IV010360	WQVELKEYVVGKRRKV	0,86
	LPTIKYTFNGVEAK	10,35
BBOV_IV012010	sin predicciones	
BBOV_IV011430	AMPVRKNVVVKKGKK	0,04
	IAMPVRKNVVVKKGK	0,07
	MPVRKNVVVKKGKKA	0,10
	VAQINKAMLQTKDMN	0,16
	SKQMKVADVVGKNVR	0,20
	CIAMPVRKNVVVKKG	0,23
	LVAQINKAMLQTKDM	0,24
	PVRKNVVVKKGKKAK	0,26
	TLVAQINKAMLQTKD	0,31
	AQINKAMLQTKDMNA	0,33
	YDSAIMFSELAHRYH	0,35
	LSKQMKVADVVGKNV	0,37
	KPDLYAHKVKKPKKM	0,40
	KQMKVADVVGKNVRI	0,48
	ILSKQMKVADVVGKN	0,50
	GKPDLYAHKVKKPKK	0,51
	PDLYAHKVKKPKKMT	0,58
	SYDSAIMFSELAHRY	0,67
	RKNVVVKKGKKAKAD	0,70
	VRKNVVVKKGKKAKA	0,74
	DSAIMFSELAHRYHC	0,77
	DLYAHKVKKPKKMTP	0,84
	KNVVVKKGKKAKADS	0,85
	ESPIVSNTTEEKPT	0,87

	LTGSILPAAKKVADS	2,29
	TGSILPAAKKVADSV	2,32
	GDGRVVYHNKEFIAE	4,17
	NRKVNIHLKSEYVDP	1,53
	DGRVVYHNKEFIAEV	4,47
	PLTGSILPAAKKVAD	3,17
	TKRIYYMDKDKKLDE	1,11
	VTKRIYYMDKDKKLD	1,38
	SNRKVNIHLKSEYVD	1,97
	PGDGRVVYHNKEFIA	6,25
	ATLVAQINKAMLQTK	2,21

Tabla suplementaria C: Asociación de proteínas a términos GO.

Gen	Ontología	Identificador	Nombre del término GO
BBOV_I003020	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_I003090	Función molecular	GO:0003924	actividad GTPasa
	Función molecular	GO:0005525	unión a GTP
BBOV_I003490	Función molecular	GO:0003774	actividad motora del citoesqueleto
	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
	Componente celular	GO:0016459	complejo de miosina
BBOV_I004940	Función molecular	GO:0003676	unión a ácidos nucleicos
	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
BBOV_IV000220	Función molecular	GO:0005509	unión de iones de calcio
BBOV_IV000270	Función molecular	GO:0003676	unión a ácidos nucleicos
BBOV_IV002420	Función molecular	GO:0003756	actividad proteína disulfuroisomerasa
	Componente celular	GO:0005783	Retículo endoplasmático
	Función molecular	GO:0016671	Actividad oxidoreductasa
	Proceso biológico	GO:0055114	proceso de oxidación- reducción obsoleto
BBOV_IV003210	Función molecular	GO:0004672	actividad proteína quinasa
	Función molecular	GO:0005509	unión de iones de calcio
	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
	Proceso biológico	GO:0006468	fosforilación de proteínas
BBOV_IV003220	Función molecular	GO:0016791	actividad fosfatasa
BBOV_IV005830	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
	Proceso biológico	GO:0015986	síntesis de ATP acoplada al transporte de protones
	Componente celular	GO:0045261	complejo de transporte de protones ATP sintetasa
	Proceso biológico	GO:0046034	proceso metabólico del ATP

