



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

“Identificación de epítomos conservados en aislados de
***Babesia bigemina*”**

TESIS

Que para optar el grado de Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Uriel Mauricio Valdez Espinoza

TUTOR PRINCIPAL:

Juan Joel Mosqueda Gualito

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Rogelio Alonso Morales

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F.

Diciembre, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme cursar mis estudios de maestría en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cumplí el sueño de formar parte de la comunidad UNAM.

Al mi tutor de Tesis, **Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito**. Conocerlo y formar parte de su grupo de trabajo es algo que siempre le tendré muy agradecido, impacto mi vida y para bien. Gracias también por el valioso tiempo dedicado a mi formación, por los sabios consejos, por sus enseñanzas, por su amistad, y por todo el apoyo brindado.

A los miembros de mi comité tutorial, **Dr. Rogelio Alonso Morales y Dr. Carlos Vega y Murguía** por el tiempo dedicado a la revisión y evaluación semestral de mi tesis de Maestría. Gracias por sus aportaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme la beca para poder cursar mis estudios de Maestría.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro**, ya que gracias a sus instalaciones pude llevar a cabo los experimentos necesarios para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los amigos y compañeros del laboratorio de Inmunología y Vacunas, **MVZ. Ma. Elena Paredes, MC. Mario Hidalgo, MVZ. Adolfo Cruz y MVZ. Dante Barreda** por su amistad y apoyo técnico brindado en el entrenamiento de trabajo de laboratorio, en verdad lo valoro.

RESUMEN

Babesia bigemina es un agente causal de la babesiosis bovina. Se han identificado proteínas involucradas en el proceso de invasión a los eritrocitos y son consideradas candidatas vacunales. Sin embargo su uso en una vacuna es limitado debido a la variación de los epítomos inmunodominantes de los antígenos en diferentes cepas del protozoario. Por tal motivo es necesario identificar epítomos B en las proteínas involucradas en los mecanismos de invasión que sean conservados en distintos aislados. El objetivo de este trabajo fue identificar epítomos B conservados y expuestos en las proteínas AMA-1, SBP-4, GP45, RAP-1 α 1 y MIC1 de *B. bigemina*. Se obtuvo la secuencia predicha de las proteínas mediante aplicación por PCR, clonación y secuenciación utilizando DNA de *B. bigemina* de aislados de diferentes zonas geográficas del mundo. También se obtuvieron secuencias de la base de datos Protein. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple para cada proteína con las secuencias de los diferentes aislados para identificar los péptidos conservados. Adicionalmente se realizó un análisis bioinformático para predecir: la estructura secundaria de las proteínas, la presencia de péptido señal y las regiones transmembranales con los programas Protscale, TMPred, TMHMM 2.0 y SignalIP 4.1, respectivamente. Finalmente se realizó un análisis bioinformático de antigenicidad y predicción de epítomos B en la región extracelular de las proteínas utilizando los programas ABCpred, BCpred, Antigenic e IEDB. Se seleccionaron de 3 a 6 péptidos conteniendo epítomos B conservados por cada proteína y se sintetizaron químicamente en forma de MAP's 8 (Multiple Antigen Peptide 8). Posteriormente, cada péptido se inmunizó en dos conejos utilizando dosis de 100 μ g de péptido más adyuvante. El suero de cada conejo fue obtenido y utilizado para evaluar la especificidad de los anticuerpos mediante dos técnicas de inmunodetección. Los anticuerpos contra cada péptido reconocieron los merozoitos intraeritrocíticos mediante Inmunofluorescencia así como a la proteína específica obtenida de merozoitos mediante Inmunoelectrotransferencia. Se generaron anticuerpos contra péptidos conservados y expuestos que identificaron las proteínas AMA-1, SBP-4, GP45, RAP-1 α 1 y MIC1. Se concluye que las proteínas utilizadas en este trabajo tienen epítomos B conservados y expuestos, capaces de inducir una respuesta inmune humoral específica.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, vacuna, bioinformática, epítomos, inmunofluorescencia, inmunoelectrotransferencia

ABSTRACT

Babesia bigemina is an etiological agent of bovine babesiosis. Several proteins involved in the invasion process to erythrocytes have been identified and they are considered vaccine candidates. However, their inclusion in a vaccine is limited due to the variation of the immunodominant epitopes of those antigens in different isolates of the protozoa. Therefore, it is necessary to identify B-cell epitopes in those proteins involved in the invasion mechanism, which must be conserved in different isolates. The aim of this study was to identify conserved and exposed B-cell epitopes in the proteins AMA-1, SBP-4, GP45, RAP-1 α 1 y MIC1 of *B. bigemina*. The predicted sequence of the proteins was obtained through PCR amplification, cloning and sequencing using DNA of *B. bigemina* from different world regions. Some sequences were also obtained from the Protein database. Subsequently a multiple alignment for each protein was performed with the sequences of the different isolates to identify conserved peptides. Additionally, a bioinformatics analysis was performed to predict: the secondary structure for each protein, the presence of signal peptide and the presence of transmembrane regions by using the programs ProtScale, TMpred, TMHMM 2.0 and SignalIP 4.1, respectively. Finally a bioinformatics analysis of antigenicity and B-cell epitope prediction in the extracellular region of each protein was carried out by using ABCpred, BCpred, Antigenic and IEDB. 3 to 6 peptides per protein containing conserved B-cell epitopes were selected and they were chemically synthesized as MAP's 8 (Multiple Antigen Peptide 8). Each peptide was immunized in two rabbits using a dose of 100 μ g of peptide in addition of adjuvant. The serum of each rabbit was obtained and used to evaluate the specificity of the antibodies by two immunodetection techniques. The antibodies against each peptide recognized intraerythrocytic merozoites by Indirect immunofluorescence, and the specific protein from merozoites was detected by western blotting. Antibodies against conserved and exposed peptides were generated and they identified the AMA-1, SBP-4, GP45, RAP-1 α 1 and MIC1 proteins. We conclude that the proteins used in this work have conserved and exposed B-cell epitopes, which are able to induce a specific humoral immune response.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, vaccine, bioinformatics, epitopes, indirect immunofluorescence, western blot.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	
I. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Babesiosis bovina	1
1.2 Morfología de <i>Babesia bigemina</i>	3
1.3 Clasificación taxonómica	4
1.4 Ciclo biológico de <i>Babesia bigemina</i>	4
1.5 Epidemiología	5
1.6 Impacto económico de la Babesiosis bovina	6
1.7 Diagnóstico	7
1.8 Control de la babesiosis	8
1.9 Genoma de <i>Babesia bigemina</i>	10
1.10 Variación antigénica	10
1.11 Uso de vacunas recombinantes contra la Babesiosis	11
1.12 Proteínas candidatas vacunales de <i>B. bigemina</i>	13
1.12.1 GP45	13
1.12.2 RAP-1	14
1.12.3 AMA-1	16
1.12.4 SBP's	17
1.12.5 MIC-1	18
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
V. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	22
5.1 Objetivo 1	22
5.2 Objetivo 2	23

5.3	Objetivo 3	24
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1	Material biológico utilizado	25
6.2	Obtención de las secuencias de las bases de datos.....	25
6.3	Extracción de DNA	25
6.4	Diseño de iniciadores	27
6.5	Amplificación de los genes	27
6.6	Clonación y transformación de células competentes	31
6.7	Secuenciación.....	33
6.8	Obtención de la secuencia predicha de aminoácidos	34
6.9	Análisis de la conservación de las proteínas.....	34
6.10	Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria de las proteínas.....	34
6.11	Predicción y selección de epítomos B conservados	35
6.12	Generación de anticuerpos contra los péptidos	39
6.13	Evaluación de la especificidad de los anticuerpos	42
6.13.1	Obtención y procesamiento de eritrocitos infectados	42
6.13.2	Inmunofluorescencia indirecta.....	43
6.13.3	Western Blot.....	45
6.14	Identificación de una proteína homóloga a MIC-1 de <i>B. bovis</i> en el genoma de <i>B. bigemina</i>	50
VII.	RESULTADOS	51
7.1	Obtención de las secuencias predichas de las proteínas.....	51
7.1.1	Obtención de las secuencias de las bases de datos	51
7.1.2	Amplificación de los genes en el DNA de los distintos aislados ..	52
7.1.3	Clonación, transformación y escrutinio de las colonias	54
7.1.4	Secuencias nucleotídicas obtenidas	56
7.2	Análisis de la conservación de las proteínas.....	63
7.3	Análisis de la estructura secundaria de las proteínas	63
7.3.1	Proteína AMA-1	63
7.3.2	Proteína SBP-4	65
7.3.3	Proteína GP45.....	67

7.3.4	Proteína RAP-1 α 1	69
7.3.5	Proteína MIC-1	71
7.4	Selección de péptidos predichos.....	73
7.5	Evaluación de los anticuerpos generados contra cada péptido en tejido nativo mediante Inmunofluorescencia indirecta.	75
7.5.1	Péptidos de la proteína AMA-1	75
7.5.2	Péptidos de la proteína SBP-4	78
7.5.3	Péptidos de la proteína GP45	81
7.5.4	Péptidos de la proteína RAP-1 α 1	84
7.5.5	Péptidos de la proteína MIC-1	87
7.6	Evaluación de los anticuerpos generados contra cada péptido en merozoitos intraeritrocíticos mediante Western Blot.	89
7.6.1	Anticuerpos contra la proteína AMA-1	90
7.6.2	Anticuerpos contra la proteína SBP-4	92
7.6.3	Anticuerpos contra la proteína GP45-	93
7.6.4	Anticuerpos contra la proteína RAP-1 α 1	95
7.6.5	Anticuerpos contra la proteína MIC-1	98
VIII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	100
IX.	BIBLIOGRAFÍA	107
X.	ANEXOS	119

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Lista de iniciadores utilizados para cada gen.	29
2.	Componentes de la reacción de PCR.	31
3.	Número de péptidos que contienen epítomos B conservados.	39
4.	Calendario de inoculación de los péptidos de las proteínas AMA1 y SBP-4.	41
5.	Calendario de inmunización de los péptidos de las proteínas GP45, SBP4 y MIC-1.	42
6.	Reactivos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida.	48
7.	Números de acceso de las secuencias obtenidas de la base de datos Protein.	53
8.	Nombre de las secuencias de los aislados obtenidas mediante PCR y secuenciación.	60
9.	Número de aminoácidos predicho para cada proteína.	61
10.	Porcentaje general de conservación de las secuencias de aminoácidos.	62
11.	Lista de péptidos seleccionados	73

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Programa de PCR para amplificar el gen <i>ama-1</i> .	30
2.	Programa de PCR para amplificar el gen <i>gp45</i> .	30
3.	Programa de PCR para amplificar el gen <i>mic-1</i> .	31
4.	Programa de PCR para amplificar el gen <i>rap1α1</i> .	31
5.	Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen <i>rap1-α1</i> .	37
6.	Electroforesis de gel de agarosa al 2% para el gen <i>mic-1</i> .	37
7.	Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen <i>gp45</i> .	38
8.	Electroforesis de gel de agarosa al 1% de las colonias transformadas con el plásmido conteniendo el gen <i>rap1-α1</i> .	59
9.	Electroforesis de gel de agarosa al 1% para plásmidos que contienen el gen <i>gp45</i> .	59
10.	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína AMA-1 con el programa Protscale.	63
11.	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína AMA-1 con el programa TMHMM 2.0.	63
12.	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína AMA-1 con el programa SignalP 4.1.	64
13.	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína SBP-4 con el programa Protscale.	65

14.	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína SBP4 con el programa TMHMM 2.0.	65
15.	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína SBP4 con el programa SignalP 4.1.	66
16.	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína GP45 con el programa Protscale.	67
17.	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína GP45 con el programa TMHMM 2.0.	67
18.	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína GP45 con el programa SignalP 4.1.	68
19.	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de proteína RAP-1 α 1 con el programa Protscale.	69
20.	Análisis bioinformático de predicción de presencia de dominios transmembranales en la proteína RAP-1 α 1 con el programa TMHMM 2.0.	69
21.	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína RAP-1 α 1 con el programa SignalP 4.1.	70
22.	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína MIC-1 con el programa Protscale.	71
23.	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína MIC1 con el programa TMHMM 2.0.	71
24.	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína MIC1 con el programa SignalP 4.1.	72

25. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 75
26. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 75
27. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1C reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 76
28. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1D reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 76
29. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1E reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 77
30. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 78
31. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 78
32. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-C reconocen los eritrocitos abandonados por los merozoitos de *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta. 79
33. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-D reconocen los eritrocitos abandonados por los merozoitos de *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta. 79

34. Los anticuerpos contra el péptido GP45-1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 80
35. Los anticuerpos contra el péptido GP45-CH reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 81
36. Los anticuerpos contra el péptido GP45-CS reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 81
37. Los anticuerpos contra el péptido GP45-3 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 82
38. Los anticuerpos contra el péptido GP45-4 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 82
39. Los anticuerpos contra el péptido RAP-T1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 83
40. Los anticuerpos contra el péptido RAP-T2 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 84
41. Los anticuerpos contra péptido RAP-B1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 84
42. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B2 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 85

43. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B3 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 85
44. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B4 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 86
45. Los anticuerpos contra el péptido MIC-A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 87
46. Los anticuerpos contra el péptido MIC-B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 87
47. Los anticuerpos contra el péptido MIC-C reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. 88
48. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-A identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. 89
49. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-B identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. 89
50. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-C identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. 90
51. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-D identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. 90
52. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-E identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. 91

53.	Los anticuerpos contra el péptido SBP4-A identifican la proteína SBP4 mediante Inmunoelctrotransferencia.	91
54.	Los anticuerpos contra el péptido SBP4-B identifican la proteína SBP4 mediante Inmunoelctrotransferencia.	92
55.	Los anticuerpos contra el péptido SBP4-D identifican la proteína SBP4 mediante Inmunoelctrotransferencia.	92
56.	Los anticuerpos contra el péptido GP45-1 identifican la proteína GP45 mediante Inmunoelctrotransferencia.	93
57.	Los anticuerpos contra el péptido GP45-CH identifican la proteína GP45 mediante Inmunoelctrotransferencia.	93
58.	Los anticuerpos contra el péptido GP45-3 identifican la proteína GP45 mediante Inmunoelctrotransferencia.	94
59.	Los anticuerpos contra el péptido GP45-4 identifican la proteína GP45 mediante Inmunoelctrotransferencia.	94
60.	Los anticuerpos contra el péptido RAP-T1 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia.	95
61.	Los anticuerpos contra el péptido RAP-T2 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia.	95
62.	Los anticuerpos contra el péptido RAP-B1 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia.	96
63.	Los anticuerpos contra el péptido RAP-B2 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia.	96
64.	Los anticuerpos contra el péptido RAP-T3 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia.	97

65. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B4 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelectrotransferencia. 97
66. Los anticuerpos contra el péptido MIC-A identifican la proteína MIC-1 mediante Inmunoelectrotransferencia. 98
67. Los anticuerpos contra el péptido MIC-C identifican la proteína MIC-1 mediante Inmunoelectrotransferencia. 98

INTRODUCCIÓN

I. Marco teórico

1.1 Babesiosis bovina

La babesiosis se define como una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia* y que es transmitida por garrapatas (Schnittger *et al.*, 2012).

La enfermedad se caracteriza por infectar eritrocitos, afectando a animales domésticos, así como también a humanos, aves y algunas especies no convencionales. *Babesia* es considerado el segundo patógeno más común que se encuentra en la sangre de los mamíferos después de los Tripanosomas. (United States Animal Health Association, 2008; Pérez de León *et al.*, 2010; Schnittger *et al.*, 2012; Gohil *et al.*, 2012).

Victor Babes en 1888 en Rumania fue el primero en descubrir en eritrocitos de bovinos enfermos que presentaban hemoglobinuria a microorganismos a los que llamó *Haematococcus bovis*, observando después organismos similares en sangre de ovinos en 1892. Posteriormente en 1893 Smith y Kilborne describen que la presencia de un parásito dentro de los eritrocitos era el causante de la “Fiebre de Texas” en el ganado. A este parásito lo nombraron como *Pyrosoma bigeminum*, esta fue la primera descripción de un patógeno transmitido por artrópodos en vertebrados. Ellos también identificaron a la garrapata *Boophilus annulatus* como el vector. Estos protozoarios fueron renombrados posteriormente como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Starcovici, 1893; Mihalca *et al.*, 2010). La garrapata *Boophilus microplus* y *annulatus* fueron reclasificadas al género *Rhipicephalus* (Barker y Murrell, 2003). Posteriormente en 1906 se implementó un programa para la erradicación del vector de la babesiosis en el sur de EUA, el cual duró cuatro décadas y dejó un costo de varios millones de dólares (Ristic y Kreier, 1981). Después de estas primeras descripciones, la babesiosis bovina fue descrita en varias partes del mundo. En Australia se identificó a *Babesia bigemina* como agente

etiológico de la enfermedad y en Argentina se describieron dos formas de babesiosis bovina, siendo *Babesia bigemina* y *Babesia argentina* (ahora llamado *B. bovis*) los agentes causales de la diferente semiología de la enfermedad. En Europa, África y Asia los agentes etiológicos identificados fueron *Babesia divergens* y *Babesia major* (Ristic y Kreier, 1981; Bock *et al.*, 2004).

En el año de 1971 se tenían reportadas 71 especies de *Babesia*, de las cuales 18 infectan a mamíferos domésticos (Ristic y Kreier, 1981). En la actualidad se han descubierto más de 100 diferentes especies de *Babesia* en el mundo, afectando a diferentes especies animales y a humanos (Uilenberg, 2006; Schnittger *et al.*, 2012). En los bovinos la enfermedad también es conocida como Fiebre de Texas, Piroplasmosis, Fiebre de la garrapata, Aguas rojas, Ranilla y Tristeza (Ristic y Kreier, 1981). De las especies que afectan al ganado bovino, *Babesia bovis* y *B. bigemina* se encuentran ampliamente distribuidas y provocan pérdidas en la ganadería (OIE, 2004).

La enfermedad puede presentarse en forma aguda, subaguda y crónica. Los bovinos con enfermedad aguda y subaguda presentan fiebre, depresión, anorexia, palidez de membranas mucosas, hemoglobinuria, hemoglobinemia y por ende una marcada anemia hemolítica de tipo hipocrómica y macrocítica (Quiroz, 2005). En la forma crónica se presenta emaciación, baja en la producción de leche y abortos (United States Animal Health Association, 2008).

En animales infectados con *B. bovis* algunos signos clínicos que también se presentan son signos neurológicos caracterizados por la incoordinación, convulsiones, temblores musculares, hiperexcitabilidad, agresividad, ceguera, movimientos de remo de las extremidades, posición en decúbito lateral y coma. Esta signología clínica severa es el resultado del secuestro de eritrocitos infectados en los capilares cerebrales (OIE, 2004; United States Animal Health Association, 2008). Los signos clínicos que muestran bovinos infectados con *B. bovis* pueden confundirse con la rabia parálitica bovina (Romero *et al.*, 2011).

1.2 Morfología de *Babesia bigemina*

La morfología de *Babesia bigemina* varía según el estadio evolutivo dentro del eritrocito y de la garrapata.

En el eritrocito existe una forma típica a la observación microscópica: es un corpúsculo único o en pares, con forma redondeada u ovalada. *B. bigemina* es clasificada como una especie grande ya que puede llegar a ocupar hasta $\frac{3}{4}$ partes del eritrocito, sus dimensiones son 4-5 x 2 μm aproximadamente, generalmente se visualiza en sus formas pareadas con una apariencia piriforme y unidas formando un ángulo agudo (Mosqueda *et al.*, 2004).

En la garrapata, el protozoo tiene morfología diferente. Durante la fase sexual de su ciclo biológico, en el lumen intestinal de la garrapata los gametocitos adquieren una forma esférica o polimórfica que se caracteriza por tener protuberancias en forma de flagelos, conocidos como *Strahlenkorper* o cuerpos radiados que tienen un diámetro de aproximadamente 4-7 μm . Posteriormente se forma el cigoto, que es el resultado de la unión de los gametocitos, el cual tiene una forma esférica con un tamaño inicial aproximado de 3 μm de diámetro que posee además en su morfología algo que asemeja a una punta de una flecha o de espina (Mackenstedt *et al.*, 1995, Hodgson, 1992, Young y Morzaria, 1986). El quineto, una fase móvil que migra por la hemolinfa la forma es alargada en forma de bastón, tiene una medida inicial aproximada de 7-8 μm , pero al en su estado maduro mide 12-15 x 3 μm . Finalmente el esporozoito que es la última fase en la garrapata se encuentra en las glándulas salivales y tiene una morfología piriforme con extremo apical amplio y un polo posterior estrecho (Mackenstedt *et al.*, 1995, Hodgson, 1992, Young y Morzaria, 1986).

1.3 Clasificación taxonómica

Según Levine *et al.*, (1980) su clasificación taxonómica es:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoa

Subclase: Piroplasmia

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: Babesia

Especie: *bigemina*

1.4 Ciclo biológico de *B. bigemina*

El ciclo biológico de *Babesia bigemina* es indirecto, con fases de desarrollo en la garrapata y en el hospedero bovino, caracterizado por tener fases sexuales en el artrópodo y asexuales en el mamífero (Mosqueda *et al.*, 2004c).

Cuando un esporozoito es inyectado en la sangre invade al eritrocito con la ayuda de su complejo apical especializado, ya en el interior del eritrocito se transforma en trofozoito que tiene una forma de anillo, posteriormente por un mecanismo de fisión binaria (merogonia) se generan dos merozoitos que se encuentran unidos, formando un ángulo agudo y cada uno con forma de pera. Los merozoitos maduros escapan rompiendo el eritrocito para infectar otros eritrocitos y ser transformados nuevamente a trofozoitos para dar origen a nuevos merozoitos y así continuar con la fase asexual del ciclo (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012). En la fase sexual del ciclo: los merozoitos son ingeridos por garrapatas durante su alimentación en el hospedero infectado, la garrapata hembra repleta adquiere la infección durante las últimas 16-24 hrs antes de desprenderse del hospedero. Una vez que los eritrocitos infectados llegan al intestino de la garrapata, los merozoitos sufren cambios y se

convierten en células de cuerpo radiado, que se multiplican para formar agregados de células de cuerpos radiados multinucleados y posteriormente se transformarán en células de núcleo simple haploide dando origen a los gametocitos masculinos y femeninos. Cuando estas células se transforman en gametos machos y gametos hembras, enseguida se fusionan en pares (singamia) para formar el cigoto, una célula esférica y diploide. Este cigoto infecta a células digestivas y células que sintetizan vitelogenina que favorecerá la formación de quinetos. A esta etapa se le conoce como esquizogonia (Bock *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2009, Mosqueda *et al.*, 2012). Los quinetos posteriormente escapan de las células intestinales, pasan a la hemolinfa e infectan diferentes células y tejidos de la garrapata, incluyendo a los ovarios, dando lugar a la infección de los huevos que tienen los embriones, antes de que estos sean recubiertos por quitina, constituyendo así la transmisión transovárica. Los quinetos invaden las células del intestino de embrión cuando ocurre la oviposición de las garrapatas y permanecen en los tejidos del embrión hasta la eclosión de la larva. Cuando la larva se adhiere al bovino, la temperatura corporal del hospedador induce a la multiplicación de los quinetos que migran a las glándulas salivales de la larva donde se transformarán a esporoblastos que son los precursores de miles de esporozoitos. Finalmente los esporozoitos infectantes son liberados con la saliva a la sangre del hospedero cuando la garrapata se alimenta.

En *B. bigemina* las formas infectivas de los esporozoitos se desarrollan en 9 días aproximadamente, por ello la transmisión ocurre en los estadios ninfal y adulto de la garrapata, pudiendo ser tanto la hembra como el macho los transmisores (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2004a; Mosqueda *et al.*, 2004b; Mosqueda *et al.*, 2004c; Rojas *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012).

1.5 Epidemiología

La biología de la babesiosis bovina está enfocada a tres componentes epidemiológicos principales: el vector, el agente causal y el hospedero (Solario-

Rivera y Rodríguez-Vivas, 1997) por lo tanto la distribución de la babesiosis bovina está determinada por la presencia del vector.

Babesia bovis, *B. bigemina* y *B. divergens* son las especies más importantes causantes de la babesiosis bovina y provocan grandes pérdidas económicas. *B. bigemina* y *B. bovis* se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales del mundo siendo su vector principal la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp. (microplus, annulatus, decoloratus)*. Por su parte *B. divergens* se encuentra distribuida en Europa y su vector principal es la garrapata *Ixodes ricinus*. Aproximadamente 1-2 mil millones de bovinos en el mundo están expuestos a la babesiosis (Bock *et al.*, 2004; Schnittger *et al.*, 2012).

Babesia bigemina y *Babesia bovis* se distribuyen entre los paralelos 40 Norte y 32 Sur abarcando África, Asia, Australia, Centro y Sur de América y algunas partes del sur de Europa, presentándose aun en algunas ocasiones también en el sur de EUA (Bock *et al.*, 2004).

En México, el 70% de la población ganadera se encuentra expuesta a infectarse con *B. bovis* y *B. bigemina* y a nivel mundial existe una prevalencia de un 50 hasta un 90% de la enfermedad (Solorio-Rivera y Rodríguez-Vivas, 1997).