	Función molecular	GO:0046933	actividad de transporte de protones del sistema ATP sintetasa
	Proceso biológico	GO:1902600	transporte transmembrana de protones
BBOV_IV006260	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_IV006410	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_IV008510	Función molecular	GO:0003779	unión a actina
	Componente celular	GO:0015629	actina de citoesqueleto
	Proceso biológico	GO:0030042	depolimerización de filamentos de actina
BBOV_IV010020	Función molecular	GO:0000166	unión a nucleótidos
	Componente celular	GO:0016021	componente integral de membrana
BBOV_III004850	Función molecular	GO:0003924	actividad GTPasa
	Función molecular	GO:0005200	componente estructural del citoesqueleto
	Función molecular	GO:0005525	unión a GTP
	Componente celular	GO:0005874	microtubulo
	Proceso biológico	GO:0007017	proceso basado en microtúbulos
BBOV_III005760	Función molecular	GO:0003743	factor de iniciación de la traducción
	Función molecular	GO:0004525	actividad ribonucleasa III
	Componente celular	GO:0005737	citoplasma
	Componente celular	GO:0005852	complejo factor iniciador de la traducción eucariota 3
	Proceso biológico	GO:0006396	procesamiento del ARN
BBOV_III008300	Componente celular	GO:0000220	transporte de protones vacuolar tipo V ATPasa
	Función molecular	GO:0015078	transporte de protones transmembrana
	Componente celular	GO:0033179	transporte de protones tipo V ATPasa
	Proceso biológico	GO:1902600	transporte de protones transmembrana
BBOV_III009510	Componente celular	GO:0005854	nascent polypeptide-associated complex
BBOV_III011560	Componente celular	GO:0000502	complejo proteasoma
BBOV_I000480	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
	Componente celular	GO:0005737	citoplasma
	Función molecular	GO:0016787	actividad hidrolasa
	Proceso biológico	GO:0030163	proceso catabólico de proteínas
BBOV_I001470	Función molecular	GO:0019239	actividad deaminasa
BBOV_I001740	Función molecular	GO:0004013	actividad adenosilhomocisteinasa
BBOV_I002070	Función molecular	GO:0004591	oxalglutarato deshidrogenasa
	Proceso biológico	GO:0006099	ciclo de los ácidos tricarbónicos
	Función molecular	GO:0016624	actividad oxidoreductasa

	Función molecular	GO:0030976	unión a pirofosfato de tiamina
	Proceso biológico	GO:0055114	proceso de oxidación- reducción obsoleto
BBOV_I004210	Componente celular	GO:0005737	citoplasma
BBOV_IV002330	Proceso biológico	GO:0045454	homeostasis redox
	Función molecular	GO:0003756	actividad proteína disulfuroisomerasa
BBOV_IV002700	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_IV003540	Función molecular	GO:0003723	unión al ARN
	Función molecular	GO:0003735	componente estructural del ribosoma
	Componente celular	GO:0005840	ribosoma
	Proceso biológico	GO:0006412	traducción
	Componente celular	GO:0015935	subunidad menor del ribosoma
BBOV_I001460	Función molecular	GO:0003743	factor de iniciación de la traducción
	Función molecular	GO:0005515	unión a proteínas
	Componente celular	GO:0005852	complejo factor iniciador de la traducción eucariota 3
	Proceso biológico	GO:0006413	iniciación de la traducción
	Función molecular	GO:0031369	factor de iniciación de la traducción
BBOV_I002540	Proceso biológico	GO:0006006	proceso metabólico de la glucosa
	Función molecular	GO:0016620	actividad oxidoreductasa
	Función molecular	GO:0050661	unión al NADP
	Función molecular	GO:0051287	unión al NAD
	Proceso biológico	GO:0055114	proceso de oxidación- reducción obsoleto
BBOV_I004450	Función molecular	GO:0004177	actividad aminopeptidasa
	Componente celular	GO:0005737	citoplasma
	Proceso biológico	GO:0006508	proteolisis
	Función molecular	GO:0008235	actividad metaloexopeptidasa
	Proceso biológico	GO:0019538	proceso metabólico de proteínas
	Función molecular	GO:0030145	unión de iones de manganeso
BBOV_I007430	Función molecular	GO:0009055	actividad de transferencia de electrones
	Función molecular	GO:0015035	actividad proteindisulfuroreductasa
	Proceso biológico	GO:0045454	homeostasis redox
BBOV_IV006950	Proceso biológico	GO:0000245	ensamblado del complejo del spliceosoma
	Función molecular	GO:0003729	unión al ARN
BBOV_IV009860 y BBOV_IV009870	Función molecular	GO:0005524	unión al ATP
	Componente celular	GO:0005737	citoplasma
	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_IV010300	Componente celular	GO:0016020	membrana
BBOV_IV011270	Función molecular	GO:0003824	actividad catalítica
	Proceso biológico	GO:0005975	proceso metabólico de carbohidratos

	Función molecular	GO:0016491	actividad oxidoreductasa
	Función molecular	GO:0016616	actividad oxidoreductasa
	Proceso biológico	GO:0019752	proceso metabólico de ácidos carboxílicos
	Proceso biológico	GO:0055114	proceso de oxidación- reducción obsoleto
BBOV_III001980	Componente celular	GO:0005741	membrana externa de la mitocondria
BBOV_III010060	Función molecular	GO:0005347	actividad ATP de transporte transmembrana
	Componente celular	GO:0005743	membrana interna de la mitocondria
	Función molecular	GO:0022857	actividad de transporte transmembrana
	Proceso biológico	GO:0055085	transporte transmembrana
BBOV_III011790	Función molecular	GO:0003994	actividad aconitatohidratasa
BBOV_III004640	Función molecular	GO:0003735	componente estructural del ribosoma
	Componente celular	GO:0005840	ribosoma
	Proceso biológico	GO:0006412	traducción