1.6 Impacto económico de la babesiosis bovina

La babesiosis bovina es la enfermedad transmitida por artrópodos económicamente más importante en la ganadería. Las pérdidas económicas que se generan son debidas a las mortalidades altas de bovinos enfermos, abortos, disminución en producción de carne y leche, gastos por tratamientos contra el vector, tratamientos terapéuticos y la restricción para comercializar ganado, ya sea nacional e internacionalmente. Además es también un obstáculo para el mejoramiento genético del ganado bovino presente en zonas endémicas de la enfermedad, ya que

limita la introducción de ganado genéticamente superior que es susceptible a la enfermedad (Ristic y Kreier, 1981; Bock *et al.*, 2004; Schnittger *et al.*, 2012). Se ha estimado por ejemplo que en EUA, las pérdidas en la ganadería por la Babesiosis son de 500 millones de dólares anuales, siendo 21.3 dólares/cabeza/año por garrapatas y enfermedades que transmite y de esto 1.9 dólares/cabeza/año por Babesiosis; en Australia las pérdidas tan solo en dos estados son de 7.8 dólares/cabeza/año, siendo de babesiosis 4 centavos/cabeza/año y se ha estimado que el costo del control y las pérdidas por Babesiosis y Anaplasmosis en todo el país son de 16.9 millones de dólares al año, añadiendo las pérdidas por 6.4 millones de dólares anuales. En México las pérdidas en la ganadería son de 3,587 millones de pesos aproximadamente al año, en el Reino Unido son de 800,000 dólares anuales y finalmente en otros países como Kenya, Zimbabwe, Tanzania, Sudáfrica, China, India, Indonesia y Filipinas los costos y perdidas están en 5.1, 5.4, 6.8, 21.6, 19.4, 57.2, 3.1 y 0.6 millones de dólares al año respetivamente. (Ristic y Kreier, 1981; Bock *et al.*, 2004; Lew y Jorgensen, 2005; Figueroa y Álvarez, 2007).

En EUA después de la erradicación del vector de la babesiosis, se calcula que cada año existe un ahorro para el sector ganadero de aproximadamente 3 billones de dólares (Schnittger *et al.*, 2012).

1.7 Diagnóstico

Aunado a la historia clínica, el diagnóstico de animales con enfermedad aguda se basa principalmente en la observación microscópica de frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa, donde se observan los merozoitos de *Babesia bigemina*. Existen también métodos inmunológicos como las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y la Inmunocromatografía que detectan anticuerpos del suero sanguíneo de los bovinos contra antígenos de *Babesia spp*, siendo el último el más fácil de utilizar. Estos métodos no pueden ser usados en enfermedades agudas. Sin embargo existen también métodos

moleculares que son más sensibles y específicos para identificar los animales que están infectados con *Babesia spp.*, como la hibridación molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real o Cuantitativa (RT-PCR) (El-Ghaysh *et al.*, 1996; Madruga *et al.*, 2001; OIE, 2004; Buling *et al.*, 2007; Ravindran *et al.*, 2007; Mosqueda *et al.*, 2012).

1.8 Control de la babesiosis

Se realiza principalmente por métodos y estrategias como tratamientos químicos contra el vector, control de la movilización del ganado, quimioterapia y quimioprofilaxis, uso de ganado resistente y la inmunización, considerándose esta última como el procedimiento que ofrece la mejor perspectiva para el control de la enfermedad (Vega, 1991; Figueroa y Álvarez, 2007; Gohil *et al.*, 2012).

Actualmente la quimioterapia se basa en el uso parenteral de Imidocarb y Diaceturato de diminazeno, aunque su uso suele estar combinado con otros compuestos como antiinflamatorios, hierro, dextrosa, vitamina B y terapia de fluidos (Vial y Gorenflot, 2006; Mosqueda *et al.*, 2012).

Para el control de la enfermedad se ha utilizado también la premunición, que consiste en inocular sangre infectada con *Babesia* a bovinos que serán introducidos a zonas enzoóticas, este método no es recomendable y es riesgoso ya que genera la enfermedad como tal y los animales pueden morir (Morilla, 1981).

Además se han desarrollado otros métodos como el uso de vacunas con cepas atenuadas a través de pases en becerros esplenectomizados ó mediante irradiaciones, vacunas producidas con el cultivo in vitro de *Babesia* y vacunas de exoantígenos del parásito (Smith *et al.*, 1981; Cantó *et al.*, 1982; Rodríguez *et al.*, 1993; Callow *et al.*, 1997; Ramírez-Cruz *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2006).

Las vacunas con cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina* han sido usadas y han mostrado capacidad protectora contra la enfermedad (Callow *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 1998; Benavides *et al.*; Álvarez *et al.*, 2004).

Las vacunas atenuadas han funcionado y ofrecen protección duradera, pero pueden ocurrir infecciones posteriores debida a la diversidad genética de *Babesia* en la misma población (Pipano, 1995; Callow *et al.*, 1997). Su uso tiene algunas desventajas ya que puede provocar reacciones severas en los bovinos inmunizados, requiere del monitoreo post-inmunización, existe riesgo en hembras gestantes, puede causar anemias hemolíticas en becerros que consumen calostro de madres que han sido vacunadas varias veces, la posible transmisión de otros agentes infecciosos y la pérdida de infectividad de los parásitos usados como inmunogénos en la infección de garrapatas, teniendo efecto en el desequilibrio de la estabilidad enzoótica de la enfermedad (Pipano, 1995; Callow *et al.*, 1997; De Vos y Bock, 2000; Waal y Combrink, 2006; Rojas *et al.*, 2011).

Los inmunogénos de exoantígenos, que son antígenos parasitarios obtenidos a partir de extractos de eritrocitos infectados, conocidos como antígenos parasitarios solubles (APS) presentes en el sobrenadante de cultivos de *Babesia* spp., son obtenidos de la lisis artificial del eritrocito infectado, excretados-secretados por el parásito en el medio de cultivo durante la invasión o al salir del eritrocito. Se han probado experimentalmente y se ha observado que inducen una respuesta inmune y ofrecen una protección contra la enfermedad, sin embargo es variada ó limitada. Actualmente existe una vacuna en forma comercial con este tipo de antígenos, pero es contra la babesiosis canina (Smith *et al.*, 1981; Echaide *et al.*, 1993; Schetters y Montenegro James, 1995; Patarroyo *et al.*, 1995; Schetters, 2005).

Aunque existen métodos de control contra la enfermedad, como los mencionados anteriormente, es necesario tener métodos que sean más eficaces y seguros y que induzcan respuestas inmunológicas protectoras en los animales inmunizados. Una alternativa para ello es el uso de vacunas basadas en herramientas biotecnológicas.

1.9 Genoma de *B. bigemina*

El genoma nuclear de *B. bigemina* está distribuido en 4 cromosomas y tiene un tamaño total aproximado de 10Mb aproximadamente. En una cepa Mexicana se demostró que los cromosomas tienen un tamaño de 0.7, 1.2, 3.5 y 4.6 Mb respectivamente, sin embargo el tamaño de los cromosomas puede variar según el origen geográfico de la cepa y el tiempo de atenuación (Ray *et al.*, 1992). El genoma de *B. bigemina* no se encuentra anotado aún, solo esta capturado en contigs y puede consultarse en la base de datos de la página del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>).

1.10 Variación antigénica

Este mecanismo se refiere a la capacidad que tienen los parásitos de alterar sus moléculas de superficie expuestas que son blancos de la respuesta inmune, favoreciendo así la evasión inmune (Allred, 2001). Esto lo logran mediante mecanismos complejos y parte de su genoma lo utilizan para ello, generando nuevos epítomos y variando su expresión (Dzikowski y Deitsch, 2006).

Se ha demostrado que *B. bovis* puede generar diferentes copias de los antígenos variables de superficie (VESA) mediante conversión génica, proceso similar que utiliza *Trypanosoma brucei* para generar diferentes epítomos (Dzikowski y Deitsch, 2006). Existe también en otros parásitos apicomplexos como *Plasmodium falciparum* un mecanismo mediante el cual pueden activar o desactivar los promotores para la expresión de diferentes proteínas, esto realizándolo mediante mecanismos epigenéticos que se relacionan con la modificación de la cromatina (Dzikowski y Deitsch, 2006).

El uso de vacunas vivas se ha visto comprometido debido a la variación antigénica. Por ejemplo, en Australia donde por años se usó una vacuna viva contra *B. bovis*,

la cual tuvo cambios en la protección contra la enfermedad, ya que en el ganado vacunado se generaban brotes de la enfermedad, sugiriendo como causa la diversidad antigénica de poblaciones o la generación de cambios genotípicos en la misma población (Bock *et al.*, 1992). Así mismo anteriormente ya se había demostrado que la aglutinación de anticuerpos contra eritrocitos infectados por *B. bovis* varía según el curso de la infección, dependiendo del momento en el que se toma la muestra de sangre del mismo bovino, disminuyendo la aglutinación en el tiempo de infección, lo que sugiere una rápida variación antigénica en una misma población (Curnow, 1968). La variación antigénica también ha sido demostrada en bovinos infectados con aislados de *B. bigemina* (Thompson *et al.*, 1977; Thompson *et al.*, 1978).

1.11 Uso de vacunas recombinantes contra la Babesiosis

Con la secuenciación del genoma de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* se ha logrado obtener información valiosa sobre genes que codifican para proteínas que son vitales en algunos procesos de estos protozoarios, que mediante su análisis bioinformático se han considerado candidatos vacunales contra la enfermedad, esto según su antigenicidad y homología entre diferentes especies (Mosqueda *et al.*, 2012; Pérez de la Rosa *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso de vacunas recombinantes que induzcan respuestas inmunológicas humorales protectoras contra estos protozoarios se ha visto limitada, debido a la variación de los antígenos inmunodominantes en las distintas cepas de los protozoarios distribuidas en el campo (Palmer *et al.*, 1991; Dalrymple, 1993; Mosqueda *et al.*, 2007; Mosqueda *et al.*, 2012).

El uso de vacunas recombinantes contra la babesiosis bovina ha sido probado. Por ejemplo, en el caso de *B. bovis*, bovinos que recibieron 3 inoculaciones de 100 µg y una 4ª de 200 µg del antígeno de la superficie del merozoito 1 recombinante (rMSA-1) más adyuvante respectivamente, produjeron títulos de anticuerpos altos

que reconocen a la proteína nativa mediante Inmunolectrotransferencia y además neutralizan in vitro la infección, sin embargo no protegieron a los bovinos al desafío con una cepa virulenta de *B. bovis* (Hines *et al.*, 1995).

Así mismo, al usar la proteína asociada a las roptrías 1 recombinante (rRAP-1) de *B. bovis* se demostró que genera una respuesta inmunológica en terneros, produciendo títulos altos de anticuerpos contra la proteína, sin embargo no genera protección contra la enfermedad y los anticuerpos no neutralizan la invasión in vitro (Norimine *et al.*, 2003).

Por lo tanto, se sugiere que para proteger contra la enfermedad usando vacunas recombinantes es necesario que el inmunógeno incluya diferentes antígenos y/o combinaciones de epítomos de distintas proteínas (Hines *et al.*, 1995).

Ante este obstáculo en el desarrollo de vacunas recombinantes contra la Babesiosis bovina se ha planteado una estrategia que consiste en: a) la identificación de genes que codifiquen para proteínas involucradas en el proceso de invasión y escape del parásito a la célula hospedera, b) el análisis de las regiones de estos antígenos que estén expuestos al sistema inmunitario y c) la identificación de epítomos expuestos que sean conservados en cepas de distintas regiones del mundo. Estos epítomos conservados y expuestos serán evaluados por su capacidad de generar una respuesta inmune de tipo humoral específica contra el parásito (Mosqueda *et al.*, 2012). Finalmente, a todos los epítomos que cumplan con las características anteriores, se les podrá evaluar su capacidad protectora en desafíos contra la enfermedad.

Las proteínas candidatas vacunales que se han considerado en el control de la babesiosis bovina son las que se encuentran en la superficie de membrana de los merozoitos y proteínas de organelos del complejo apical del protozoario que participan en el contacto, invasión, internalización y escape del parásito (Palmer y McElwain, 1995; Brown *et al.*, 2006; Suarez y Noh, 2011).

1.12 Proteínas candidatas vacunales contra *Babesia bigemina*

1.12.1 Glicoproteína 45 (GP45)

Esta proteína fue identificada mediante anticuerpos monoclonales, tiene un peso de 45kDa y se encuentra expuesta en la membrana de merozoitos de *B. bigemina*. GP45 es una proteína glicosilada lo que le da mayor inmunogenicidad y así es reconocida más fácilmente por el sistema inmune del bovino (McElwain, 1991). Se sugiere que la función de esta proteína está relacionada con el contacto de la membrana del parásito y la membrana de la célula huésped durante el proceso de invasión, ya que proteínas homólogas de *Babesia bovis* neutralizan la invasión de merozoitos in vitro (Carcy *et al.*, 2006). La secuenciación de este gen en una cepa Mexicana demostró que contiene 1058 pb que se traducen en 351 aminoácidos (Fisher *et al.*, 2001).

Suero de bovinos inmunizados con GP45 de una cepa mexicana y anticuerpos monoclonales anti-GP45 se unen a merozoitos de cepas homólogas mexicanas, sin embargo esta unión o reconocimiento no existe con cepas de otros países, lo que confirma su polimorfismo antigénico e indica una variación de epítomos B entre cepas (Fisher *et al.*, 2001).

Para evaluar su efecto en la protección, se realizó un ensayo de inmunización utilizando esta proteína purificada y se observó que induce una protección relativa ya que reduce el porcentaje de parasitemia en bovinos que son desafiados con el parásito (McElwain, 1991).

1.12.2 Proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1)

Las roptrías son los organelos más grandes del complejo apical de *Babesia*, su número, tamaño y forma varía según la especie. *Babesia caballi* por ejemplo, suele

tener 3 roptrías y son consideradas el segundo organelo secretorio principal después de las micronemas (Blackman y Bannister 2001). Secretan principalmente dos tipos de proteínas, unas denominadas RON que tienen función en el contacto y unión estrecha del parásito con la membrana de la célula huésped y otras denominadas RAP que tienen la función de modificar la membrana de la célula huésped para la penetración del parásito. Las proteínas de las roptrías se secretan durante la invasión de los eritrocitos y la formación de la vacuola parasitófora, después de las proteínas de las micronemas (Sam-Yellowe, 1996; Gubbles y Duraisingh *et al.*, 2012).

En *Babesia bovis* se encontró una proteína homóloga a Pf60 que es codificada por una familia de multigenes y secretada por las roptrías en *Plasmodium falciparum* denominada Proteína asociada *Babesia* a roptrías 1 (RAP-1) que pesa 60 kDa. En *B. bovis* RAP-1 es codificada por dos genes dispuestos en tándem separados por una región intergénica de 1kb, se expresa en merozoitos y esporozoitos, es conservada entre distintas cepas y entre diferentes especies de (Sam-Yellowe, 1996; Mosqueda *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2006).

Mediante anticuerpos monoclonales se identificó en *B. bigemina* una proteína de 58kDa que contenía epítomos expuestos y que generaba protección en desafíos (McElwain *et al.*, 1991). Posteriormente se obtuvo la secuencia del gen que codifica para esta proteína el cual consta de 1440pb que se traducen en 480 aminoácidos (Mishra *et al.*, 1991). Así mismo se demostró que anticuerpos contra la proteína P58 recombinante se unen a la superficie de merozoitos de aislados de distintas zonas geográficas de Latinoamérica (Mishra *et al.*, 1991). En otro estudio se demostró la existencia de 4 copias del gen P58 en *B. bigemina*, cada una con un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) diferente, al mismo tiempo demostrando la expresión diferencial en los estadios del parásito en la sangre, identificando solo dos proteínas, una de 53kDa y otra de 58kDa que correspondía a la proteína P58 (Mishra *et al.*, 1992). Debido a la homología con RAP-1 de *B. bovis*,

a esta proteína se le denominó con el mismo nombre (Machado *et al.*, 1993, Suarez *et al.*, 1991).

Posteriormente en una cepa mexicana de *Babesia bigemina* se comprobó lo anterior, demostrando que existen 5 genes RAP-1a y se encuentran dispuestos en tándem separados por regiones intergénicas mayores a 3kb agrupándose en 4 clases polimórficas que se denominaron RAP-1a α 1, RAP-1a β 1, RAP-1a β 2 y RAP-1a β 3 distinguiéndose por las secuencias que codifican sus extremos amino y carboxilo (Suarez *et al.*, 2003). Así mismo, en el locus de RAP-1 se encuentran genes adicionales denominados RAP-1b y RAP-1c que están muy relacionados a RAP-1a y son conservados en diferentes aislados. La transcripción de los tres genes RAP1a, RAP1b y RAP1c fue reportada en merozoitos *in vitro* e *in vivo*, pero la expresión de las proteínas RAP1b y RAP1c no se presenta en merozoitos libres lo que sugiere una regulación en su expresión por parte del parásito (Suarez *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que RAP-1a se transcribe y expresa en estadios sexuales en la garrapata y quinetos (Vichido *et al.*, 2008).

En un experimento de inmunización en bovinos utilizando roptrías purificadas se indujo protección contra *Babesia bigemina*, ya que solo uno de los bovinos inmunizados mostró parasitemia después del desafío mientras que los demás bovinos no presentaron la enfermedad. Debido a que se identificó a RAP-1 como una proteína inmunodominante de los componentes de las roptrías, se sugiere este resultado a la participación de RAP-1, aunque probablemente estuvieron involucradas otras proteínas (Machado *et al.*, 1993; Machado *et al.*, 1999). En un trabajo realizado por Figueroa *et al.*, (1991) utilizando anticuerpos monoclonales contra esta proteína demostraron que neutralizan la invasión *in vitro* de los eritrocitos hasta en un 65%.

1.12.3 Antígeno de membrana apical 1 (AMA-1)

El antígeno de la membrana apical uno (AMA-1) es una proteína que inicialmente fue caracterizada en el protozooario apicomplexa *Plasmodium knowlesi*. Participa durante el contacto o unión estrecha y reorientación del complejo apical del merozoito a la membrana de la célula hospedera, este es el primer paso en el proceso de invasión del parásito. Sin embargo para completar el movimiento de unión del parásito es necesario que AMA-1 se una a otras proteínas secretadas por las roptrías que se fijan en la membrana de la célula hospedera, formando un complejo entre estas y así iniciar el proceso de invasión (Tyler *et al.*, 2011; Giovannini *et al.*, 2011). Es una proteína transmembranal tipo I que es almacenada por organelos apicales conocidos como micronemas, consta de una región extracelular que tiene 3 dominios (I, II, III) que están relacionados con la función de adhesión proteína-proteína, por lo tanto ha sido clave como un antígeno vacunal contra el paludismo en humanos, ya que anticuerpos contra AMA-1 bloquean la invasión de los eritrocitos. AMA-1 se ha encontrado en protozoarios apicomplexa como *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii* y *Babesia spp.* (Tyler *et al.*, 2011).

En un aislado de *Babesia bovis* se encontró una proteína homóloga a AMA-1 de *Plasmodium falciparum*. Péptidos localizados en los dominios II y III de AMA-1 generan anticuerpos que reconocen AMA-1 en merozoitos mediante inmunofluorescencia indirecta y en un ensayo *in vitro* se redujo la invasión de eritrocitos en un 65%, lo que sugiere que es un candidato vacunal contra *Babesia bovis* (Gaffar *et al.*, 2004).

Esta proteína recientemente fue caracterizada en una cepa Italiana de *Babesia bigemina* y así mismo se logró identificar que se encuentra conservada en algunas cepas italianas y una mexicana (Torina *et al.*, 2010).

1.12.4 Proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP4)

Las proteínas de los cuerpos esféricos (Spherical Body Proteins o SBPs) son proteínas secretadas por los cuerpos esféricos, organelos presentes en el complejo apical de *Babesia* spp. Las SBPs están relacionadas con el proceso posterior a la invasión o penetración del parásito, son necesarias para la asociación, internalización (formación y disolución de la vacuola parasitófora) y viabilidad del parásito cuando ha ingresado a la célula hospedera. A la fecha se han identificado 4 proteínas de los cuerpos esféricos en *Babesia bovis*: SBP-1, SBP-2, SBP-3 y SBP-4 (Yokoyama *et al.*, 2006; Gohil *et al.*, 2010).

SBP-4 es proteína recientemente caracterizada en *Babesia bovis* que posee un marco abierto de lectura de 1119 pb, que consiste en 372 aminoácidos, con un peso de 41 kDa. No tiene homología con proteínas de otros parásitos apicomplexa, aunque existe poca homología con una proteína identificada en *Babesia bigemina*. Esta proteína es conservada entre distintos aislados de varias partes del mundo y experimentalmente se ha usado para diagnóstico de *Babesia bovis*. En experimentos *in vitro* usando IgG anti SBP-4 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la neutralización de la invasión, lo que sugiere que esta proteína no está involucrada en la invasión, sin embargo su liberación continúa en los eritrocitos infectados y su alta antigenicidad mostrada en comparación con otras proteínas de otros organelos del parásito hacen que sea considerada un candidato vacunal (Terkawi *et al.*, 2011; Terkawi *et al.*, 2011).

En *B. bigemina*, esta proteína consta de 277 aminoácidos y un peso de 31.3 KDa.

1.12.5 Proteína de las micronemas 1 (MIC-1)

La proteína de las micronemas uno (MIC-1) es una proteína inicialmente identificada en *Toxoplasma gondii* (Formaux *et al.*, 1996), que al igual que los parásitos del género *Babesia* pertenece al *Phylum* Apicomplexa. Es una proteína de las micronemas y su función está involucrada en el proceso de cito-adherencia e invasión a las células. La unión de MIC-1 a la membrana de la célula hospedera es mediante la unión al ácido siálico, por lo tanto, esta proteína contiene dominios de unión a carbohidratos. Proteínas homólogas a MIC-1 se encuentran en las micronemas de los parásitos apicomplexa (Silva *et al.*, 2010).

Mediante una búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el genoma de *Babesia bovis* teniendo la secuencia de la proteína de *T. gondii*, se identificó un gen homólogo y se denominó *Bbo-mic1* el cual codifica para 181 aminoácidos y tiene un peso de 21 kDa y que además es conservada entre diferentes cepas (Silva *et al.*, 2010). La proteína se obtuvo en forma recombinante y sintética (péptidos) y se usó para generar anticuerpos inmunizando ratones y conejos respectivamente. Posteriormente mediante inmunofluorescencia indirecta se identificó su expresión en eritrocitos infectados por *Babesia bovis*, así mismo se realizó un ensayo de neutralización *in vitro* y se obtuvo un porcentaje de inhibición de la invasión de hasta un 95%, lo que confirma la presencia de la proteína en los merozoitos y su importancia en el proceso de la invasión parasitaria (Silva *et al.*, 2010).

En *Babesia bigemina* no se ha caracterizado esta proteína, sin embargo en este trabajo se identificó una secuencia de aminoácidos homóloga a esta proteína.

II. Justificación

En México el control de la Babesiosis bovina está basado principalmente en el control del vector y el tratamiento de los animales infectados. No existen actualmente vacunas comerciales contra esta enfermedad, por lo tanto se necesitan nuevas alternativas de control.

Actualmente las herramientas basadas en la tecnología recombinante son una alternativa para la identificación de candidatos vacunales contra la babesiosis bovina. Para esto se utilizan técnicas de genómica, proteómica y de bioinformática. Con estas técnicas se puede estudiar la función de los genes de *Babesia spp.* e identificar aquellos que estén involucrados en procesos vitales del parásito y también se puede evaluar la variabilidad o conservación de estos genes en distintas cepas del parásito mediante programas bioinformáticos, y así poder determinar las regiones, péptidos o epítomos conservados que puedan ser usados como marcadores para diagnóstico de la enfermedad o como inmunógenos que generen anticuerpos específicos que confieran protección contra la babesiosis bovina.

La especie *Babesia bovis* ha sido ampliamente estudiada, en contraste *B. bigemina* no ha sido tan estudiada. Se han identificado hasta la fecha genes presentes en organelos y membrana de *Babesia bigemina* que son de importancia en el proceso de invasión de los eritrocitos y son considerados candidatos vacunales contra la enfermedad, tales como la proteína asociada a roptrias (RAP-1), las proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP-4), el antígeno de la membrana apical 1 (AMA-1), la proteína GP45 y la proteína MIC-1, sin embargo no se conoce el grado de conservación de estos genes en diferentes cepas de distintas zonas geográficas.

La inmunización con proteínas recombinantes ha sido evaluada contra *B. bovis*, sin embargo los resultados no han tenido éxito debido a la variación de los epítomos inmunodominantes.

Estos resultados indican que es necesario identificar epítomos en las proteínas candidatas vacunales de *B. bigemina* que sean conservados entre aislados de diferente zona geográfica y así después poder evaluar la capacidad inmunogénica y neutralizante de la invasión del parásito. Para posteriormente poder ser incluidos en algún inmunógeno que permita controlar la enfermedad que afecta y genera pérdidas económicas en la ganadería bovina.

III. Hipótesis

Las proteínas RAP-1 α , SBP-4, AMA-1, GP45 y MIC-1 de *Babesia bigemina* tienen epítomos B conservados.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar epítomos B conservados en las proteínas RAP-1 α , SBP-4, AMA-1, GP45 y MIC-1 de *Babesia bigemina*.

4.2 Objetivos específicos

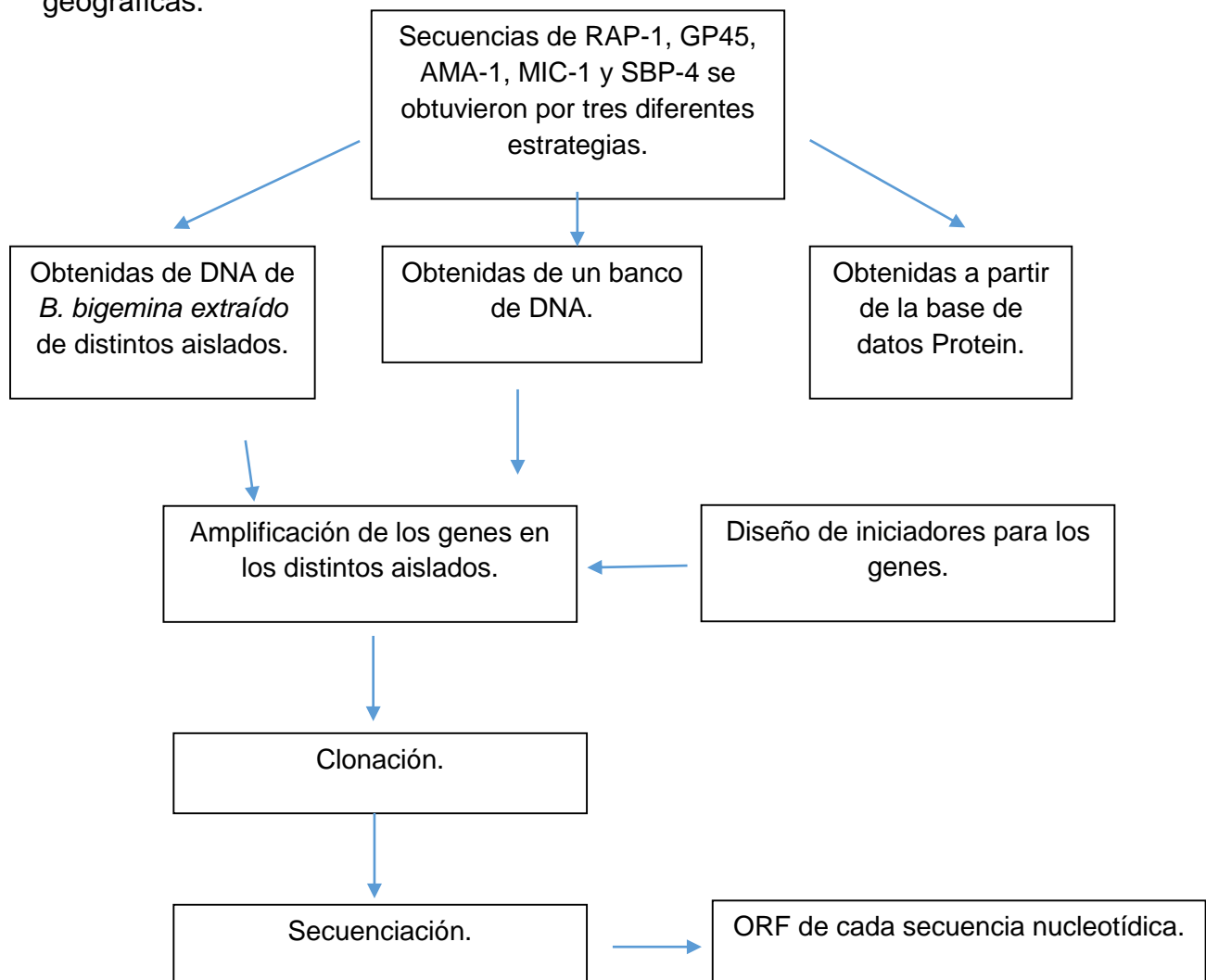
1. Obtener la secuencia predicha de las proteínas RAP-1 α , SPB-4, AMA-1, GP45 y MIC-1 de *Babesia bigemina*
2. Identificar *in silico* epítomos B conservados en las proteínas.
3. Comprobar la capacidad inmunogénica de los epítomos.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el trabajo de investigación se realizó la siguiente estrategia experimental:

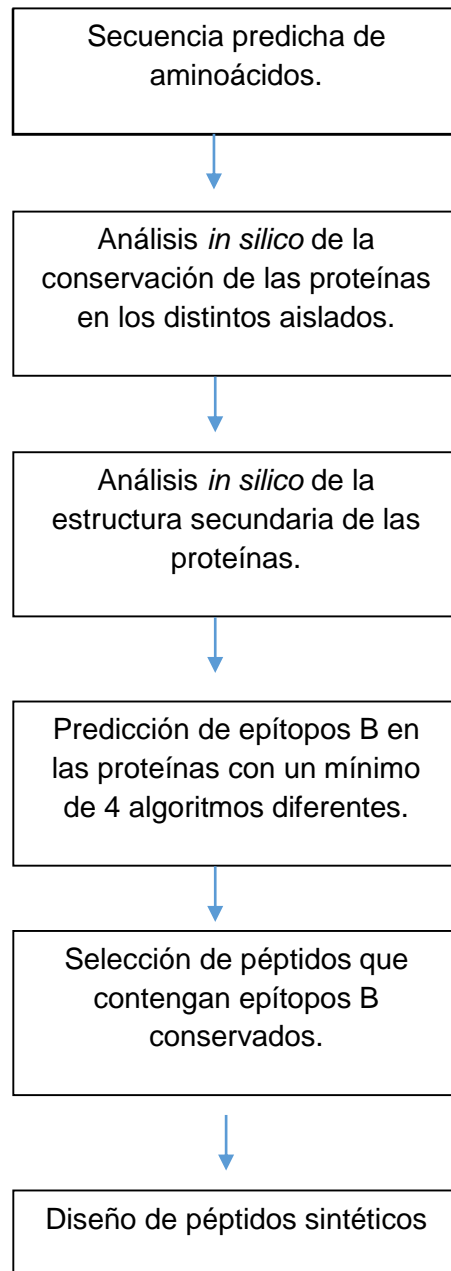
5.1 Objetivo 1.

Obtener la secuencia predicha de las proteínas RAP-1 α , SPB-4, AMA-1, GP45 y MIC-1 de *Babesia bigemina* de por lo menos 6 aislados de distintas zonas geográficas.



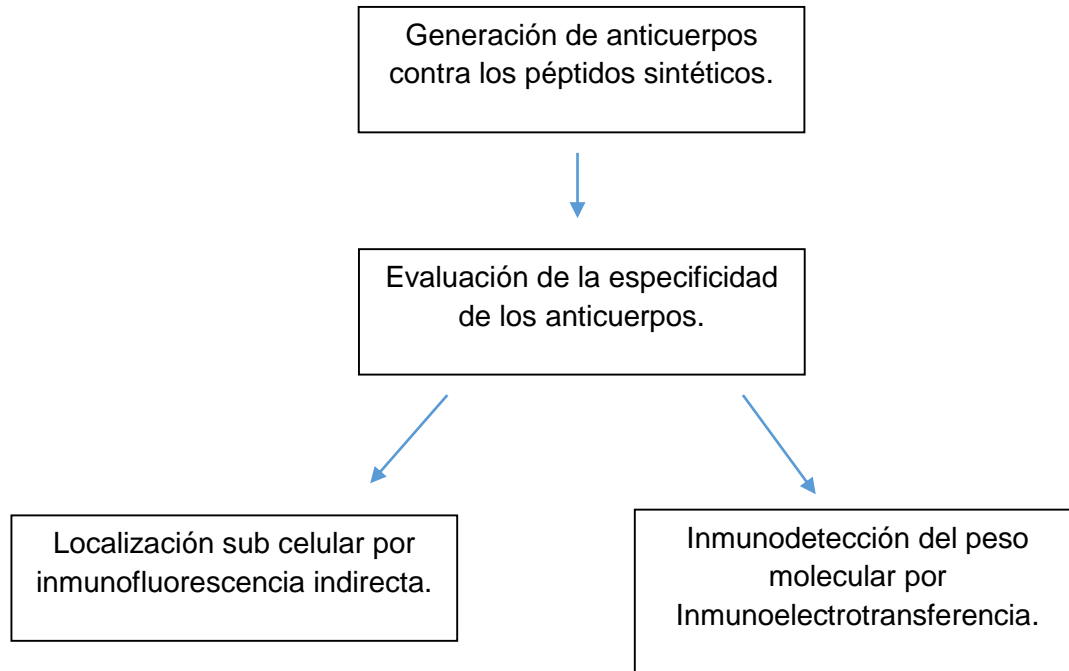
5.2 Objetivo 2.

Identificar *in silico* epítomos B conservados en las proteínas.



5.3 Objetivo 3.

Comprobar la capacidad inmunogénica de los epítomos.



VI. Material y métodos

6.1 Material Biológico utilizado.

El DNA utilizado en este trabajo proviene de la cepa Cintalapa, Chiapas caracterizada en el laboratorio de Investigación Inmunológica y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Así mismo también se utilizaron aislados provenientes de Martínez de la Torre Veracruz, Tamasopo San Luis Potosí, Soto la Marina Tamaulipas, Río Grande y Rondonia, Brasil. En los dos primeros el DNA se obtuvo mediante su extracción a partir de garrapatas infectadas y en los tres últimos aislados el DNA fue proporcionado al laboratorio.

Para obtener eritrocitos infectados con *B. bigemina* de la cepa Cintalapa, Chiapas se utilizó un bovino macho de 6 meses de edad de raza Europea, proveniente de una zona libre de garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus* y *Babesia* spp.

Para la generación de anticuerpos contra los péptidos se utilizaron conejos machos de dos meses de edad de raza Nueva Zelanda, los cuales se mantuvieron en instalaciones adecuadas y manejados de acuerdo a lo aprobado por el comité del SICUAE.

6.2 Obtención de las secuencias de las proteínas AMA-1, SBP-4, RAP1 α 1 y GP45 de la base de datos

En la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se realizó una búsqueda en la base de datos Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) para obtener las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas AMA-1, SBP-4, RAP1 α 1 y GP45 ya depositadas en esta base de datos.

6.3 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA a partir de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectadas y de sangre infectada con *B. bigemina*, utilizando para ello el método fenol-cloroformo alcohol isoamílico y un método que se estandarizó para sangre completa respectivamente en los aislados: Cintalapa, Chiapas; Martínez de la Torre, Veracruz; Soto la Marina, Tamaulipas; Tamasopo, San Luis Potosí; Rio Grande, Brasil y Rondonia, Brasil.

El método fenol-cloformo-alcohol isoamílico se desarrolló según el protocolo descrito por Mosqueda (2010). Brevemente, de forma inicial, en un mortero se maceraron garrapatas repletas previamente congeladas (-70°C). Antes de colocar las garrapatas en el mortero se agregaron 10 volúmenes de búfer de extracción y posteriormente se colocaron los parásitos sobre el búfer. Se pulverizaron los parásitos con un pistilo mediante movimientos circulares hasta que quedara un polvo fino y homogéneo.

Posteriormente se colectó la mezcla en tubos de 1.5 ml, no agregando más de 700 µl por tubo. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir su homogenización, se agregó a cada tubo Proteinasa K (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 45°C en baño maría. Al día siguiente se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitaron suavemente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 800 gravedades por 15 minutos a 15°C. Se observó la separación de las fases (la fase acuosa clara superior, la fase intermedia y la fase inferior turbia). La primera fase fue transferida a tubos estériles, esta fase que contenía el DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío, después se centrifugaron los tubos a máxima velocidad por 30 minutos a 4°C para formar la pastilla de DNA que se encontraba al fondo del tubo después de la centrifugación, inmediatamente se decanta el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla, se agregaron 500 µl de etanol al 70% para lavar el DNA mezclando la muestra con un agitador tipo vortex y centrifugando a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C. Finalmente se dejó secar la pastilla en una campana de flujo laminar durante 15/20 minutos y se disolvió en 50µl de agua libre de nucleasas para poder ser cuantificado.

El método de extracción de DNA a partir de sangre infectada se realizó siguiendo un protocolo publicado en Bartlett M. S. John and Stirling D., (2003) y se realizó de la siguiente forma:

Se colocaron 3 ml de sangre en un tubo de 15 ml de polipropileno, se adicionaron 12 ml de Reagent A (0.01M Tris-HCl ph. 7.4, 320mM sucrosa, 5mM MgCl₂, 1% Triton X 100) esta mezcla se combina en agitación suave durante 4 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 3000 × g por 5 minutos a temperatura ambiente, se descargó el sobrenadante sin tocar el pelet de células. Después se agregó 1ml de Reagent B (0.4M Tris HCl, 150mM NaCl, 0.06M EDTA, 1% SDS, ph. 8.0) y se mezcló la muestra con un agitador tipo vortex brevemente para resuspender la pastilla de células, se agregaron 250 µl de 5M de perclorato de sodio y se combinó mediante inversión del tubo varias veces. El tubo fue colocado en baño maría por 15-20 minutos a 65°C. Después de esto, se dejó enfriar el tubo a temperatura ambiente y se agregaron 2 ml de cloroformo frío (4°C) y se combinó mediante agitación suave por 30 a 60 minutos, después de este tiempo se centrifugó a 2400 × g por 2 minutos y se transfirió la fase superior acuosa que se forma a un tubo falcon limpio (estéril o nuevo) y se agregaron 2-3 ml de etanol frío (4°C) y se mezcló suavemente para permitir que el DNA se precipitara.

Finalmente se tomó el DNA (que se observa con una apariencia de algodón dentro del tubo) y se transfirió a un tubo de 1.5ml para dejar secar en la campana de flujo laminar durante 15/20 minutos y después se resuspendió en 50 µl de búfer TE (1M Tris HCl, 0.5M EDTA, ph. 7.6) para poder ser cuantificado.

6.4 Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores para los genes *mic-1*, *gp45* y *rap-1α1* utilizando el programa en línea Oligo Analyzer de la compañía IDT (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/).

Estos iniciadores se diseñaron de acuerdo a las características y requerimientos del vector de clonación que se utilizaría para la obtención de las secuencias completas de los genes *rap-1α1*, *gp45*, *ama-1* y *sbp4* y la secuencia parcial del gen *mic-1* de los distintos aislados. Para *rap-1α1* y *mic-1* fue necesario agregar 4 bases en el iniciador forward en el extremo 5' esto para permitir la ligación de los productos de PCR en el vector pENTR™, tal y como lo indica el manual (Invitrogen). Los iniciadores empleados se muestran en el cuadro 1.

Para el diseño se tomó en cuenta el tamaño del iniciador (número de bases), contenido de entre 40 y 60% de C/Gs, así como también que formaran horquillas, homodímeros y heterodímeros por complementariedad, respetando los valores predeterminados que existen para evitar estos fenómenos cuando fueran utilizados en las reacciones de PCR.

6.5 Amplificación de los genes

Utilizando el DNA extraído se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para cada gen con los diferentes aislados, para ello se diseñaron protocolos de termociclado distinto para cada gen según las características de los iniciadores y el tamaño de amplicón esperado.

Cuadro 1. Lista de iniciadores utilizados para los diferentes genes.

Gen	Secuencia de iniciadores	Tamaño de amplicon
<i>mic-1</i>	Forward 5'- CAC CGC TTC GAC GGA AAT GTG TC -3' Reverse 5'- ATG CCT TCA CCA CAG ATC CTA TCC -3'	361 pares de bases (pb).

<i>gp45</i>	Forward 5'- GCAAAGCAATGTAGCACCATC -3' Reverse 5'- CTGTCAAAGAAGCACTATCCGCC -3'	1229 pb.
<i>rap-1α1</i>	Forward 5'- CACC GCT GTC ACT ATC GTA ATA CAC -3' Reverse 5'- TGG CAA ATA TGA ACA CCT GAC CAA C -3'	1634 pb.
<i>ama-1</i>	AMA-1Fa CCG TCC ATA CGT ACG ATG TTA TGA AMA-1Ra TCT GAC AGG AAT GAA CGT GTA GGT AMA1 Int R CGT TGA TGA TGA GGC AGG TAG AMA1 Int F GTG CTC TTA CAA ACG CAG GC	1930 pb.

A continuación se muestran los diferentes protocolos de termociclado:

- *ama-1*

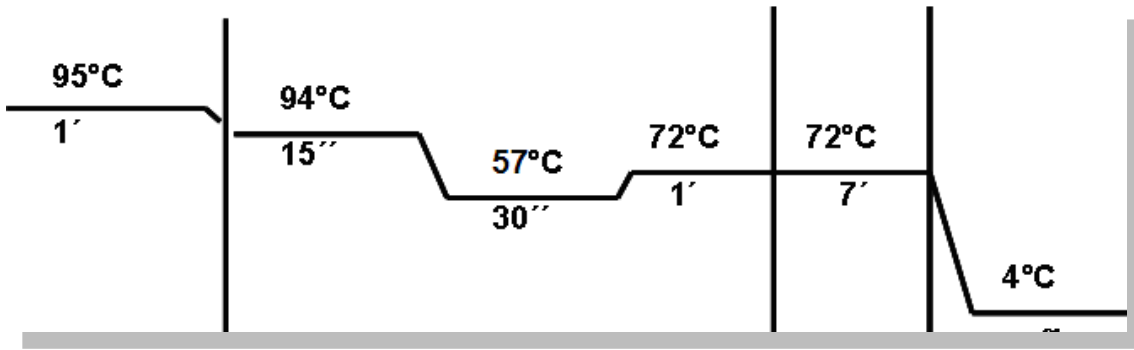


Figura 1. Programa de PCR para amplificar el gen *ama-1*.

- *gp45*

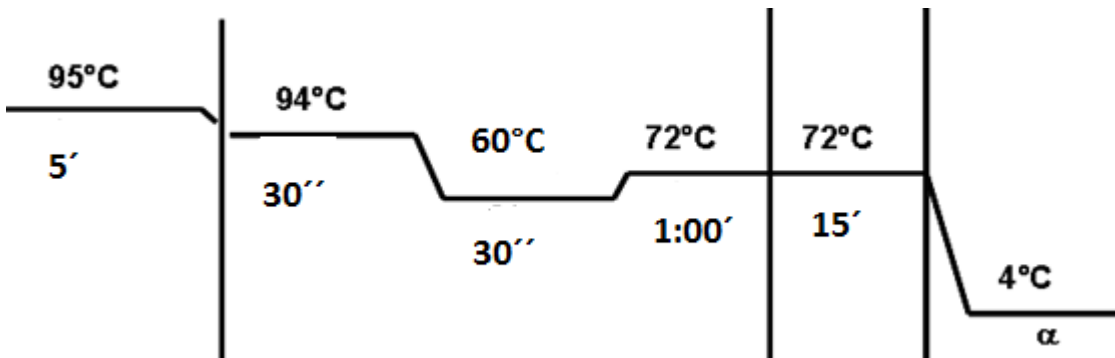


Figura 2. Programa de PCR para amplificar el gen *gp45*.

- *mic-1*

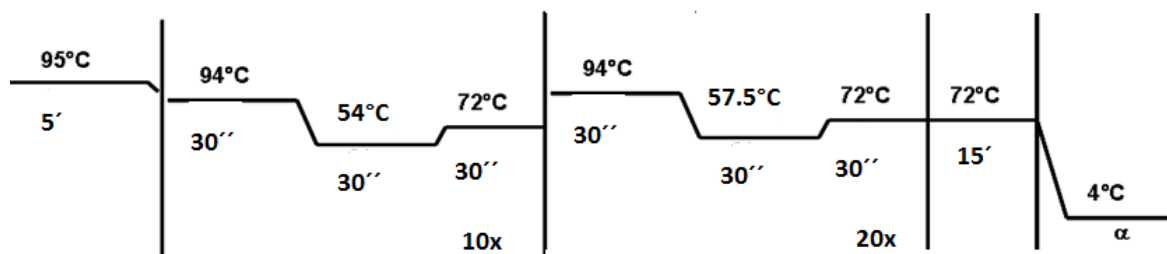


Figura 3. Programa de PCR para amplificar el gen *mic-1*.

- *rap-1α1*.

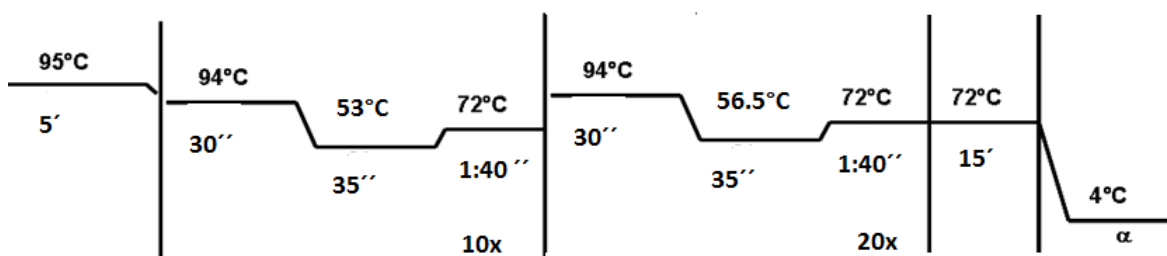


Figura 4. Programa de PCR para amplificar el gen *rap-1α1*.

Para el caso de los genes *ama-1* y *gp45* se realizó PCR con DNA de *B. bigemina* de la cepa Chiapas y para el caso de *mic-1* y *rap-1α1* se realizó con DNA de aislados de Chiapas, Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Río Grande y Rondonia, estos últimos de Brasil.

La preparación de la mezcla de PCR para cada reacción consistió de la siguiente forma:

Cuadro 2. Componentes de la reacción de PCR.

Componente	Volumen	Concentración
Master mix (Promega)	12.5 µl	
Agua libre de nucleasas	5.5 µl	
Iniciador forward	1 µl	20 µM

Iniciador reverse	1 μ l	20 μ M
DNA	5 μ l	100 ng
Volumen final	25 μl	

Posteriormente con el producto de PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa con una concentración de 1-2%, esto según el tamaño de amplificado de cada gen. Después utilizando un fotodocumentador se observó el resultado de la reacción de PCR mediante el corrimiento en la electroforesis, utilizando un marcador de tamaño molecular para verificar el tamaño correspondiente de los amplicones esperados.

Cuando se observaban amplificaciones de acuerdo al tamaño molecular de los genes en los productos de PCR (PPCR) que contenían los DNAs de los diferentes aislados utilizados, se continuó con la purificación de los productos de PCR correspondientes utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del kit para poder realizarlo y así finalmente cuantificar la cantidad del PPCR para poder ser usado en el siguiente paso.

6.6 Clonación y transformación de células competentes

Para el proceso de ligación del producto de PCR se utilizaron los kits comerciales pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit y TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, según las características de los iniciadores utilizados para amplificar los genes en los distintos DNAs.

Se preparó la mezcla de ligación en un tubo de PCR agregando una proporción de 2:1 de Producto de PCR-vector de clonación en nanogramos, también se añadió 1 μ l de solución de sales y la cantidad de H₂O para completar un volumen final de 5 μ l según las especificaciones del protocolo. Esta se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se colocó en hielo para continuar con la

transformación química de las células competentes. Cabe mencionar que los dos vectores de clonación tienen las mismas instrucciones de uso para llevar a cabo la clonación.

Se utilizaron células competentes One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* y la transformación fue mediante shock térmico, utilizando los pasos que indica el manual de este kit comercial. Se añadieron 2 μ l del producto de clonación en un vial que contenía 50 μ l de estas células competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos, después se realizó el shock térmico (en baño maría o termoblock) a 42°C por 30 segundos e inmediatamente se colocó el vial en hielo nuevamente por 2 minutos. A temperatura ambiente se agregaron 250 μ l de medio S.O.C (2% Tryptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM de glucosa) y se incubó a 37°C por 60 minutos con agitación a 200 rpm. Finalmente se colocaron 100 μ l de este cultivo de células competentes en cajas de Petri que contenían medio LB/kanamicina o ampicilina 50 μ g/ml según el vector de clonación utilizado y se dejó incubar toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se seleccionaron colonias crecidas en las cajas de Petri para la evaluación de la presencia de inserto (gen de nuestro interés) mediante PCR convencional de las colonias seleccionadas, utilizando iniciadores M13 que son específicos del vector e iniciadores de los genes de *B. bigemina*. Las colonias con el inserto se seleccionaron y se crecieron a una temperatura de 37°C durante toda la noche en tubos Falcon con 5 ml de medio LB/Kanamicina 50 μ g/ml.

Al siguiente día se realizó la extracción y purificación del plásmido utilizando el kit comercial Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Para ello se centrifugó el cultivo incubado a 10,000 gravedades por 5 minutos para decantar el sobrenadante y obtener el pellet. Se agregaron 250 μ l de solución de resuspensión celular y se mezcló en un agitador tipo vortex, se agregaron después 250 μ l de solución de lisis celular, se mezcló mediante inversión y se dejó incubar a por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron después 10 μ l de solución de

proteasa alcalina y se mezcló por inmersión. Para neutralizar la enzima se agregaron 350 μ l de solución de neutralización y se centrifugó esta mezcla de lisado celular a 14, 000 gravedades por 10 minutos a temperatura ambiente.

Después por decantación se transfirió la parte clara del lisado celular a la columna de unión ensamblada en un tubo de recolección y se centrifugó a 14, 000 gravedades por 1 minuto. Se desechó el contenido del tubo de recolección y se agregaron 250 μ l de solución de lavado a la columna y se centrifugó de la misma forma, se repitió este lavado con 250 μ l de esta solución y se centrifugó por dos minutos a la misma velocidad. Finalmente se colocó la columna a un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml, se añadieron 50 μ l de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 14, 000 gravedades por 1 minuto para recuperar el DNA plasmídico unido en la membrana de la columna.

6.7 Secuenciación

Para secuenciar los amplicones que se encontraban en los plásmidos purificados fue necesario cuantificar la concentración de DNA plasmídico en el nanodrop. La cantidad que se utilizó para secuenciar fue de 300-500 ng utilizando para ello iniciadores M13 que son específicos para los plásmidos.

Los plásmidos purificados de 2 a 4 clonas fueron enviados a secuenciar en ambas direcciones al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) ubicado en San Luis Potosí o al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. El método usado para la secuenciación fue el automatizado de Sanger.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados y ensamblados utilizando el software CLC Main Workbench 6.8 para finalmente obtener las secuencias de los genes.

6.8 Obtención de la secuencia predicha de aminoácidos

A las secuencias nucleotídicas obtenidas del análisis y ensamblaje del resultado de la secuenciación se les realizó un análisis de búsqueda de marco de lectura abierto u ORF (Open Reading Frame) mediante el algoritmo bioinformático ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) que busca en la secuencia de nucleótidos la presencia de codones de inicio y de paro necesarios para su traducción a aminoácidos. De esta forma se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada gen de los diferentes aislados.

6.9 Análisis de la conservación de las proteínas

Para analizar el grado de conservación de las proteínas en los diferentes aislados se realizaron alineamientos múltiples de los distintos aislados de cada proteína utilizando para ello el programa Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) disponible en internet.

6.10 Análisis *in silico* de la estructura secundaria de las proteínas

A cada proteína se le realizó un análisis de estructura secundaria para predecir:

Regiones hidrofóbicas utilizando la herramienta Postscale (web.expasy.org/protscale/) (Gasteiger et al., 2005).

Regiones transmembranales utilizando la herramienta TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) (Krogh et al., 2001).

Presencia de péptido señal utilizando la herramienta SignalP 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (Petersen et al., 2011).

Dominio funcional utilizando las herramientas Pfam (pfam.xfam.org/), SMART (smart.embl-heidelberg.de/) (Finn et al., 2014; Schultz et al., 1998).

De esta forma se identificó la posición de los aminoácidos que constituyen la región extracelular de las proteínas y en qué posición de esta región se encuentra el dominio funcional de cada proteína.

6.11 Predicción y selección de epítomos B conservados

La predicción de epítomos B en las proteínas se realizó con diferentes algoritmos bioinformáticos, la predicción se realizó buscando dentro de la secuencia de aminoácidos extracelular de cada proteína características de un epítomo B como:

Hidrofilicidad: usando el algoritmo del programa BCEpred (www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html).

Antigenicidad: usando el algoritmo de los programas BCEpred (www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html) y Antigenic (emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic).

Epítomo B lineal: usando el algoritmo de los programas ABCpred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) e IEDB (tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input).

Los criterios para la selección de los epítomos fueron:

- La predicción simultánea del epítomo por los diferentes algoritmos.
- Valores altos de predicción de hidrofilicidad, antigenicidad y de epítomo B, los valores que se consideraron fueron los siguientes:

ABCpred: >0.80.

Bcpred:

Antigenicidad >1.

Hidrofilicidad > 1.

Antigenic: >1.100.

IEDB: >1

- Análisis del grado de conservación de aminoácidos de los epítomos en los distintos aislados.

Finalmente se realizó un análisis BLAST en la página del NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y el Instituto Sanger (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina) para confirmar que la secuencia de aminoácidos de los péptidos que contenían los epítomos B conservados tenían 100% de identidad solo con la proteína a la que correspondían.

Los péptidos se sintetizaron en la empresa GL Biochem (Shanghai) Ltd. La síntesis química fue realizada en un sistema de MAPS´8 (Multiple Antigenic Peptide System), este sistema consiste en generar los péptidos en forma de octámeros ramificados para darle mayor inmunogenicidad.

El número de péptidos que fueron enviados a sintetizar fueron:

Cuadro 3. Número de péptidos que contienen epítomos B seleccionados.

Proteína	No. de péptidos	Nombre asignado	Orden de predicción	Secuencia de aminoácidos
AMA-1	5	AMA-1A	1	GSPLESDAINYPCHIDTLG
		AMA-1B	2	CDEDGSAKEGPSSLLCMKPY
		AMA-1C	3	NIVPGSDQRTKYRYPFVYD

		AMA-1D	4	GAGEATERTGGRTAGSKLIP
		AMA-1E	5	TGVCRI LNATPTCLIINAG
SBP4	4	SBP4-A	1	MIHRQTDGCAPRTPVVYTPV
		SBP4-B	2	KLVALIYHDVDGMKEALYHG
		SBP4-C	3	KTIVVDINDVNDNKYLSYE
		SBP4-D	4	RPNKLRHLVWSDTVIHGVG
GP45	5	GP45-1	1	ERAVSGATTHGGDARGVNP
		GP45-CH	2	MHIVSNLLDVEPIVGMYG
		GP45-CS	3	MHIVSKLLDVQPIVGMYG
		GP45-4	4	GFLSTATDVPESDLAKK
		GP45-5	5	NLQMFLKVFYKNKNSPLF

RAP-1α1	6	RAP-T1	1	VNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADD
		RAP-T2	2	FVVSLLKKNVVRDPESNDVENFASQYFYM
		RAP-B1	3	VPSGDSAETEFEVPE
		RAP-B2	4	SSHGDYHHFVVSLLKKNVVRD
		RAPB3	5	VRDPESNDVENF
		RAP-4	6	SAETEFEVPEEQYVDAVTT
MIC-1	3	MIC1-A	1	MIMIDYSSDTNQCLNN
		MIC1-B	2	CSSPTKCAGTAEILKTY
		MIC1-C	3	KNVDQTVIKRLHHKYCGK

6.12 Generación de anticuerpos contra los péptidos

Cada uno de los péptidos conteniendo los epítomos seleccionados fue generado en forma de péptido sintético mediante el sistema de Péptidos Antigénicos Múltiples (MAP) de 8 ramificaciones en la empresa GL Biochem Ltd (Shangai, China).

La inmunización se llevó a cabo en el módulo de cunicultura ubicado en las instalaciones de la Posta Zootécnica de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y zootecnia de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se utilizaron conejos de raza nueva Zelanda de dos meses de edad. Los conejos se mantuvieron en jaulas (2 conejos por jaula) con alimento y agua *ad libitum*.

La dosis que se inmunizó por cada péptido fue administrada en 1ml y contenía:

100 µg de péptido/ 500 µl de PBS1X (13.6 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 8.33 mM NaH₂PO₄, 1.4 mM KH₂PO₄).

500 µl de adyuvante Montanide ISA 71VG (Seppic ®, Francia).

Se inmunizaron dos conejos con cada uno de los péptidos y la inoculación se realizó vía subcutánea depositando la dosis en dos sitios cercanos a ganglio linfático, utilizando una jeringa de 3 ml con aguja de calibre 22.

Previo a la inmunización se emulsificó el péptido contenido en PBS 1X con el adyuvante mezclándolo perfectamente.

La inmunización se llevó a cabo en 2 fases. En la primera, se inocularon los péptidos que corresponden a las proteínas AMA-1 y SBP-4 y en la segunda, se inocularon los que corresponden a las proteínas de GP45, RAP-1 y MIC1.

Cuadro 4. Calendario de inoculación de los péptidos de las proteínas AMA-1 y SBP-4.

Día	No. de inmunización	Actividad	Fecha
0	1	Toma de suero pre-inmunización.	20-Dic-2013

14	2		3-Ene-2014
28	3		17-Ene-2014
42	4		31-Ene-2014
		Sangrado final*	10 Feb-2014
56	5*		14-Feb-2014
60	6*		28-Feb-2014
		Sangrado final	9-Mar-2014.

*Solo algunos conejos.

Cuadro 5. Calendario de inoculación de los péptidos de las proteínas GP45, RAP-1α1 y MIC-1.

Día	No. de inmunización	Actividad	Fecha
0	1	Toma de suero pre-inmunización.	13-Mar-2014
14	2		27-Mar-2014
28	3		10-Abr-2014
42	4		24-Abr-2014
56	5		8-May-2014
60	6		22-May-2014
		Sangrado final*	2-Jun-2014
		Sangrado final*	4-Jun-2014
74	7*		5-Jun-2014
		Sangrado final	13-Jun- 2014.

*Solo algunos conejos

La evaluación de la presencia de anticuerpos específicos generados en los conejos para decidir el momento de sangrado final se realizó mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Para ello, a partir de la tercera inmunización en los primeros conejos inmunizados con SBP-4 y AMA-1 se tomó una muestra de sangre de la vena auricular (aproximadamente 1 ml). El suero fue separado mediante centrifugación a 1, 400 × g por 15 minutos y posteriormente envasado en tubos de 0.6 ml en cantidades de 100 y 200 µl para ser almacenados a -20 °C hasta su uso.

En los conejos inmunizados con los péptidos AMA-1A, AMA-1D, AMA-1E y SBP4-B la obtención del suero (sangrado final) se realizó 10 días después de la cuarta inmunización.

Los demás sueros que correspondían a los péptidos restantes de AMA-1 y SBP4 se obtuvieron 10 días después de la sexta inmunización.

Los sueros fueron separados mediante centrifugación a 1400 × g por 15 minutos y posteriormente fueron envasados en tubos de 600 µl y almacenados a -20°C.

En los conejos inmunizados con los péptidos de GP45, RAP-1 y MIC-1 Se realizó el sangrado final en casi la totalidad de los conejos a los días 11 y 13 después de la sexta inmunización.

Solo en 3 conejos que correspondían a péptidos MIC1-B, RAP-B1 y RAP-B3 se realizó el sangrado final 8 días después de la séptima inmunización.

Los sueros de estos conejos fueron procesados de la misma forma que los del primer lote de conejos inmunizados.

6.13 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos

Una vez que se tuvo la totalidad de los sueros de los conejos inmunizados con los diferentes péptidos se evaluó la especificidad de los anticuerpos generados contra las proteínas, utilizando para ello antígeno nativo de *B. bigemina*.

6.13.1 Obtención y procesamiento de eritrocitos infectados

Para obtener el antígeno necesario para los experimentos de Inmunofluorescencia indirecta e Inmunolectrotransferencia fue necesario infectar un bovino con *B. bigemina*.

Para esto se esplenectomizó un bovino y se le inoculó sangre infectada con *B. bigemina* cepa Chiapas con una dosis de inoculación de 1×10^8 eritrocitos infectados. Para el procedimiento se utilizó un vial con 5 ml de sangre infectada que se encontraba a -196°C . El vial se dejó descongelar y se pasaron los 5 ml de sangre infectada a una jeringa de 20 ml. La inoculación se realizó vía venosa en la yugular utilizando una aguja de calibre 21. Se mezclaron los 5 ml de sangre infectada con 15 ml de sangre que se retiraron al momento de puncionar la yugular del bovino para tener un volumen final de 20 ml y así aplicar 15 ml de este volumen vía intravenosa y los 5 ml restantes vía intramuscular.

Posteriormente se monitoreó al bovino a partir del tercer día post-inoculación. El monitoreo consistió en la toma de la temperatura rectal y de una muestra de sangre con anticoagulante para realizar frotis sanguíneo y poder determinar el porcentaje de eritrocitos infectos (PEI). Cuando ésta fue superior al 2% se obtuvo sangre infectada del bovino mediante la punción de la vena yugular utilizando para ello un matraz estéril con perlas de vidrio, estas se utilizaron para poder desfibrinar la sangre al momento de retirarla mediante la agitación del matraz para permitir el movimiento de las perlas y el aglutinamiento y separación de la fibrina.

La sangre infectada obtenida se colocó en tubos polipropileno de 50 ml estériles y se centrifugó a 2740 × g durante 20 minutos a 4°C, después se retiró el suero separado durante la centrifugación, así como también se retiró la capa leucocitaria que contenía las células blancas observadas en la separación por la centrifugación. Posteriormente el paquete de células rojas infectadas con *B. bigemina* concentrado en el fondo del tubo se lavó con solución VYM (Vega *et al.*, 1985) tres veces, centrifugando a 2740 × g durante 20 minutos a 4°C.

Después del tercer lavado, se resuspendieron los eritrocitos infectados en solución VYM para realizar los frotis en portaobjetos de vidrio y para almacenar en congelación a -20°C para procesar el antígeno posteriormente y obtener las proteínas del parásito.

6.13.2 Inmunofluorescencia indirecta

Mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta se evaluó la capacidad de localizar las proteínas específicas en el tejido nativo.

La realización de la técnica fue la siguiente:

Como antígeno se utilizaron un frotis de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, que se encontraban almacenados a -20°C.

- Se descongelaron e inmediatamente se secaron las laminillas conteniendo el antígeno en una campana de flujo laminar durante 30 minutos.
- Posteriormente se permeabilizó las membranas de los eritrocitos sumergiendo las laminillas en acetona a 4°C durante 30 minutos.
- Después de ese tiempo se dejaron secar nuevamente y se realizó el enmarcado circular con esmalte de uñas de los pozos donde se depositarían los sueros.
- Se realizó un bloqueo inicial agregando a cada pozo 30µl de suero de burro al 5% diluido en PBS 1X (18.8mM KH₂PO₄, 67.1mM NaHPO₄, 150 mM

NaCl. Ph 7.2) seguido de una incubación en una cámara húmeda a 37°C durante 10 minutos.

- Posteriormente, las laminillas fueron sumergidas brevemente en PBS 1X Tween 0.01% y se dejaron secar.
- El anticuerpo primario (sueros post-inmunización de los conejos) fue diluido en solución de bloqueo, tanto los sueros pre-inmunización como los post-inmunización se diluyeron 1:20. El anticuerpo secundario IgG de burro anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488® (Jackson ImmunoResearch, USA) fue utilizado a una dilución de 1:100 en solución de bloqueo.
- Se utilizó también un suero como control positivo el cual era un suero de conejo hiperinmune específico contra una proteína de las roptrías de *B. bigemina*, así como también un control negativo, los cuales fueron diluidos igualmente que el suero de los conejos a probar.
- Se agregaron 30µl de la dilución 1:20 a cada pozo de los sueros.
- Se incubaron las laminillas en una cámara húmeda a 37°C por 30 min.
- Después se realizaron tres lavados con PBS 1X Tween 0.01% (18.8mM KH₂PO₄, 67.1mM NAHPO₄, 150 mM NaCl, Tween20 0.01%) por 5 minutos cada uno en un agitador a 240 rpm (IKA® KS 130 Basic).
- Se secaron nuevamente las laminillas y se agregaron 30µl de anticuerpo secundario diluido 1:100 y se incubaron nuevamente en la cámara húmeda a 37°C por 30 minutos.
- Se realizaron tres lavados con PBS 1X Tween 0.01% y uno con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno en un agitador a 240 rpm.
- Finalmente se dejaron secar las laminillas.
- Para la lectura se agregó glicerina fosfatada (1: 9 Glicerina:PBS 1X) en cada uno de los pozos.
- Se observó en un microscopio de fluorescencia de la marca Leica modelo DM2500 con objetivo de 100x, utilizando un filtro luz para 480nm de longitud de onda.

6.12.2 Inmunoelectrotransferencia

Para realizar la inmunodetección por el peso molecular de las proteínas con los diferentes anticuerpos generados por la inmunización con los péptidos se utilizaron las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e Inmunoelectrotransferencia.

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron eritrocitos infectados con *B. bigemina* de la cepa Chiapas con un PEI del 3%. Se utilizó un volumen de 5 ml de eritrocitos infectados que se colocó en un tubo polipropileno de 50 ml. El paquete celular fue concentrado inicialmente mediante centrifugación de 1, 400 gravedades por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante dejando solo el paquete de células infectadas en el fondo del tubo. Se agregaron 15 ml de PBS 1X y se homogenizó la muestra para realizar la lisis y el lavado de los eritrocitos infectados. Se realizó una primera centrifugación de 1, 400 gravedades por 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, posteriormente se agregó la misma cantidad de PBS 1X y se realizó otra centrifugación. Después de eliminar el sobrenadante, el pellet celular concentrado en el fondo del tubo se dejó a -20°C durante 12 horas para favorecer la lisis de los eritrocitos. Posteriormente se continuó realizando tres lavados con PBS 1X a la misma velocidad de centrifugación hasta que finalmente, después del tercer lavado, el pellet celular se resuspendió en 5 ml de PBS1X. Se agregó un inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets-ROCHE) para evitar la degradación proteica de los parásitos y se alicuotó en tubos de 600 µl y finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

Las proteínas del pellet celular fueron separadas en geles de poliacrilamida del sistema Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels de 4-20% y del 10% para las proteínas RAP-1α1, GP45, AMA-1, SBP-4 y MIC1 y también se prepararon geles que contenían un gel concentrador con el 5% de poliacrilamida y un gel separador que contenía el 10% de poliacrilamida, cada uno con las siguientes cantidades de reactivos necesarios:

Cuadro 6. Reactivos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivo	Gel separador 10% (μl)	Gel concentrador 5% (μl)
Agua destilada	1, 900 μ l	680 μ l
Acrilamida 30% ((acrilamida 29,2 % y N,N'-metil bisacrilamida 0,8 %, BioRad)	1, 700 μ l	170 μ l
Bufér Tris-HCl 1.5M Ph 8.8	1, 300 μ l	
Bufér Tris-HCl .5M Ph 6.8		130 μ l
SDS 10% (Dodecilsulfato sódico)	50 μ l	10 μ l
APS 10% (Persulfato de amonio, Bio Rad)	50 μ l	10 μ l
TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina, Bio Rad)	2 μ l	1 μ l
Total	5, 0002 μl	1, 0001 μl

Para separar la muestra de proteínas en los geles de poliacrilamida, ésta se preparó utilizando β -mercapetanol y bufer de carga Laemmli 2X, (Bio Rad, California-USA) (65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% (w/v) glicerol, 0.01% azul de bromofenol). Se utilizaron 200 μ l de eritrocitos infectados y se mezclaron con 200 μ l de búfer de carga que contenía 10 μ l de β -mercaptoetanol y 190 μ l de bufer Laemmli 2X. Esta muestra preparada en tubos de 600 μ l se colocó en agua hirviendo durante 10 minutos.

A los geles de poliacrilamida se les retiraron los pozos donde se coloca muestra a separar, dejando solamente un pozo para el marcador de peso molecular.

El gel fue montado en la cámara de electroforesis y se depositaron los 400 μ l de la muestra, preparada y previamente hervida en el área donde se retiraron los pozos y en el pozo que quedó se depositó 5 μ l del marcador de peso molecular y posteriormente se agregó el búfer de corrida (25mM Tris Base, 200mM Glicina, 3.5mM SDS , Ph 8.3) al nivel correspondiente en la cámara para iniciar la separación proteica. Las muestras se corrieron durante 90 minutos a 110 V y 125 minutos a 110 V, la primera velocidad para los geles precast y la segunda para los geles al 15% de poliacrilamida.

Se uso marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards y el Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ de Bio Rad (California, USA).

Después de la separación electroforética de las proteínas se realizó la transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa. Para esto, antes de armar el casete de transferencia, se retiró el gel de los cristales y se lavó con agua destilada durante 5 minutos en agitación, posteriormente se equilibró en búfer de transferencia (25 mM Tris base, Glicina 200mM, Metanol 20%, pH 8.3) el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa (Bio Rad, California-USA) junto con el papel filtro cortado al mismo tamaño que el gel de poliacrilamida durante 15 minutos.

Después de lo anterior se procedió a armar el casete de transferencia, realizándose esto sobre un recipiente que contenía búfer de transferencia. Primero se colocó

sobre la parte blanca del casete la esponja, en seguida el papel filtro y sobre el papel filtro la membrana de nitrocelulosa. A continuación se colocó sobre la membrana, el gel de poliacrilamida que contenía las proteínas separadas procurando evitar la formación de burbujas entre estos dos componentes, después se colocó el papel filtro encima del gel y finalmente otra esponja que coincidiría con la parte negra del casete y así poder cerrar el casete de transferencia. Después se colocó en la cámara de transferencia y se agregó búfer al nivel correspondiente. La transferencia se realizó a 4°C a 100 V durante 1 hora.

Terminado el tiempo de la transferencia y con objeto de observar las proteínas separadas transferidas a la membrana, el resultado se verificó utilizando una tinción reversible de la membrana de nitrocelulosa con solución Rojo de Ponceau (Rojo ponceau 0.01%, Ácido acético 5%).

Después se lavó la membrana de nitrocelulosa con TBS 1X (10mM Tris Base, 150mM NaCl) dos veces durante 10 minutos en agitación para eliminar la tinción del Rojo de Ponceau, para finalmente dejar bloqueando la membrana en solución de bloqueo al 5% (TBS 1X, leche descremada 5%) durante toda la noche a 4°C en agitación a 240 rpm.

Para la Inmunoelctrotransferencia se utilizaron diluciones 1:800 y 1:400 del anticuerpo primario (sueros pre y post- inmunización). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, USA) a una dilución 1:1000. Las diluciones fueron preparadas utilizando TTBS 1X (TBS 1X, Tween20 0.05%).

Después de la incubación en solución de bloqueo, la membrana se lavó dos veces en agitación con TTBS 1X durante 20 minutos a 400 rpm y un lavado adicional con TBS1X a la misma velocidad durante 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa fue cortada verticalmente en tiras para utilizar cada una para diferente muestra de suero (pre y post-inmunización).

Se utilizó un volúmen final de 7 ml de anticuerpo primario diluido contenido en tubos falcon de 15 ml y en cada uno se colocó cada una de las tiras de la membrana.

La incubación de las membranas con el anticuerpo primario contenido en tubos de polipropileno se realizó durante una hora a temperatura ambiente en agitación a una velocidad de 240 rpm (IKA ® KS 130 Basic).. Después de esta incubación se realizaron tres lavados a las tiras de membrana contenidas en los tubos falcon, dos se realizaron con TTBS 1X durante 20 minutos y uno con TBS 1X durante 10 minutos en agitación a una velocidad de 400 rpm. Posteriormente se juntaron las tiras de la membrana en un solo tubo de polipropileno de 50 ml que contenía 7 ml de anticuerpo secundario y se realizó la segunda incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación a 240 rpm. Después de la incubación se realizaron los mismos lavados a las tiras de la membrana con el mismo tiempo y velocidad que los anteriores.

Se preparó el búfer para el sustrato revelador a emplear para la inmunodetección (Tris HCl 100 mM, Na Cl 150 mM, Mg Cl₂ 1 mM, pH 9.0).

A este búfer se le agregó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) en combinación con nitro blue tetrazolium (NBT) (Madison, Wisconsin, USA). Se prepararon 10 ml de búfer para revelar las tiras de membrana de nitrocelulosa utilizadas en los Western blots, agregando 66 µl de 50 mg/ml NBT y 33 µl de 50 mg/ml BCIP.

La inmunodetección se realizó colocando las membranas que correspondían al suero pre y post de cada conejo en el sustrato revelador al mismo tiempo. Las membranas se incubaron hasta observar una banda coloreada púrpura que perteneciera a la proteína correspondiente, producto de la reacción de la enzima conjugada al anticuerpo secundario con el sustrato e inmediatamente se detenía la reacción lavando la membrana con agua destilada.

6.13 Identificación de una proteína homóloga a MIC-1 de *Babesia bovis* en el genoma de *B. bigemina*.

Con base en la secuencia de la proteína reportada en la base de datos de MIC-1 de *B. bovis*, se realizó un BLAST en el genoma de *B. bigemina* que se encuentra anotado en la página web del Instituto Sanger (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina). Se identificó un contig que contenía una similitud elevada a la secuencia de *B. bovis* y se le realizó una búsqueda de ORF (Marco de lectura abierto) con el algoritmo ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>).

Posteriormente, se confirmó la presencia de intrones en la secuencia mediante el algoritmo GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) y entonces se localizó una secuencia de nucleótidos con un codón de inicio y codón final que codifica para una proteína de 445 aminoácidos y que al hacerle un análisis de su estructura secundaria reveló la presencia de un péptido señal y un dominio de unión al ácido siálico, resultado que coincide con las características de la proteína MIC-1 en *Toxoplasma gondii*.

Sin embargo, las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos obtenidas de MIC-1 de *B. bigemina* en este trabajo solamente comprenden el dominio funcional de la proteína y no en su totalidad.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención de la secuencia predicha de las proteínas.

7.1.1 Obtención de las secuencias en la base de datos.

En el cuadro 7 se muestran los números de acceso de las secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos Protein.

Proteína	Números de acceso
AMA-1	BAH22706- <i>B. bigemina</i> Argentina.
	AET36930- <i>B. bigemina</i> Corrientes, Argentina.
	ACT46060- <i>B. bigemina</i> ITA1, Italia.
	ACT46061- <i>B. bigemina</i> ITA2, Italia.
	ACT46062- <i>B. bigemina</i> ITA2, Italia.
	ADP02973- <i>B. bigemina</i> ITA4PG, Italia.
	ADP02974- <i>B. bigemina</i> ITA5RG, Italia.
	ADP02975- <i>B. bigemina</i> ITA6PA, Italia.
	ADP02976- <i>B. bigemina</i> ITA7PA, Italia.
	ADP02977- <i>B. bigemina</i> ITA8CT, Italia.
	AET36928- <i>B. bigemina</i> M1A, Argentina.
	AET36927- <i>B. bigemina</i> M1P, Argentina.

	<p>AET36929- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>AET36931- <i>B. bigemina</i> Río Grande da Sur, Brasil.</p> <p>AET36926- <i>B. bigemina</i> S3P, Argentina.</p> <p>AET36932- <i>B. bigemina</i> Turquía.</p>
<p>GP45</p>	<p>AGU67944- <i>B. bigemina</i> Sudáfrica.</p> <p>AEJ89909- <i>B. bigemina</i> Guerrero, México.</p> <p>AEJ89910- <i>B. bigemina</i> Jalisco, México.</p> <p>AGU67947- <i>B. bigemina</i> Sudáfrica.</p> <p>AGU67946- <i>B. bigemina</i> Sudáfrica.</p> <p>AGU67945- <i>B. bigemina</i> Sudáfrica.</p> <p>AEJ89912- <i>B. bigemina</i> Seed.</p> <p>AEJ89907- <i>B. bigemina</i> Veracruz, México.</p> <p>AAG28759- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>AEJ89911- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>AAG28757- <i>B. bigemina</i> México.</p>

	<p>AEJ89908- <i>B. bigemina</i> Argentina.</p> <p>AEJ89906- <i>B. bigemina</i> Nayarit, México</p>
RAP-1 α1	<p>AAA65583</p> <p>1906304A</p> <p>M85187- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>M85186- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>M85185- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>M85184- <i>B. bigemina</i> México.</p> <p>AAG14909- <i>B. bigemina</i> Puerto Rico.</p> <p>AAG14908- <i>B. bigemina</i> Puerto Rico.</p> <p>AAG14906- <i>B. bigemina</i> Texcoco, México.</p> <p>AAG14907- <i>B. bigemina</i> UYA.</p> <p>AAG14905- <i>B. bigemina</i> S2P, Argentina.</p> <p>AAG14904- <i>B. bigemina</i> S1A, Argentina.</p> <p>AAG14903- <i>B. bigemina</i> CGP.</p> <p>AAG14902- <i>B. bigemina</i> CGA.</p>

SBP-4	AGC12840- <i>B. bigemina</i> S3P Salta, Argentina.
	AGC12832- <i>B. bigemina</i> M1A Corrientes, Argentina.
	AGC12833- <i>B. bigemina</i> M1P Corrientes, Argentina.
	AGC12834- <i>B. bigemina</i> M2P Corrientes, Argentina.
	AGC12835- <i>B. bigemina</i> M30 Corrientes, Argentina.
	AGC12836- <i>B. bigemina</i> México.
	AGC12838- <i>B. bigemina</i> S2A Salta, Argentina.
	AGC12839- <i>B. bigemina</i> S2P Salta, Argentina.
	AGC12829- <i>B. bigemina</i> B38 Salta, Argentina.
	AGC12837- <i>B. bigemina</i> S1A Salta, Argentina.
	AGC12830 - <i>B. bigemina</i> Brasil.
AGC12831- <i>B. bigemina</i> Colombia.	

7.1.2 Amplificación de los genes en el DNA de los distintos aislados de *B. bigemina*.

Se obtuvo un amplicon de cada uno de los genes con los iniciadores diseñados para cada uno de ellos y utilizando como molde el DNA genómico de *B. bigemina* de los distintos aislados, extraído de sangre infectada o garrapatas *R. microplus* infectadas.

Para el caso del gen *rap1- α 1* se obtuvo un amplicón de 1634pb que corresponde al tamaño que se espera para este gen (Figura 5).

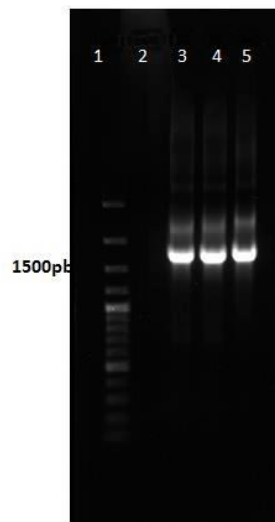


Figura 5. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen *rap1- α 1*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular, Carril 2: control negativo. Carril 3: DNA del aislado de Martínez de la Torre, Veracruz. Carril 4: DNA del aislado de Rio Grande, Brasil. Carril 5: DNA del aislado de Rondonia, Brasil.

En la electroforesis en gel de agarosa del producto de la reacción de PCR con los iniciadores para *mic-1* utilizando DNA de distintos aislados, se obtuvo un amplicón de 361pb que corresponde al tamaño esperado de amplificación con los iniciadores específicos (Figura 6).

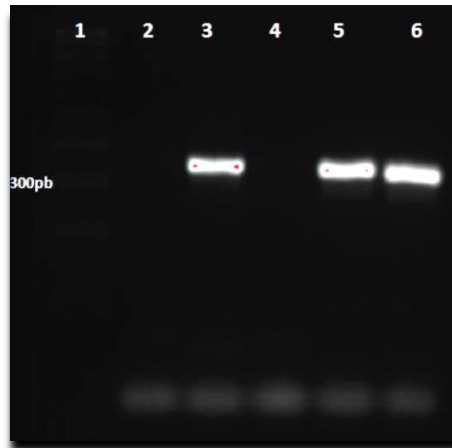


Figura 6. Electroforesis de gel de agarosa al 2% para el gen *mic-1*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular, Carril 2: control negativo. Carriles 3: DNA de la cepa Cintalapa, Chiapas. Carril 5: DNA del aislado de Rio Grande, Brasil. Carril 6: DNA del aislado de Rondonia, Brasil.

Para la reacción de PCR con iniciadores para *gp45* utilizando DNA de *B. bigemina* de la cepa Chiapas se obtuvo un amplicón de 1229pb que corresponde al tamaño esperado para este gen (Figura 7).



Figura 7. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen *gp45*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carril 2: DNA de la cepa Cintalapa, Chiapas.

7.1.3 Clonación, transformación de células competentes y escrutinio de colonias.

Los productos de PCR de los genes *rap-1 α 1* y *mic1* se clonaron en el vector pENTR y los de los genes *ama-1* y *gp45* en el vector TOPO TA, con los vectores recombinantes se realizó la transformación de las células One Shot TOP10 *E. coli* competentes.

Las colonias que crecieron en las placas LB/Kanamicina- ampicilina que contenían el plásmido con el gen *rap-1 α 1* se evaluaron mediante PCR de colonia utilizando iniciadores M13 específicos para el plásmido e iniciadores para el gen (figura 8). Utilizando los iniciadores para ese gen se obtuvo un amplicón de 1634pb.

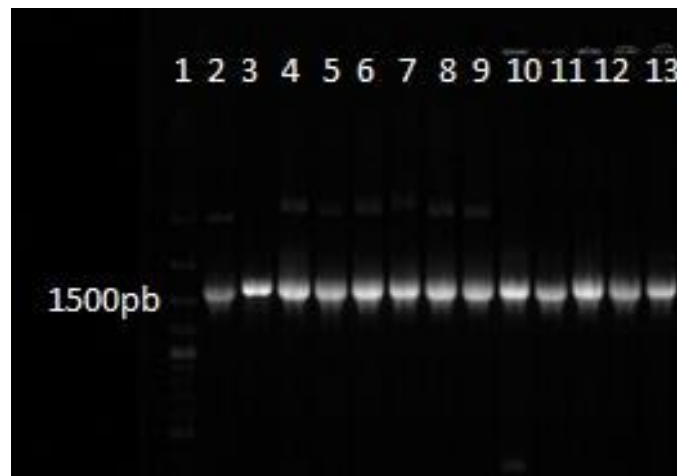


Figura 8. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del producto de PCR a partir de las colonias transformadas con el plásmido conteniendo el gen *rap1- α 1*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carriles 2-5: Aislado de Veracruz. Carriles 6-9: Aislado de Rio Grande. Carriles 10-13: Aislado de Rondonia.

En la PCR de los plásmidos purificados de las colonias que contenían el inserto de *gp45*, se obtuvo un amplicón de 1229 pb utilizando iniciadores específicos para el gen en dos de las colonias analizadas (Figura 9).

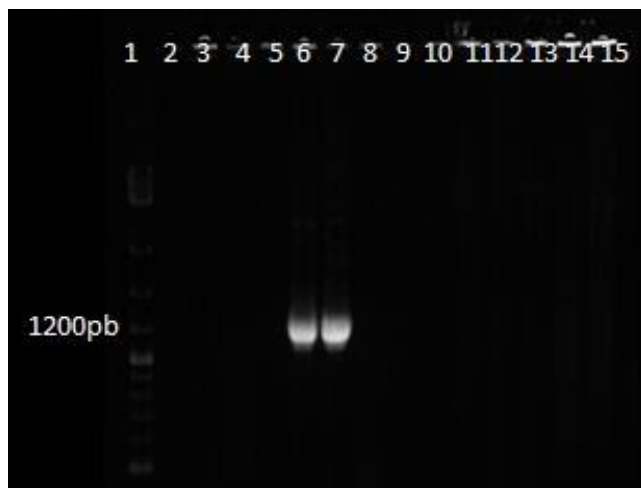


Figura 9. Electroforesis de gel de agarosa al 1% del producto de PCR a partir de las colonias transformadas con el plásmido conteniendo el gen *gp45*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular, Carril 2: control negativo. Carriles 3-15: Producto de PCR de distintas colonias.

7.1.4 Secuencias nucleotídicas obtenidas.

Se obtuvieron trece secuencias en total para cuatro de los genes de *B. bigemina* utilizados en este trabajo, como se muestra en el cuadro 8.

Las secuencias en formato FASTA se muestran en el anexo 1.

Cuadro 8. Nombre de los aislados de los que se obtuvieron las secuencias nucleotídicas para cada uno de los genes mediante PCR y secuenciación.

Gen	Aislado
<i>ama-1</i>	Cintalapa, Chiapas.

<i>gp45</i>	Cintalapa, Chiapas.
<i>rap-1 α1</i>	Cintalapa, Chiapas. Martínez de la Torre, Veracruz. Tamasopo, San Luis Potosí. Río Grande, Brasil. Rondonia, Brasil.
<i>mic-1</i>	Cintalapa, Chiapas. Martínez de la Torre, Veracruz. Tamasopo, San Luis Potosí. Soto La Marina, Tamaulipas. Río Grande, Brasil. Rondonia, Brasil.

Se obtuvo la predicción de la secuencia de aminoácidos para cada una de las secuencias generadas. En el cuadro 9 se muestra el número predicho de aminoácidos para cada una de las proteínas.

Cuadro 9. Número de aminoácidos predicho para cada una de las proteínas.

Gen	Nucleótidos	Aminoácidos
<i>ama-1</i>	1788	595

<i>gp45</i>	1058	351
<i>rap-1 α1</i>	1440	480
<i>mic-1</i>	261	88

7.2 Análisis de la conservación de las proteínas.

El resultado del análisis del grado de conservación de las secuencias de aminoácidos se muestra en el cuadro 10, así como también se muestra el número total de secuencias utilizadas en este trabajo para cada una de las proteínas.

Los alineamientos a nivel de nucleótidos y aminoácidos se muestran en el anexo 2.

Cuadro 10. Porcentaje general de conservación de las secuencias de aminoácidos de los diferentes aislados para cada una de las proteínas.

Proteína	No. de aislados	% de conservación
AMA-1	18	>97 %
GP45	15	>93 %
RAP-1 α1	19	>91 %

MIC-1	7	>97 %
SBP-4	16	>98 %

7.3 Análisis de la estructura secundaria de las proteínas.

7.3.1 Proteína AMA-1

El análisis de hidrofobicidad con la herramienta bioinformática ProtScale mostró dos regiones con valores superiores a 1.6 que predicen regiones hidrofóbicas en la proteína AMA-1, y que están localizadas en los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína (Figura 10).

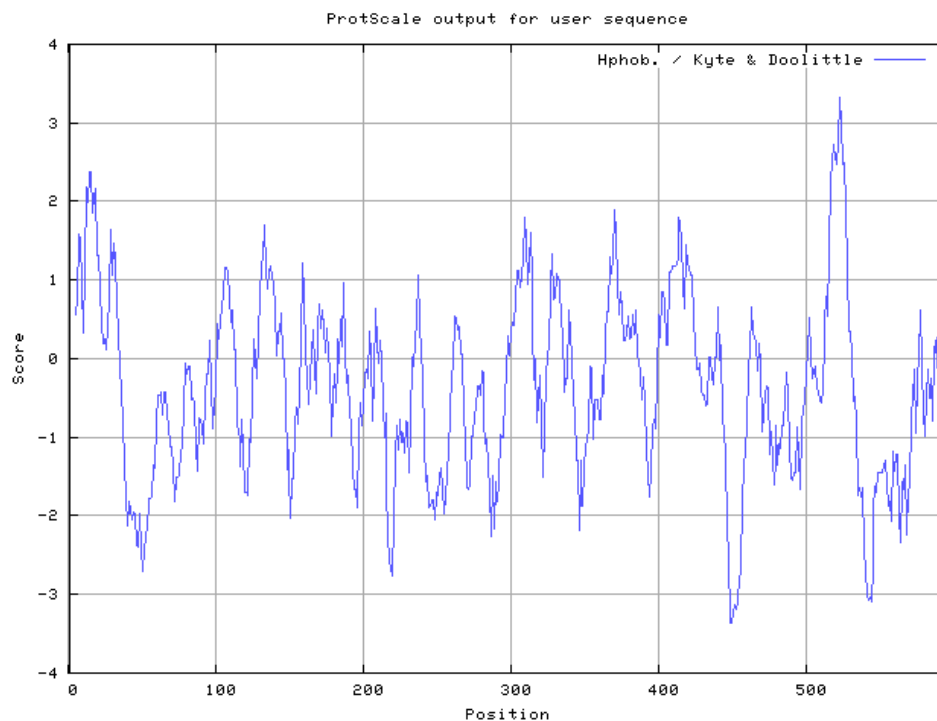


Figura 10. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína AMA-1 con el programa ProtScale.

Mediante el algoritmo TMHMM se identificó una región transmembranal en la secuencia de aminoácidos de AMA-1 marcada en color rojo en la figura 11 y localizada entre los aminoácidos 513-531. Los aminoácidos 532-595 corresponden a la región intracelular marcados en color azul. El color rosa indica la región extracelular de la proteína.

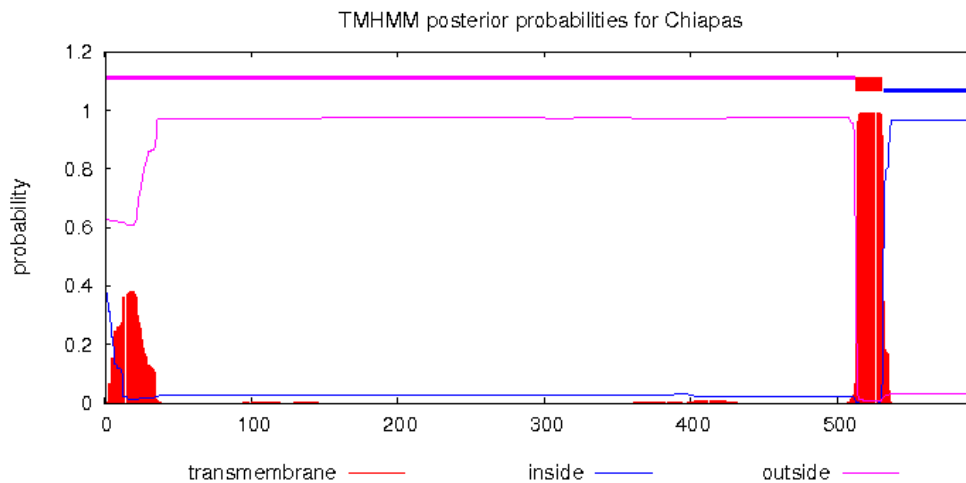
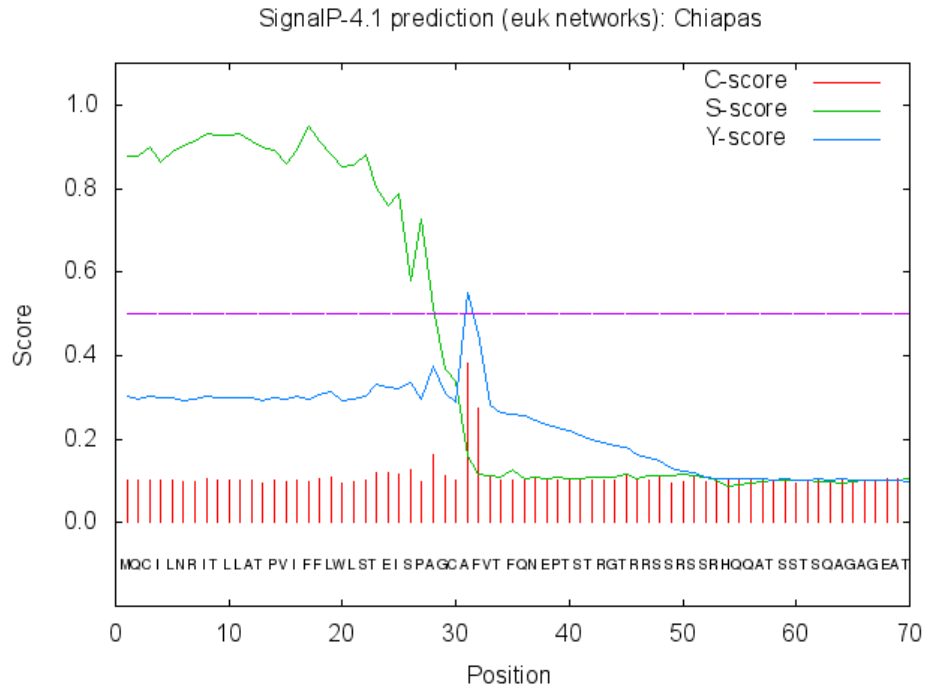


Figura 11. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína AMA-1 con el programa TMHMM 2.0.

Utilizando el algoritmo SignalP 4.1 se identificó un péptido señal en la proteína. El resultado mostrado en la figura 12 indica un sitio de corte de péptido señal (línea verde) dentro de los primeros 30 aminoácidos con un valor de predicción cercano a 1, que es el más alto posible.



. **Figura 12.** Análisis de predicción de péptido señal en la proteína AMA-1 con el programa SignalP 4.1.

7.3.2 Proteína SBP-4

El análisis de hidrofobicidad para la proteína SBP-4 se hizo mediante el programa ProtScale y se muestra en la figura 13. Se indica la presencia de una región de aminoácidos hidrofobicos, posicionados en el extremo amino terminal de la proteína.

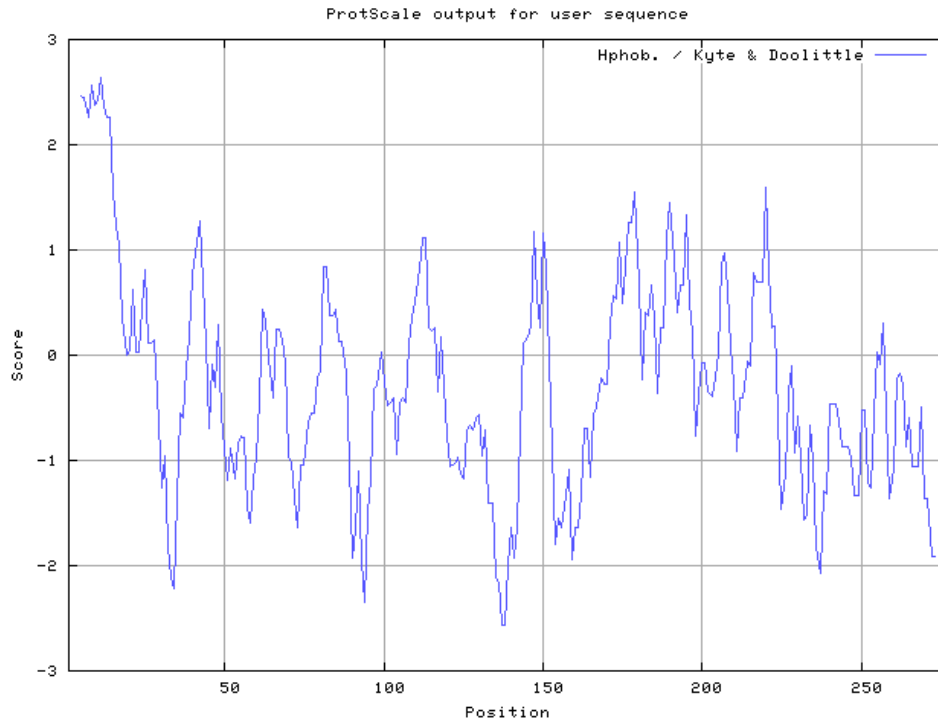


Figura 13. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína SBP-4 con el programa ProtScale.

El resultado de análisis de dominios, indicó que no existen dominios de este tipo en esta proteína (Figura 14).

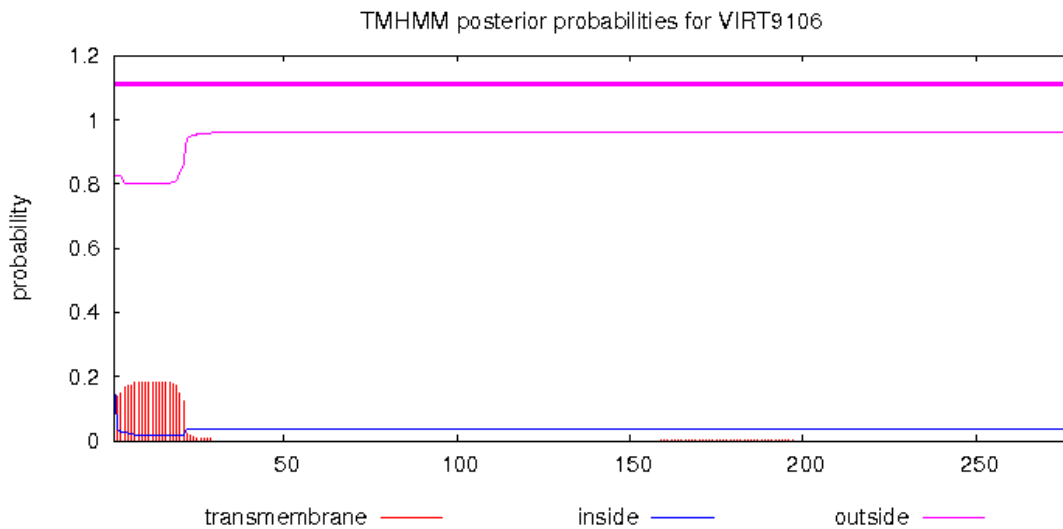


Figura 14. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína SBP-4 con el programa TMHMM 2.0.

Los resultados del análisis de la presencia de péptido señal mediante el algoritmo SignalP 4.1 indicaron la predicción de un sitio de corte de péptido señal para esta proteína entre los aminoácidos 20 y 21 (Figura 15).

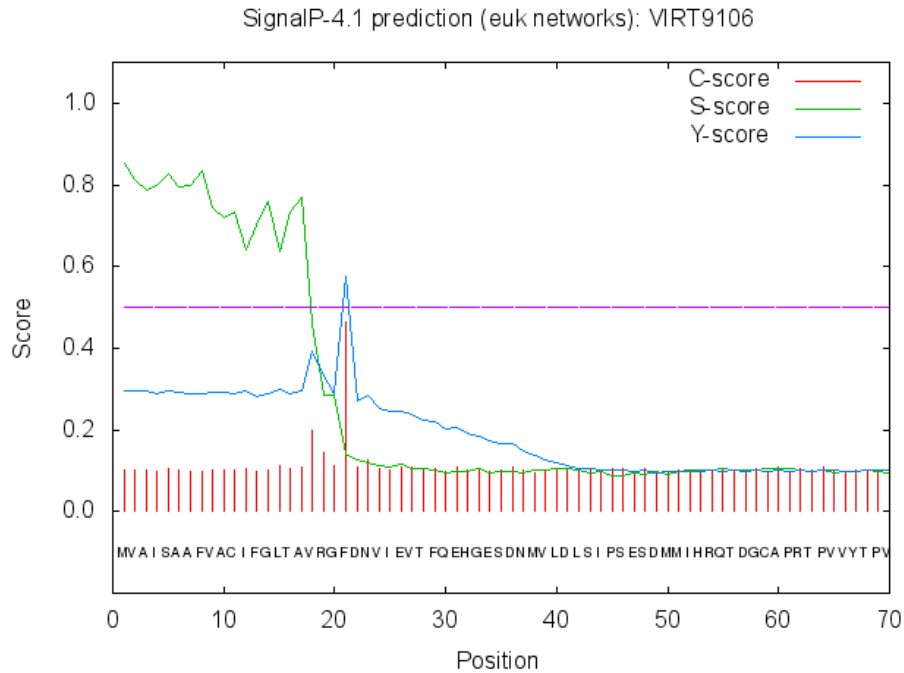


Figura 15. Análisis de predicción de péptido señal en la proteína SBP-4 con el programa SignalP 4.1.

7.3.3 Proteína GP45

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de GP45 mostró la presencia de dos regiones hidrofóbicas, una posicionada en el extremo amino terminal y la segunda en el extremo carboxilo terminal (Figura 16).

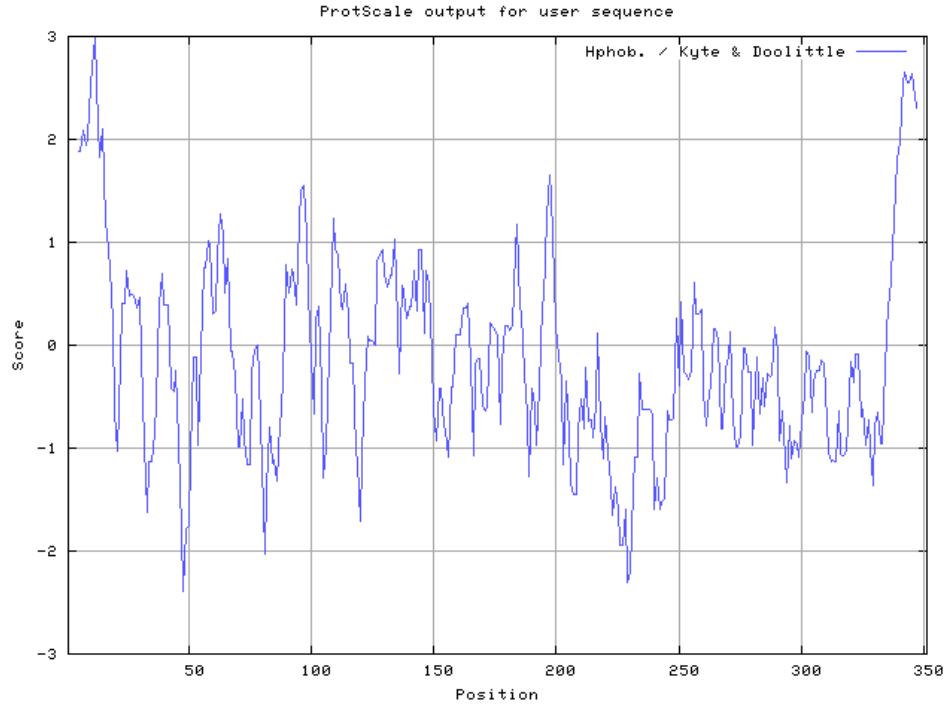


Figura 16. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína GP45 con el programa ProtScale.

El análisis de predicción de regiones transmembranales no indicó la presencia de ninguna región de este tipo (Figura 17).

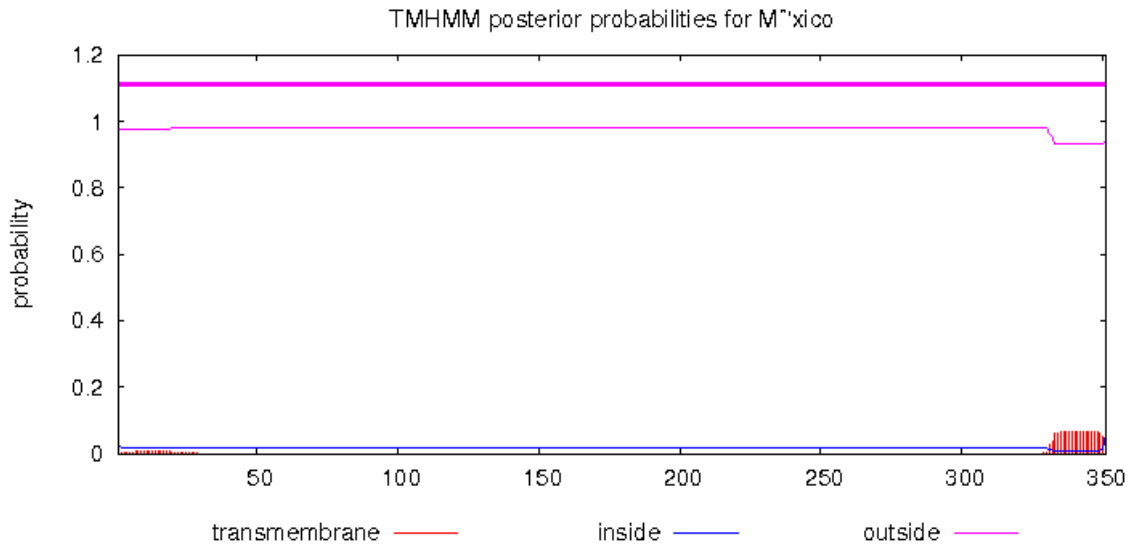


Figura 17. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína GP45 con el programa TMHMM 2.0.

El análisis de predicción de péptido señal indicó la presencia de un péptido señal para GP45, localizando un sitio de corte de péptido señal entre los aminoácidos 20 y 21 (Figura 18).

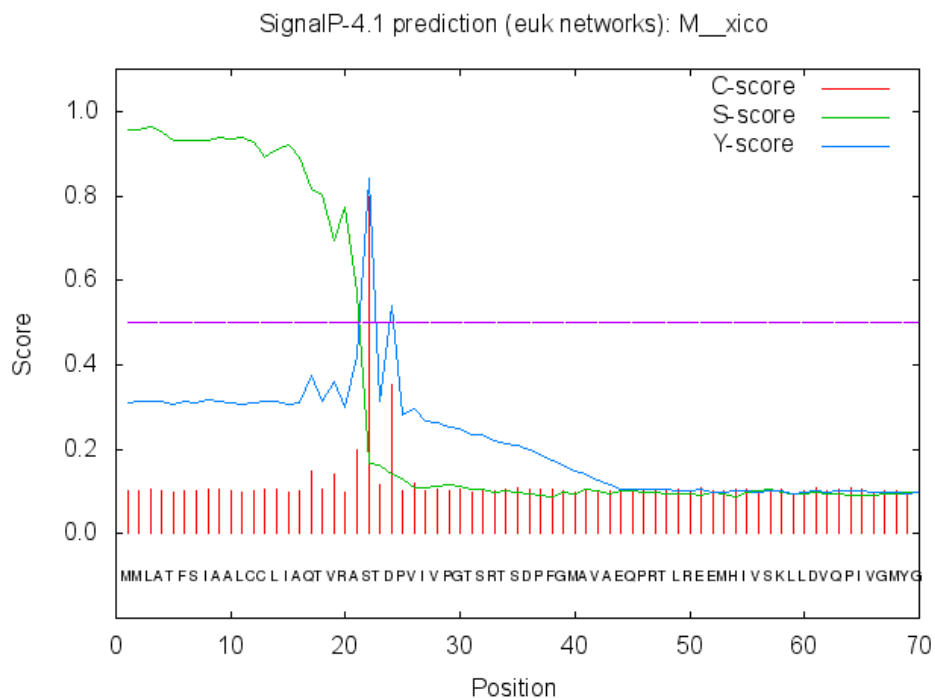


Figura 18. Análisis de predicción de péptido señal en la proteína GP45 con el programa SignalP 4.1.

7.3.3 Proteína RAP-1 α 1.

El análisis de hidrofobicidad mediante el programa Protscale mostró la presencia de una región hidrofóbica en la proteína ubicada en el extremo amino terminal (Figura 19).

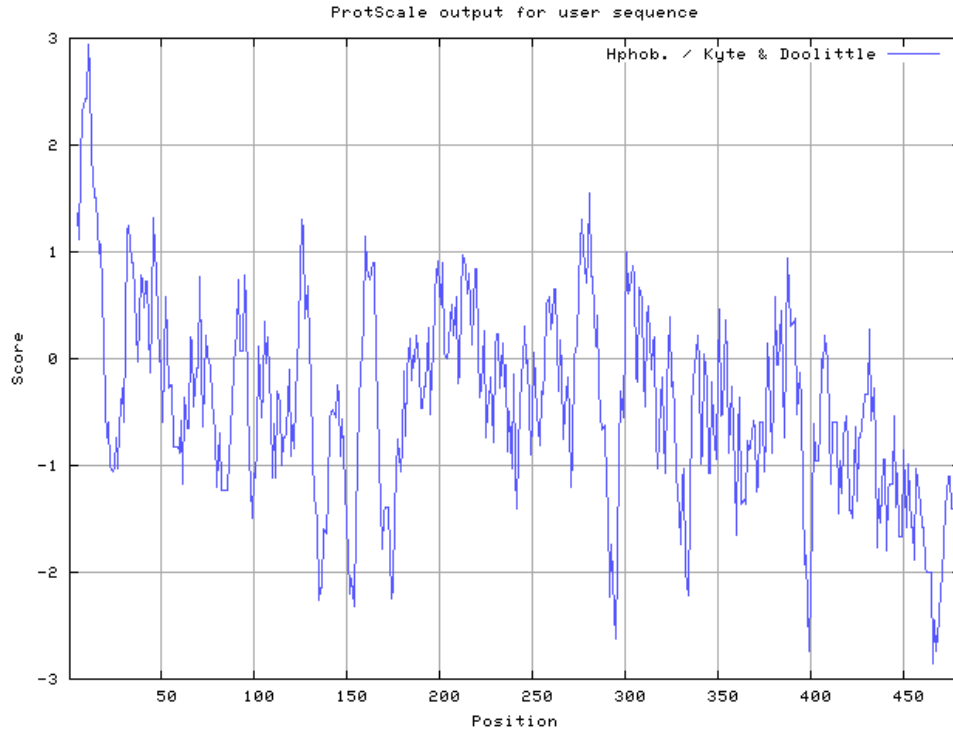


Figura 19. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de proteína RAP-1 α 1 con el programa Protscale.

En el análisis de predicción de dominios transmembranales no se logró identificar una estructura de este tipo en la proteína RAP-1 α 1 (Figura 20).

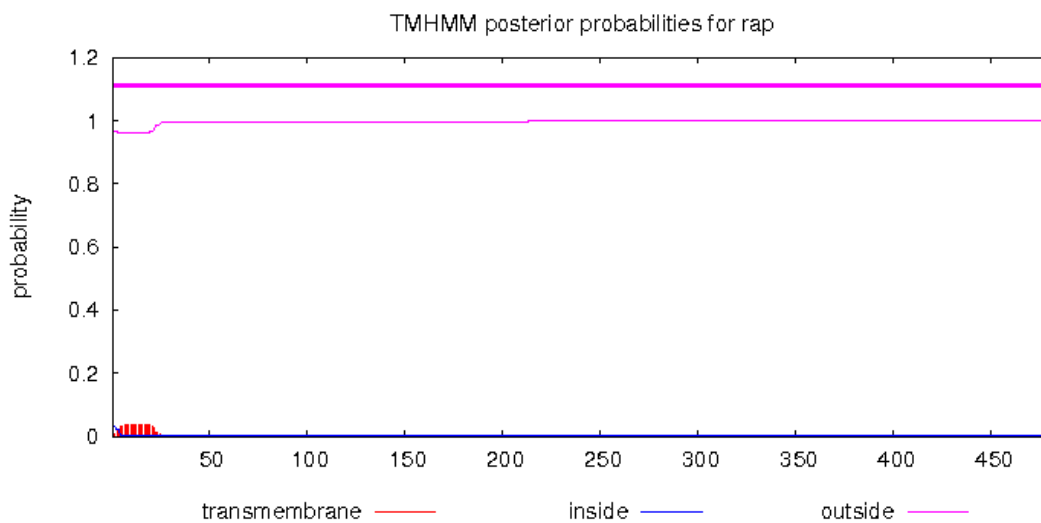


Figura 20. Análisis bioinformático de predicción de presencia de dominios transmembranales en la proteína RAP-1 α 1 con el programa TMHMM 2.0.

Mediante SignalP 4.1 se identificó un sitio de corte de péptido señal, ubicado entre los aminoácidos 20 y 21 de la proteína (Figura 21).

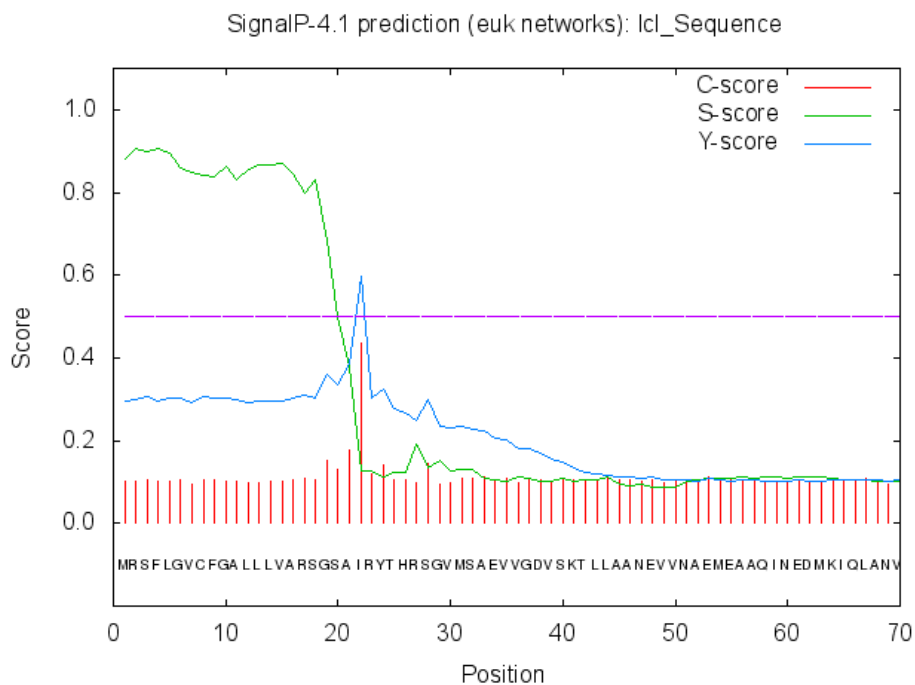


Figura 21. Análisis de predicción de péptido señal en la proteína RAP-1 α 1 con el programa SignalP 4.1.

7.3.4 Proteína MIC-1

El análisis de hidrofobicidad para la secuencia de la proteína MIC-1 realizado con el programa ProtScale indicó la presencia de dos regiones hidrofóbicas, una posicionada en el extremo amino terminal y la segunda en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Figura 22).

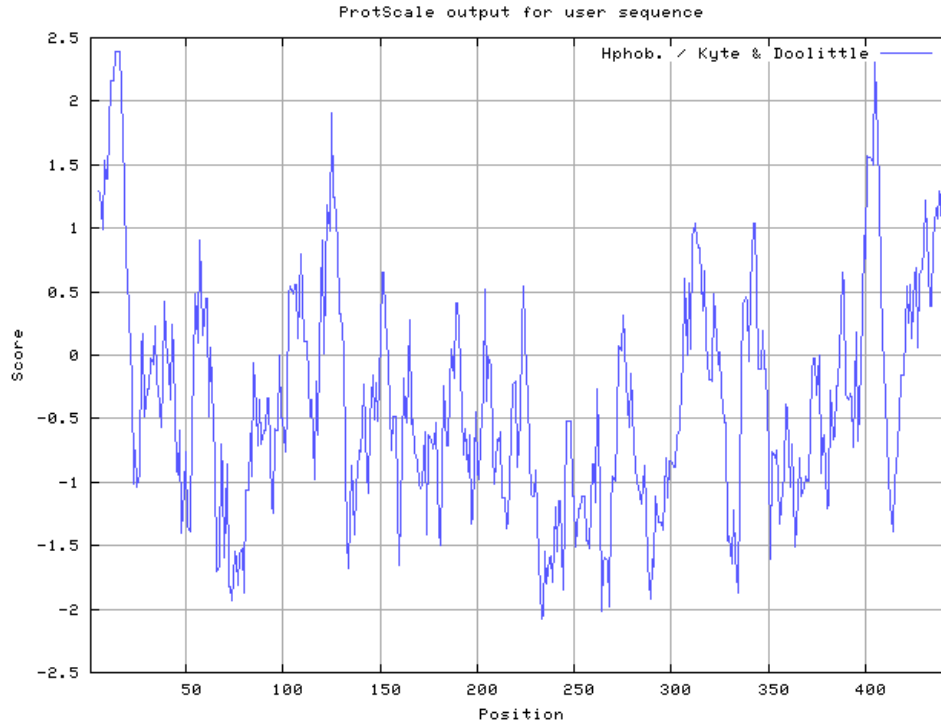


Figura 22. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína MIC1 con el programa ProtScale.

El análisis de predicción de dominios transmembranales indicó que esta proteína no posee regiones de este tipo (Figura 23).

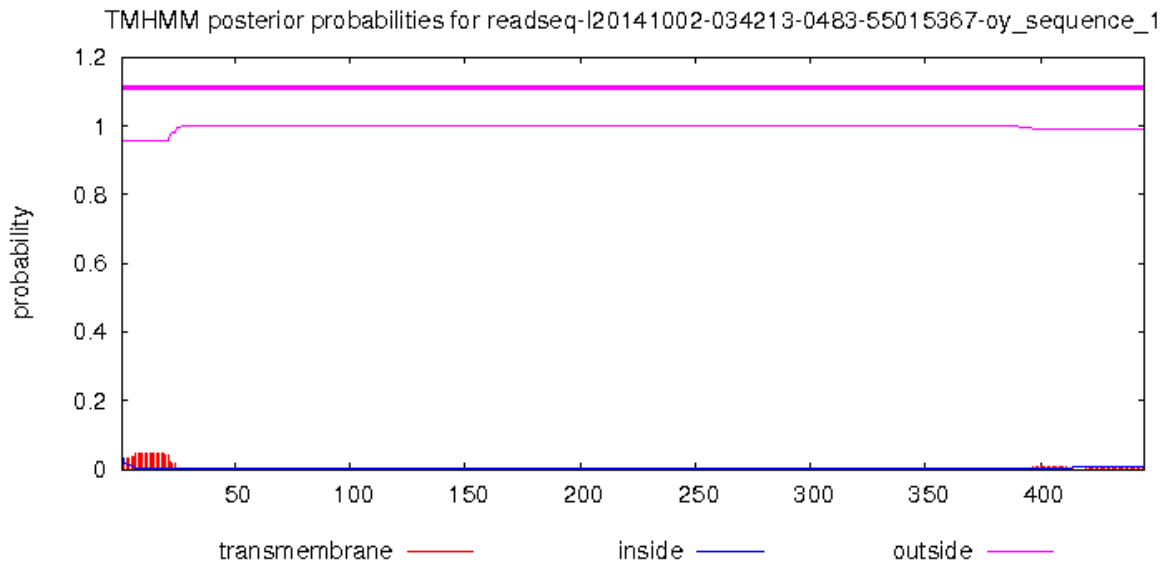


Figura 23. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína MIC1 con el programa TMHMM 2.0.

El análisis de predicción de péptido señal para MIC-1 indicó la presencia de un péptido señal, con un punto de corte entre los aminoácidos 23 y 24 (Figura 24).

gnalP-4.1 prediction (euk networks): readseq_I20141002_034213_0483_55015367_oy_se

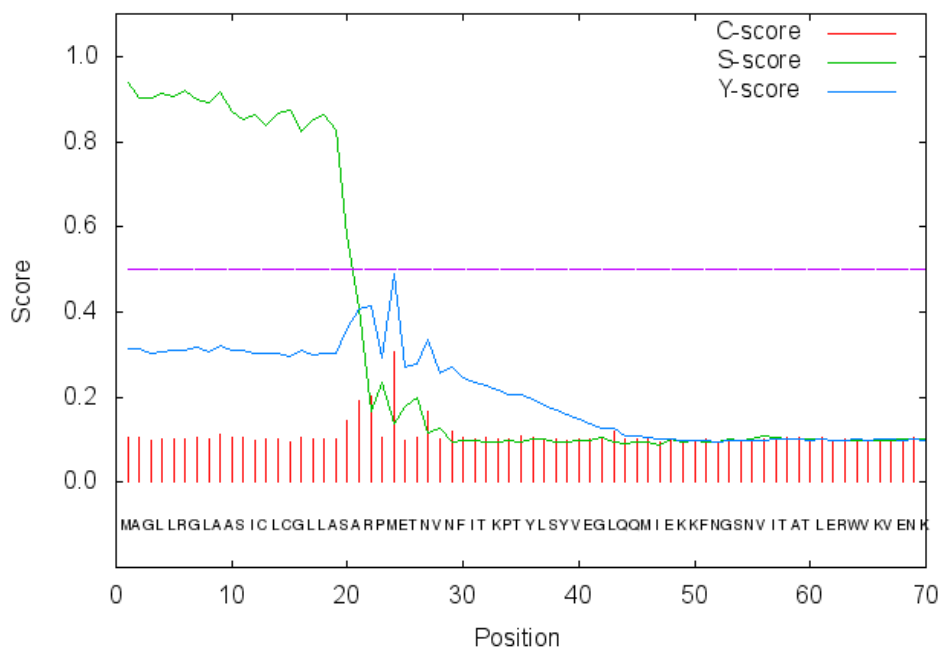


Figura 24. Análisis de predicción de péptido señal en la proteína MIC-1 con el programa SignalP 4.1.

7.4. Selección de péptidos predichos

Con los resultados del análisis bioinformático de la estructura secundaria de las proteínas, se identificó la región extracelular predicha para cada una de las proteínas. Utilizando esta secuencia de aminoácidos predicha extracelular se realizó la predicción de los epítomos B.

A continuación, en el cuadro número 11 se muestra el número de péptidos seleccionados predichos como epítomos B por los diferentes algoritmos, así como también su posición en la estructura primaria de aminoácidos en las proteínas.

Cuadro 11. Lista de péptidos seleccionados y su posición en la estructura primaria de las proteínas.

Proteína	Nombre del péptido	Orden de predicción	Posición en la estructura primaria
AMA-1	AMA-1A	1	64-84 aa.
	AMA-1B	2	423-442 aa.
	AMA-1C	3	249-269 aa.
	AMA-1D	4	209-228 aa.
	AMA-1E	5	397-416 aa.
RAP-1 α1	RAP-T1	1	435-465 aa.
	RAP-T2	2	158-187 aa.
	RAP-B1	3	424-439 aa.
	RAP-B2	4	150-171 aa.
	RAP-B3	5	168-180 aa.
	RAP-B4	6	409-427 aa.
GP45	GP45-1	1	282-301 aa.
	GP45-CH	2	52-70 aa.
	GP45-CS	3	52-70 aa.
	GP45-4	4	142-159 aa.
	GP45-5	5	178-195 aa.
MIC-1	MIC1-A	1	125-141aa.

	MIC1-B	2	142-158 aa.
	MIC1-C	3	159-176 aa.
SBP4	SBP4-A	1	50-70 aa.
	SBP4-B	2	214-234 aa.
	SBP4-C	3	144-163 aa.
	SBP4-D	4	70-99 aa.

7.5 Evaluación de los anticuerpos generados contra cada péptido en tejido nativo mediante Inmunofluorescencia indirecta.

Se identificaron las proteínas en merozoitos de *B. bigemina* mediante los anticuerpos generados contra cada una de ellas en conejos y utilizando un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo.

Esto se detalla a continuación:

7.5.1 Péptidos de la proteína AMA-1

Los análisis de microscopía de fluorescencia con los sueros de los conejos inmunizados con los péptidos de AMA-1 mostraron un patrón de tinción definido, intenso y homogéneo en forma de uno o dos puntos ubicados en el extremo apical de los merozoitos. También se observó la tinción de la membrana en algunos parásitos (Figuras 25-29).

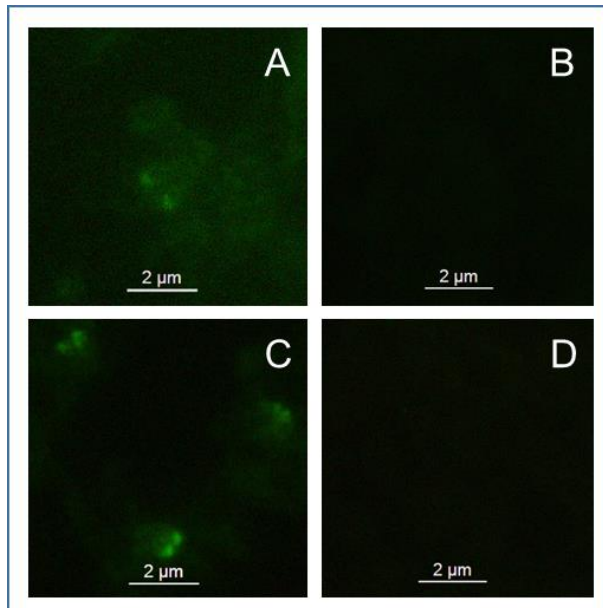


Figura 25. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

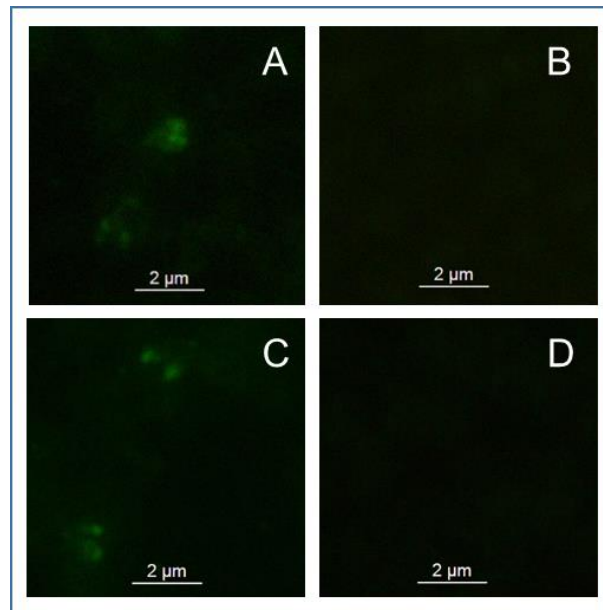


Figura 26. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

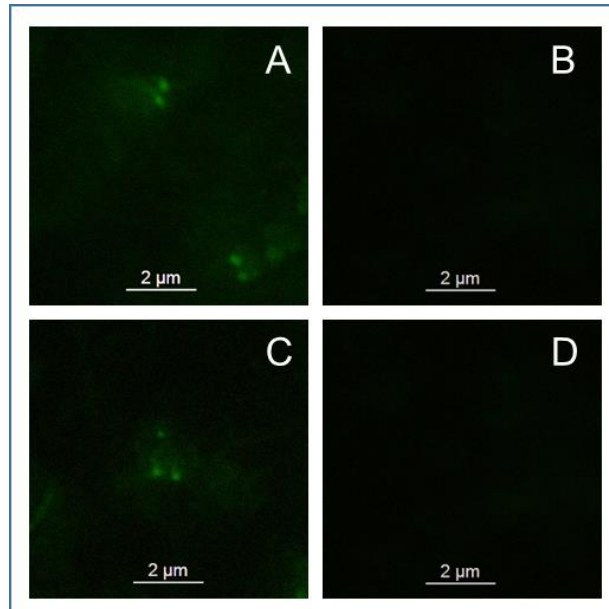


Figura 27. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1C reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

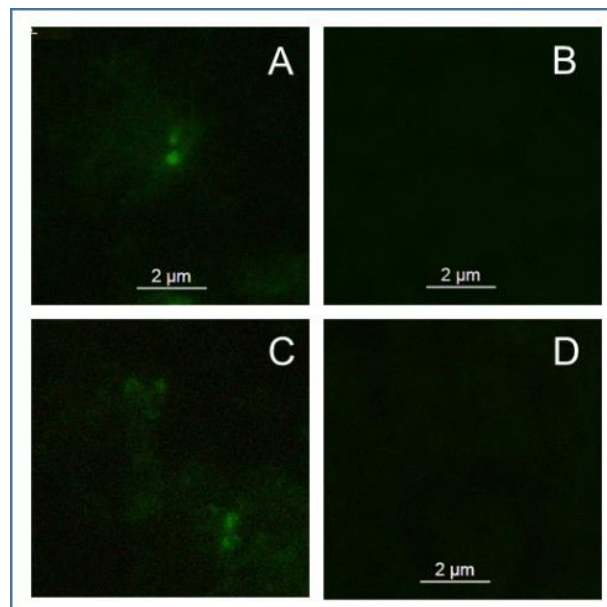


Figura 28. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1D reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-

inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

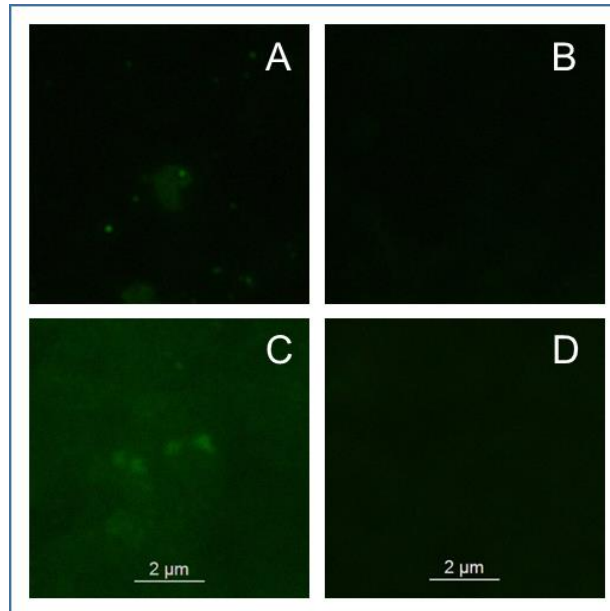


Figura 29. Los anticuerpos contra el péptido AMA-1E reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-
inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

7.5.2 Péptidos de la proteína SBP-4

Los sueros de los conejos inmunizados con péptidos de la proteína SBP-4 mostraron señales positivas al análisis de inmunofluorescencia indirecta. Se observó un patrón de tinción consistente en una o dos esferas definidas e intensas ubicadas en el extremo apical de los merozoitos. Además se observó en algunos sueros una señal intensa y homogénea en forma de puntilleo ubicada en las células abandonadas por el parásito (fantasmas) (Figuras 30-33).

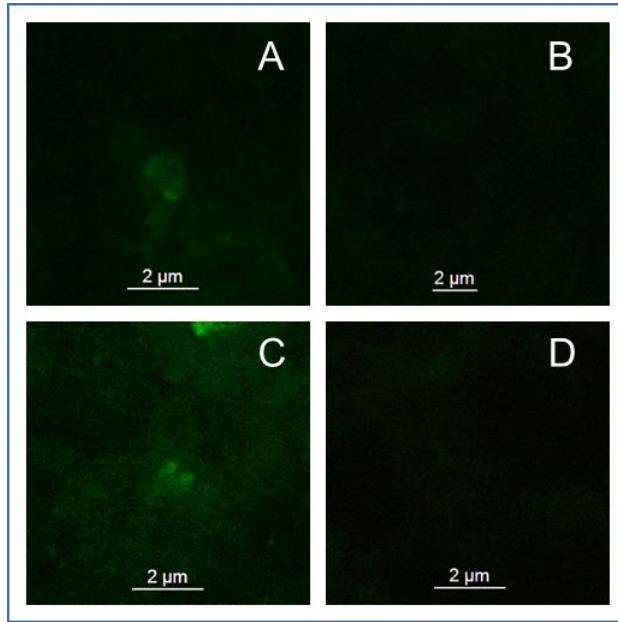


Figura 30. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

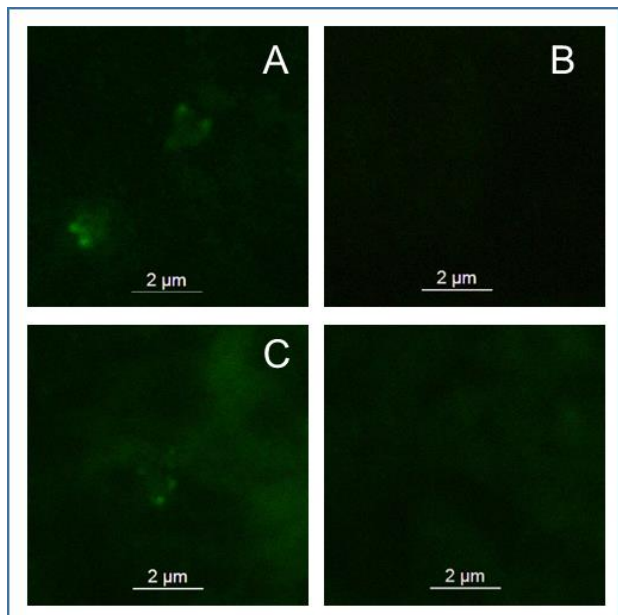


Figura 31. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-

inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

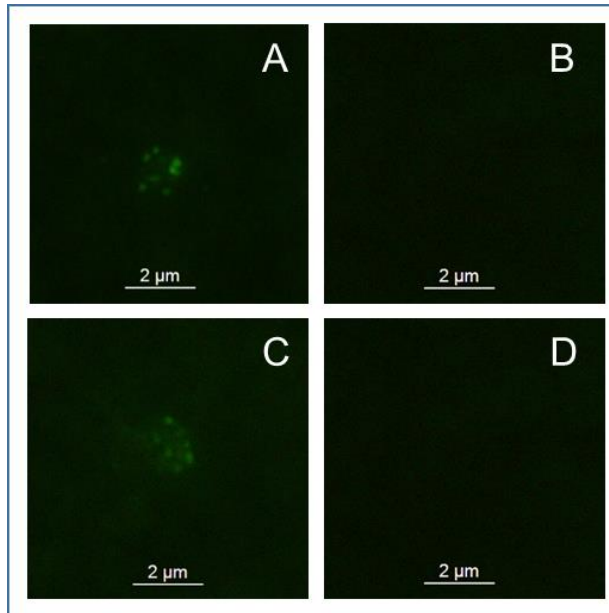


Figura 32. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-C reconocen los eritrocitos abandonados por los merozoitos de *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post- inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post- inmunización del conejo 1. D) Suero pre- inmunización del conejo 1. Objetivo 100X.

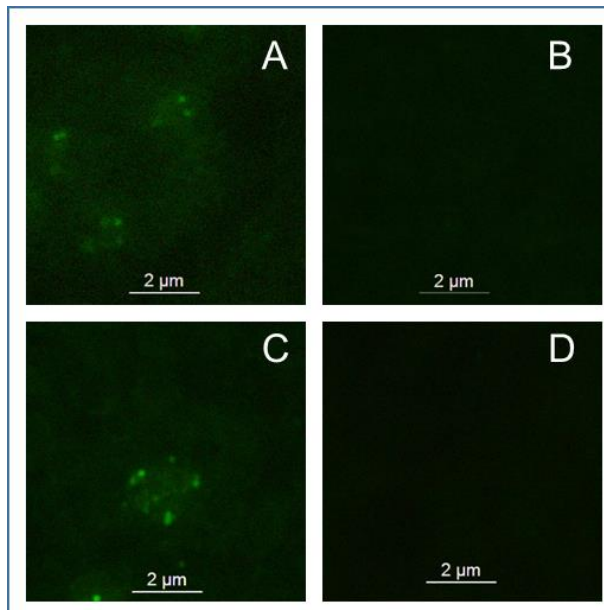


Figura 33. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-D reconocen los eritrocitos abandonados por los merozoitos de *B. bigemina* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post- inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post- inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

7.5.3 Péptidos de la proteína GP45

Se realizó el análisis de los sueros de los conejos inmunizados con péptidos de GP45. Los resultados mostraron la tinción en la membrana de los merozoitos intraeritrocíticos, así como también se observó una señal intensa en el extremo apical de los parásitos como se observa en las figuras 34 a la 38.

Para el caso del péptido GP45-1 solo se contó con el suero de un conejo y para el péptido GP45-CS un conejo de los dos inmunizados no mostró señal positiva.

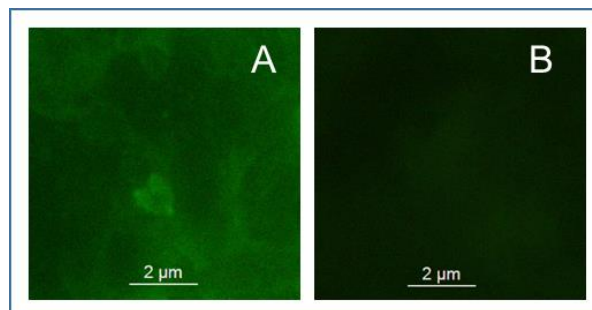


Figura 34. Los anticuerpos contra el péptido GP45-1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post- inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. Objetivo 100X.

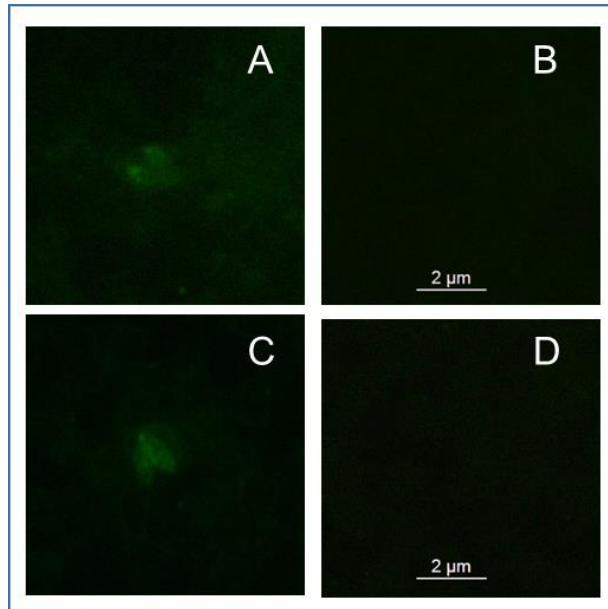


Figura 35. Los anticuerpos contra el péptido GP45-CH reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

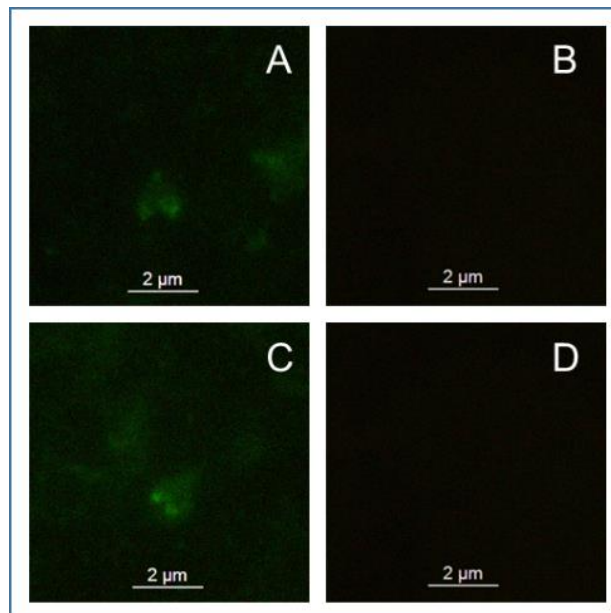


Figura 36. Los anticuerpos contra el péptido GP45-CS reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 1. D) Suero pre- inmunización del conejo 1. Objetivo 100X.

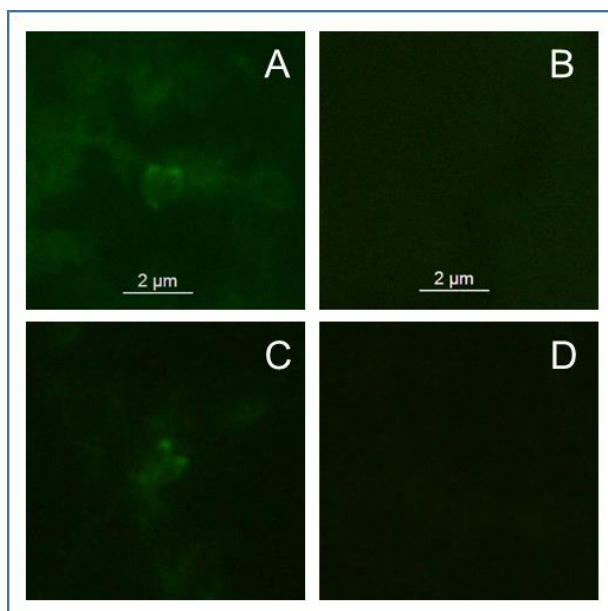


Figura 37. Los anticuerpos contra el péptido GP45-3 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

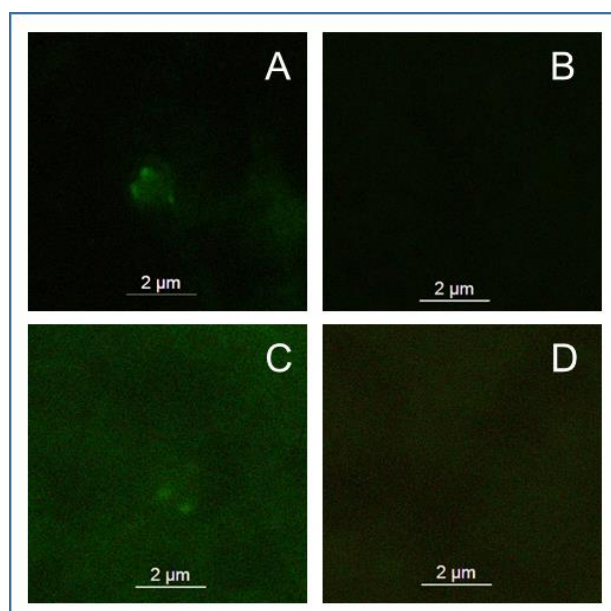


Figura 38. Los anticuerpos contra el péptido GP45-4 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-

inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

7.5.4 Péptidos de la proteína RAP-1 α 1

Los resultados del análisis de los sueros de los conejos inmunizados con los péptidos de RAP-1 α 1 mostraron señales positivas y se observó mediante microscopia de fluorescencia un patrón de tinción intenso y definido que corresponde a uno o dos puntos posicionados en el extremo apical de los merozoitos intraeritrocíticos (Figuras 39-44).

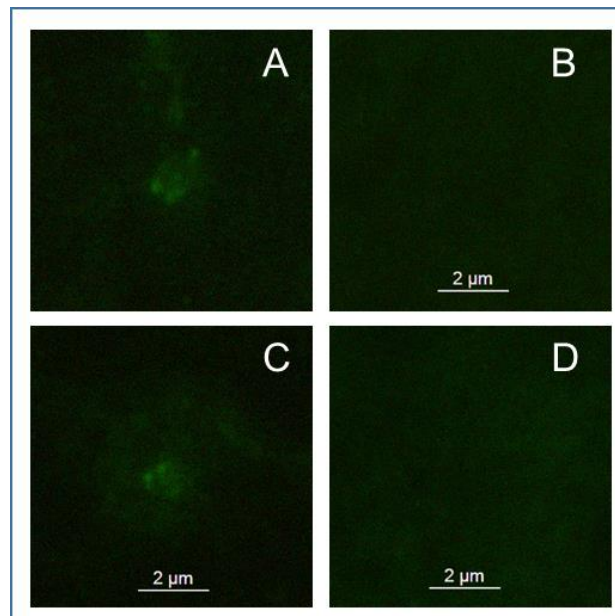


Figura 39. Los anticuerpos contra el péptido RAP-T1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-
inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

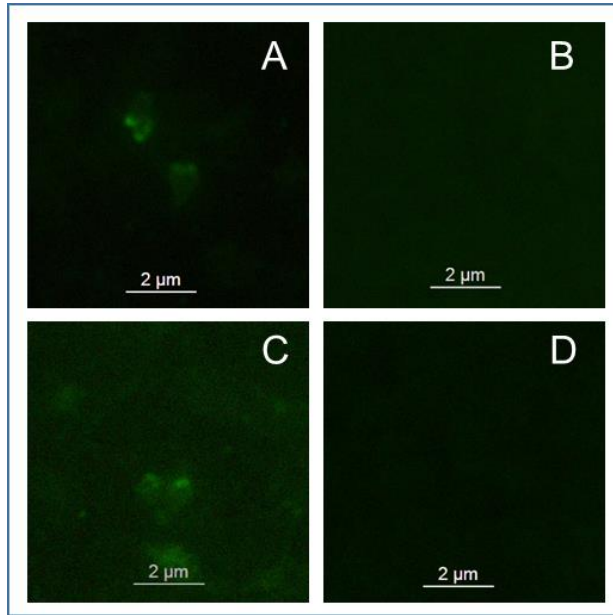


Figura 40. Los anticuerpos contra el péptido RAP-T2 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

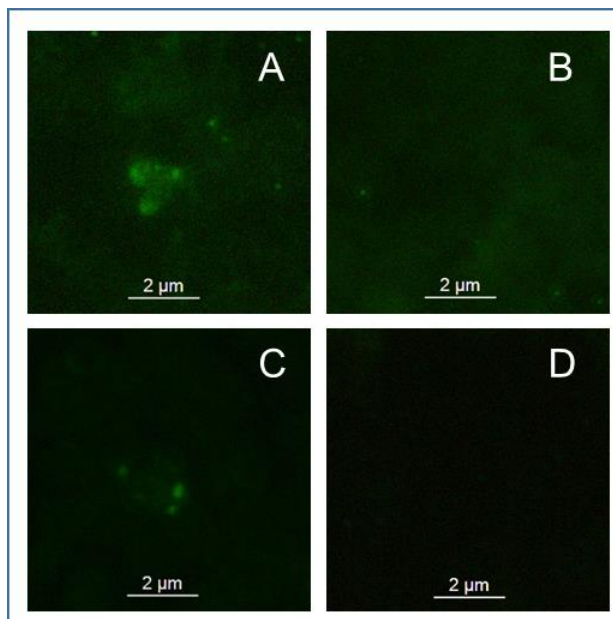


Figura 41. Los anticuerpos contra péptido RAP-B1 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-

inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

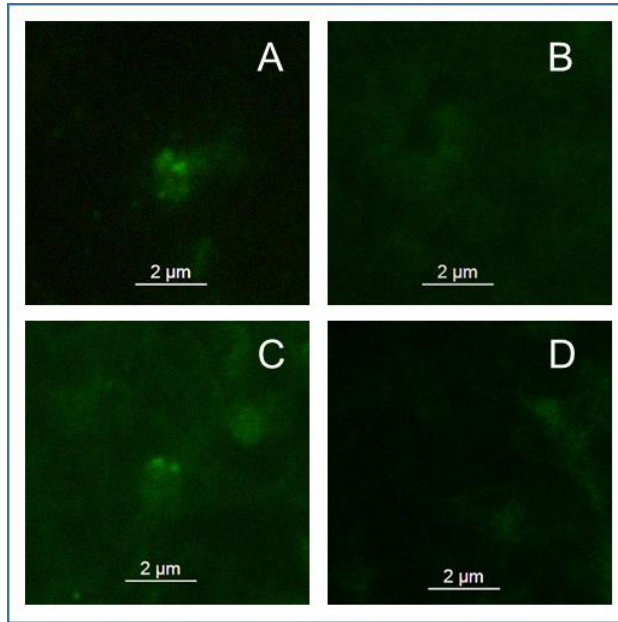


Figura 42. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B2 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-
inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

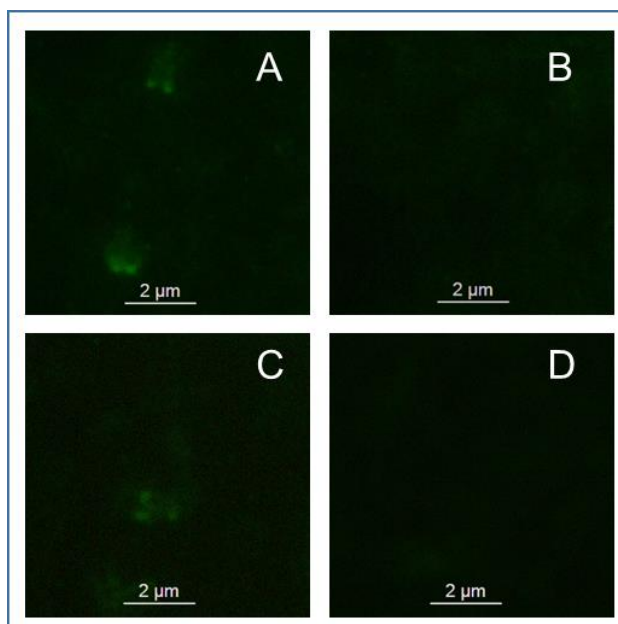


Figura 43. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B3 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

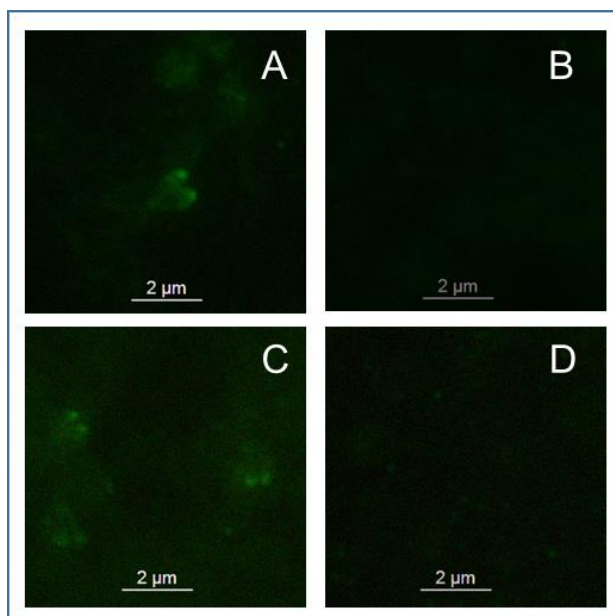


Figura 44. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B4 reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

7.5.5 Péptidos de la proteína MIC-1

El análisis de los sueros de los conejos inmunizados con los péptidos de la proteína MIC-1 mostró un patrón de tinción definido e intenso localizado en el extremo apical de los merozoitos intraeritrocíticos, así como también de su membrana en algunos casos (Figuras 45-47).

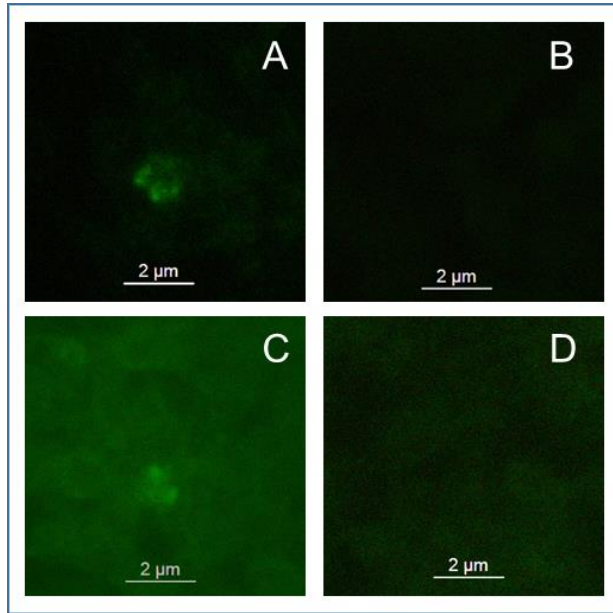


Figura 45. Los anticuerpos contra el péptido MIC-A reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

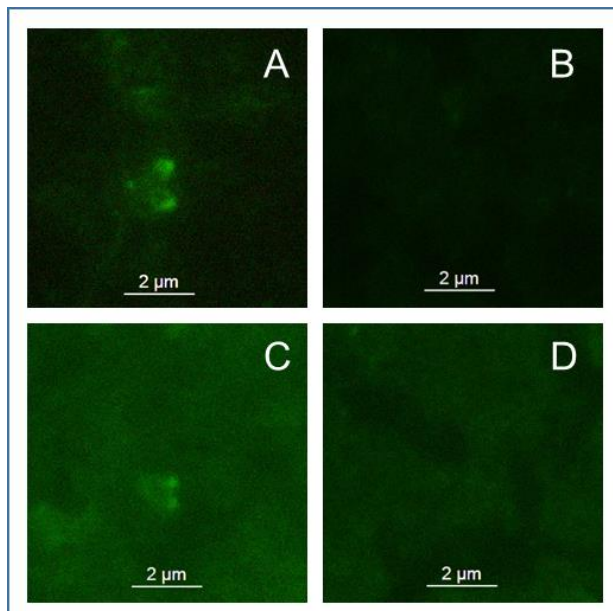


Figura 46. Los anticuerpos contra el péptido MIC-B reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-

inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

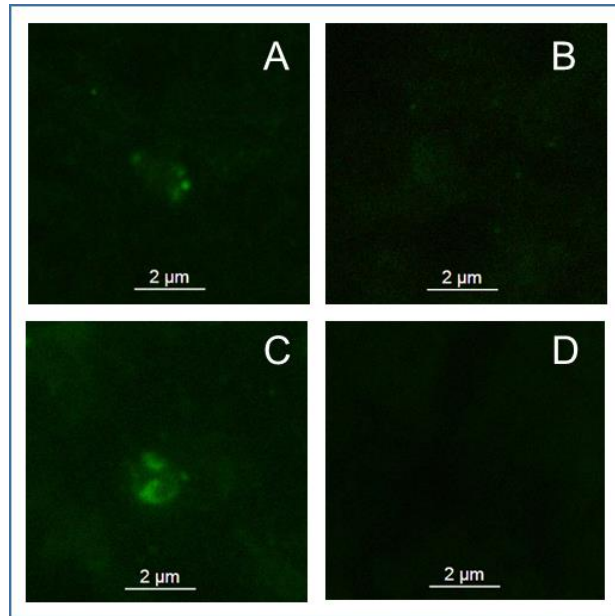


Figura 47. Los anticuerpos contra el péptido MIC-C reconocen los merozoitos de *B. bigemina* intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero post-
inmunización del conejo 1. B) Suero pre- inmunización del conejo 1. C) Suero post-
inmunización del conejo 2. D) Suero pre- inmunización del conejo 2. Objetivo 100X.

7.6 Evaluación de los anticuerpos generados contra cada péptido en merozoitos intraeritrocíticos mediante Inmunoelctrotransferencia.

Se analizó la capacidad de los sueros de los conejos inmunizados con cada péptido para identificar la proteína nativa utilizando la técnica de Inmunoelctrotransferencia. Las proteínas identificadas se muestran como una banda teñida de color purpura en la membrana de nitrocelulosa correspondiente al peso molecular esperado como se detalla a continuación.

7.6.1 Anticuerpos contra péptidos de la proteína AMA-1

Los sueros que corresponden a estos péptidos inmunodetectaron una proteína ubicada entre los 50-75 kDa, que coincide con el peso esperado de la proteína madura que es de 68 kDa (Figuras 48 a 52).

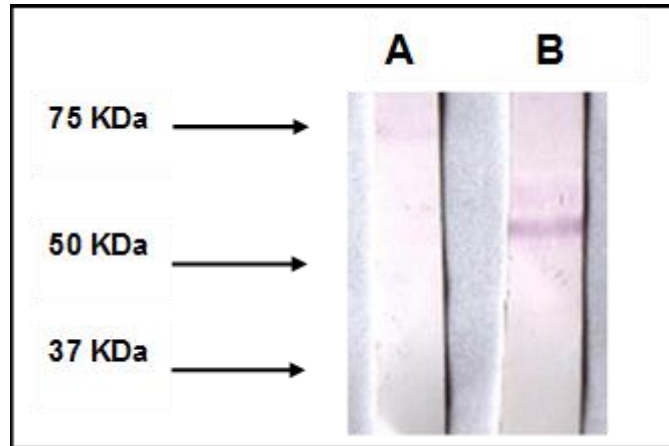


Figura 48. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-A identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

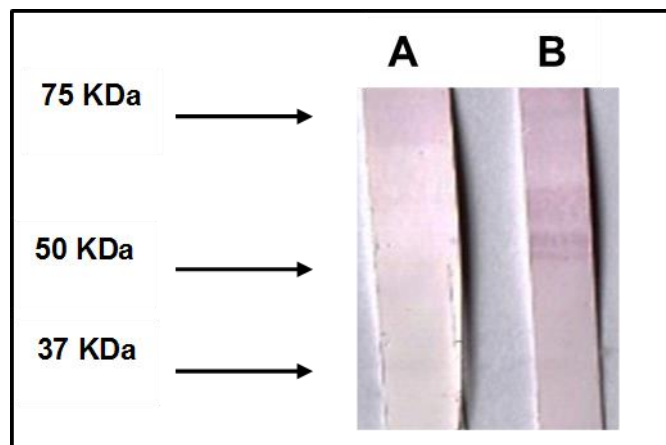


Figura 49. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-B identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

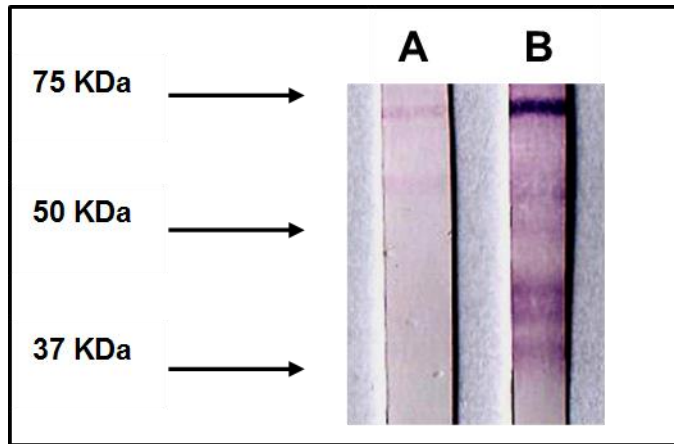


Figura 50. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-C identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

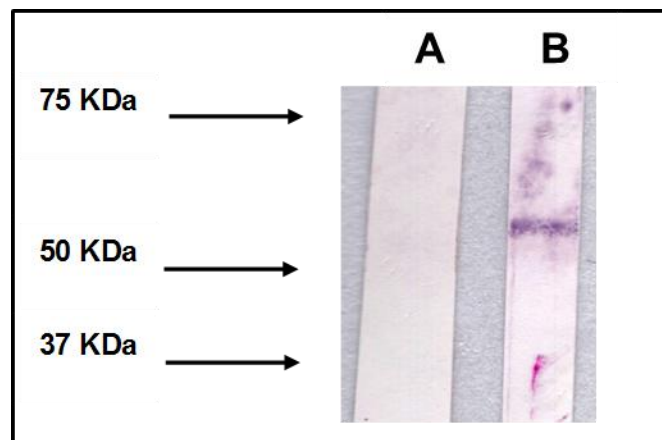


Figura 51. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-D identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

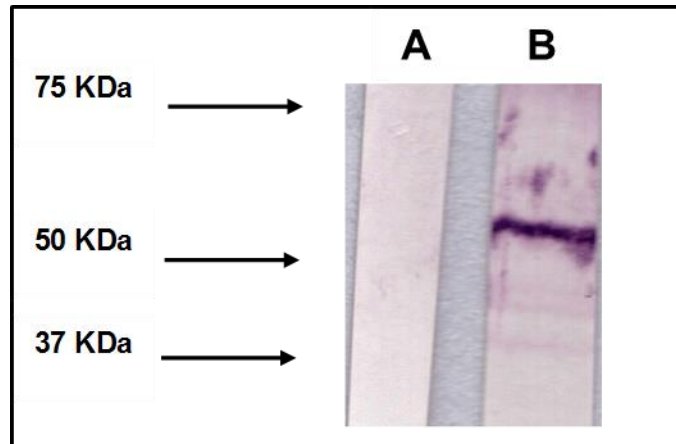


Figura 52. Los anticuerpos contra el péptido AMA1-E identifican la proteína AMA-1 mediante Inmunoelotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

7.6.2 Anticuerpos contra péptidos de la proteína SBP-4

Los sueros de conejos post-inmunización contra los péptidos SBP4-A, B y D de esta proteína detectaron una banda ubicada en el rango de 37-50 kDa (Figuras 53-55). El suero de conejos inmunizados con el péptido SBP4-C no mostró detección de ninguna proteína a las diluciones de anticuerpo utilizadas en el ensayo (Imágenes no mostradas).

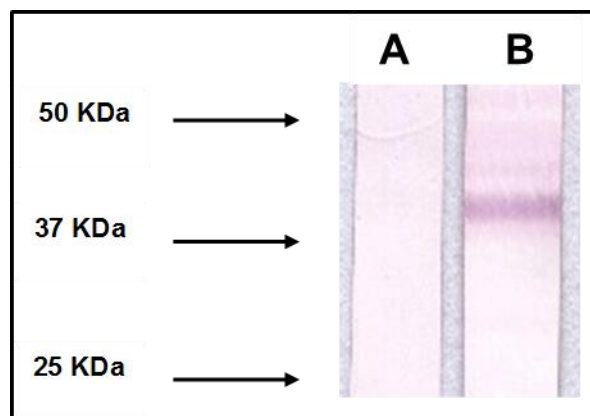


Figura 53. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-A identifican la proteína SBP4 mediante Inmunoelotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

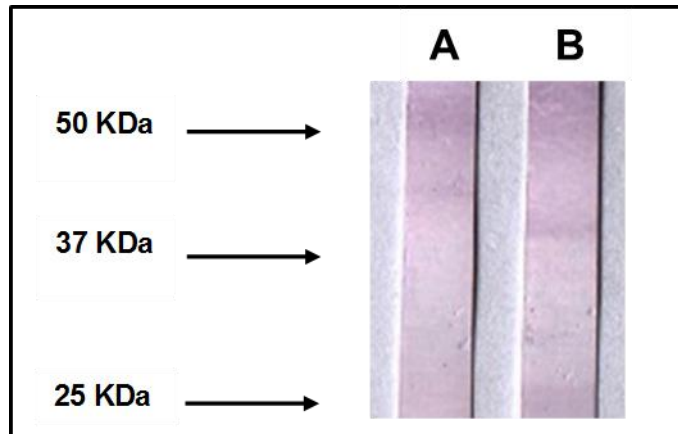


Figura 54. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-B identifican la proteína SBP4 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

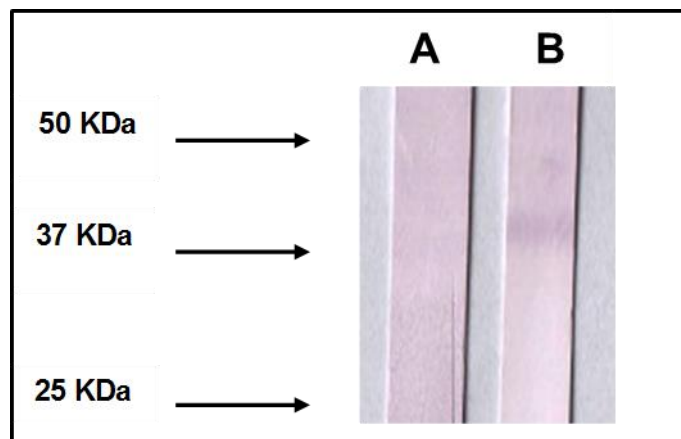


Figura 55. Los anticuerpos contra el péptido SBP4-D identifican la proteína SBP4 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

7.6.3 Anticuerpos contra péptidos de la proteína GP45

Los sueros de los conejos post-inmunización que corresponden a los péptidos GP45-1, GP45-CH y GP45-4 detectaron una proteína de peso aproximado a los 50 kDa, que coincide con el peso esperado de la proteína madura (Figuras 56, 57 y 59). En los sueros de los péptidos GP45-CH y GP45-3 se identificaron unas bandas de menor peso molecular (Figuras 57 y 58). Solamente en los sueros que

correspondían al péptido GP45-CS no se observó la inmunodetección de la proteína a las diluciones de anticuerpo utilizadas en el ensayo (Imágenes no mostradas).

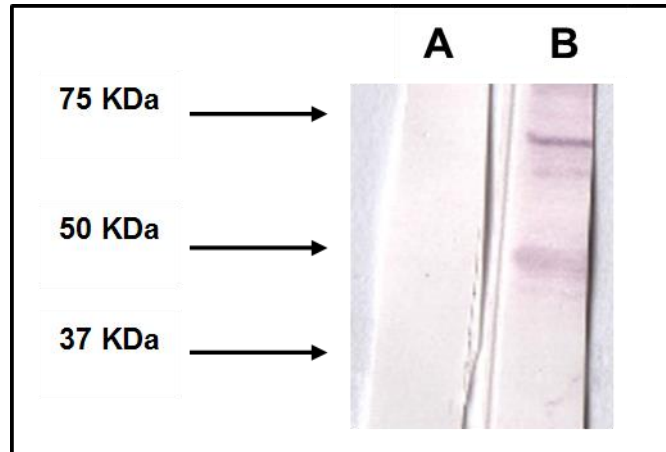


Figura 56. Los anticuerpos contra el péptido GP45-1 identifican la proteína GP45 mediante Inmuno-electrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

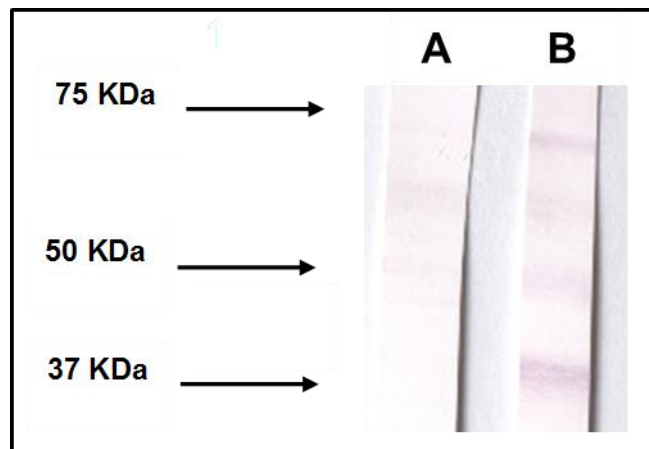


Figura 57. Los anticuerpos contra el péptido GP45-CH identifican la proteína GP45 mediante Inmuno-electrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

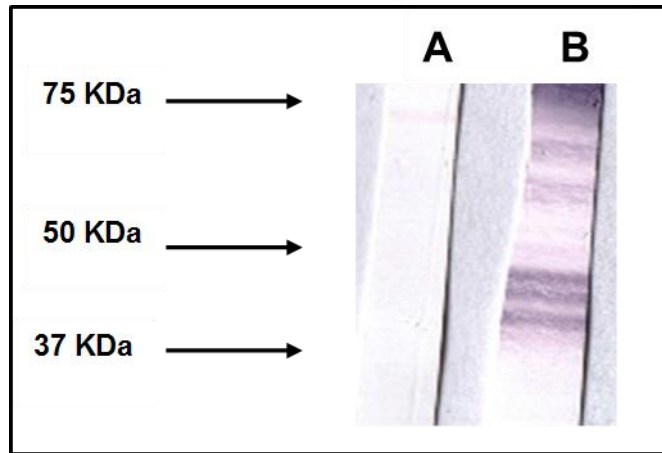


Figura 58. Los anticuerpos contra el péptido GP45-3 identifican la proteína GP45 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

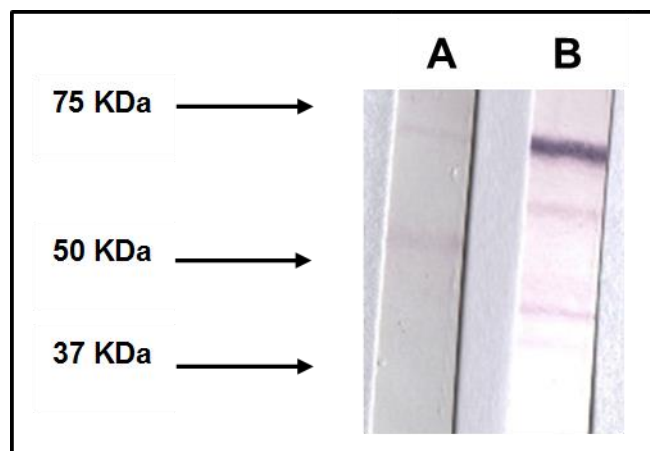


Figura 59. Los anticuerpos contra el péptido GP45-4 identifican la proteína GP45 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

7.6.4 Anticuerpos contra péptidos de la proteína RAP-1 α 1

El análisis de la inmunodetección de RAP-1 α 1 con los sueros contra los péptidos contra esta proteína identificó dos bandas con pesos entre los 50 y 75 kDa, que

coincide con el peso esperado de la proteína madura que es de 60.2 kDa (Figuras 60 a 65), como se detalla a continuación.

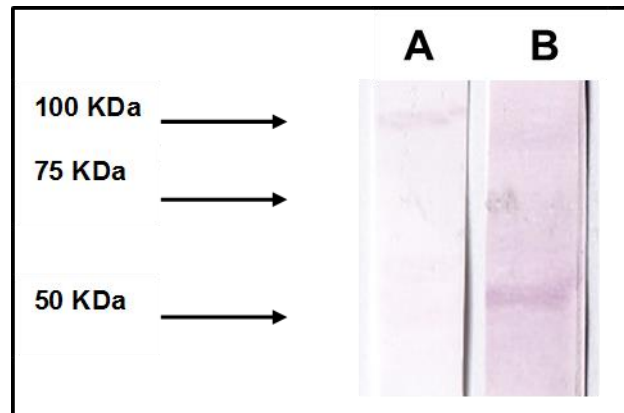


Figura 60 Los anticuerpos contra el péptido RAP-T1 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

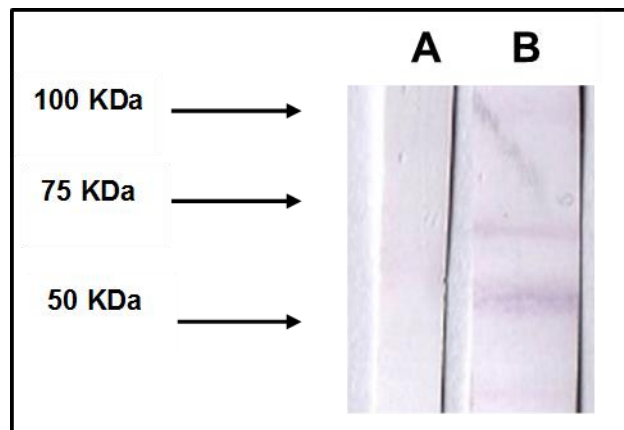


Figura 61. Los anticuerpos contra el péptido RAP-T2 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

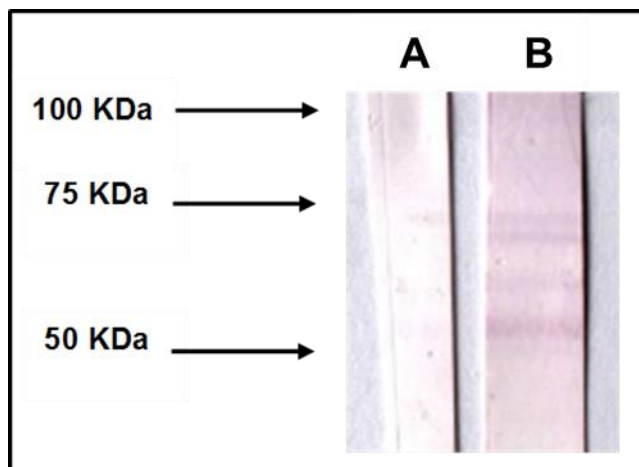


Figura 62. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B1 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

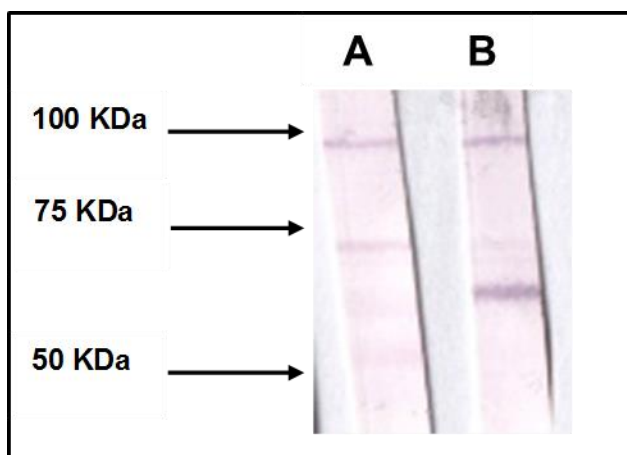


Figura 63. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B2 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunolectrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

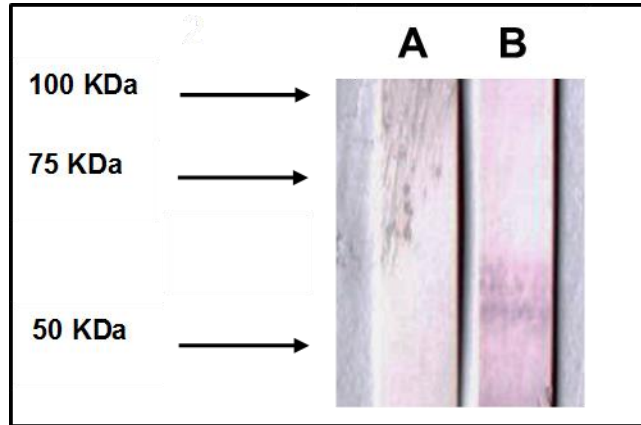


Figura 64. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B3 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

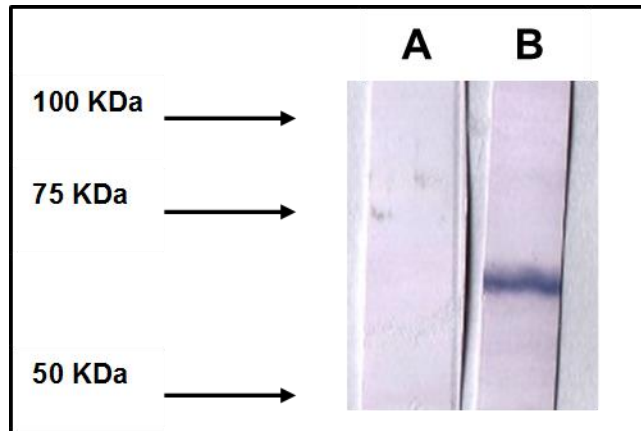


Figura 65. Los anticuerpos contra el péptido RAP-B4 identifican la proteína RAP-1 α 1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

7.5.1 Anticuerpos contra péptidos de la proteína MIC-1

En el análisis de la inmunodetección de MIC-1 solo los sueros contra los péptidos MIC-A y MIC-B identificaron bandas con un peso entre 75 y 37 kDa, que coincide con el peso esperado de la proteína madura que es de 55 kDa (Figuras 66 y 67), como se detalla a continuación.

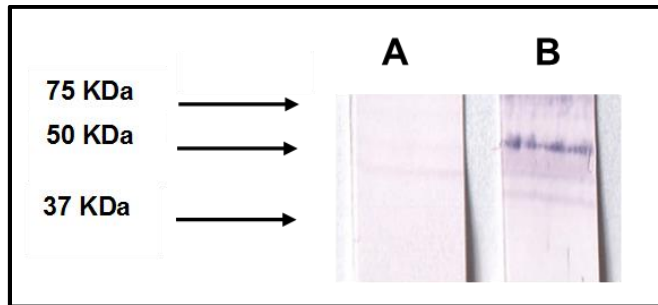


Figura 66. Los anticuerpos contra el péptido MIC-A identifican la proteína MIC-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

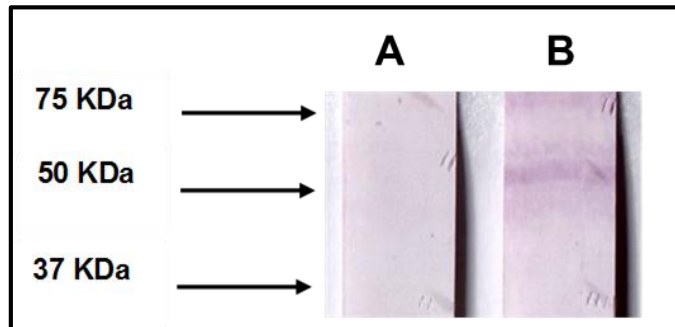


Figura 66. Los anticuerpos contra el péptido MIC-C identifican la proteína MIC-1 mediante Inmunoelctrotransferencia. A) Suero del conejo pre inmunización. B) Suero del conejo post inmunización. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La Babesiosis es una enfermedad transmitida por garrapatas y en el continente Americano es causada por *Babesia bovis* y *B. bigemina* con presentaciones clínicas severas en los bovinos infectados (Alvarez *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2007).

Actualmente se han identificado proteínas estructurales y funcionales que pueden ser blancos para el desarrollo de métodos de control contra esta enfermedad.

A diferencia de *B. bovis*, *B. bigemina* no ha sido tan estudiada y a la fecha se han identificado en este protozoario genes que codifican para proteínas presentes en la membrana de los merozoitos o secretadas de organelos del complejo apical. Estas proteínas son consideradas candidatas vacunales contra este parásito por tener la capacidad de generar anticuerpos neutralizantes (Figuroa y Buening, 1991). Sin embargo, el uso de estas proteínas como inmunógenos es limitado debido a la variabilidad de los epítomos inmunodominantes que contienen (Hines *et al.*, 1995; Hope *et al.*, 2005).

Por tal motivo, en este trabajo se planteó como objetivo identificar epítomos B en las proteínas AMA-1, GP45, SBP-4, RAP-1 α 1 y MIC-1 de *B. bigemina* que además, fueran conservados en distintos aislados de México y el mundo. Por tal motivo, fue necesario obtener las secuencias de los diferentes genes depositadas en las bases de datos y además, clonar y secuenciar algunos genes utilizando DNA de *B. bigemina* de distintos aislados.

Las secuencias nucleotídicas que se obtuvieron en este trabajo corresponden con las secuencias reportadas y depositadas previamente en las bases de datos. Así mismo, las secuencias de aminoácidos predichas corresponden con las reportadas en las bases de datos.

El resultado del alineamiento múltiple permitió identificar las regiones de las proteínas que fueran conservadas y predichas como epítomos B.

En el análisis de predicción de péptido señal, en todas las proteínas se indicó la presencia de un sitio de corte en la secuencia que concuerda con la estructura secundaria de cada una de las proteínas (Fisher *et al.*, 2001; Suarez *et al.*, 2003; Torina *et al.*, 2010).

En el análisis de hidrofobicidad se lograron identificar las regiones expuestas de las proteínas y esto permitió reconocer las secuencias de aminoácidos hidrofílicas (Gasteiger *et al.*, 2005).

Con todos estos resultados se logró conocer: a) las regiones conservadas de las proteínas; b) la presencia de péptido señal y por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la proteína madura y c) las regiones hidrofílicas de las proteínas. Finalmente, para conocer la región extracelular de las proteínas, fue necesario realizar la predicción de dominios transmembranales.

Tal y como se ha reportado previamente, se identificó un dominio transmembranal únicamente en la proteína AMA-1 (Krogh *et al.*, 2001; Torina *et al.*, 2010).

A partir de la secuencia de aminoácidos hidrofílica de las proteínas se logró la predicción de los péptidos que contienen epítomos B lineales conservados entre los distintos aislados. Gaffar *et al.*, en el 2004 identificaron regiones antigénicas en la proteína AMA-1 de *B. bovis* utilizando algunas de las herramientas bioinformáticas, aunque no todos ellos correspondían a una secuencia conservada. Por su parte Domínguez *et al.*, en el 2010 identificó epítomos B lineales en la familia de proteínas MSA-2 de *B. bovis* utilizando algunas de las herramientas bioinformáticas, pero al igual que Gaffar *et al.*, (2004) no correspondían a una secuencia de aminoácidos conservada. En este trabajo se utilizó un mayor número de herramientas bioinformáticas que permitieron identificar péptidos hidrofílicos, antigénicos y predichos como epítomos B en la región extracelular de las proteínas y conservados en las secuencias obtenidas y existentes actualmente en las bases de datos.

El número de inmunizaciones que se realizaron dependió de la presencia de anticuerpos. Por ejemplo, para las proteínas AMA-1 (3 péptidos) y SBP-4 (1 péptido) fueron necesarias 4 inmunizaciones, mientras que para las proteínas MIC-1 (1

péptido) y RAP-1alfa1 (2 péptidos) fueron necesarias 7 inmunizaciones. Para el resto de los péptidos se realizaron 6 inmunizaciones. Esta variación en el número de inmunizaciones puede deberse a la inmunogenicidad individual de cada uno de los péptidos y/o a la capacidad del sistema inmune de los conejos de generar una respuesta humoral contra un epítipo en particular (Abbas *et al.*, 2012).

Los anticuerpos generados contra cada uno de los péptidos de la proteína AMA-1 identificaron un patrón de expresión en la membrana y complejo apical de merozoitos intraeritrocíticos mediante inmunofluorescencia indirecta que corresponde al observado anteriormente para AMA-1 de *B. bovis* y *B. divergens* donde se ha reportado que esta proteína se expresa en las micronemas y membrana de los merozoitos (Gaffar *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2009; Salama *et al.*, 2013). Hasta el momento solo Vallejo E., en el 2011 utilizando anticuerpos contra AMA-1, reportó en inmunofluorescencia indirecta, el patrón de expresión de esta proteína para *B. bigemina*, que es el mismo que se obtuvo en este trabajo.

Adicionalmente, anticuerpos generados con estos péptidos identificaron bandas en extractos de eritrocitos infectados, mediante Inmunoelectrotransferencia, que muestran un peso molecular aproximado entre 50 y 75 kDa y que corresponde al peso predicho de AMA-1 en *B. bigemina* (Torina *et al.*, 2010). Mientras algunos sueros de los conejos identificaron una sola banda, otros identificaron dos o tres bandas de un peso igual o menor al peso esperado de la proteína madura. Esto, concuerda con resultados obtenidos al identificar AMA-1 mediante inmunoelectrotransferencia en *B. bovis*, *B. divergens*, *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium* spp., donde se ha observado que AMA-1 sufre procesamiento catalítico durante el proceso de invasión a la célula blanco (Dowse y Soldati, 2004; Gaffar *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2009; Narum y Thomas, 1994; Salama *et al.*, 2013).

Los anticuerpos generados contra cada uno de los péptidos de la proteína SBP-4 identificaron mediante inmunofluorescencia indirecta estructuras redondas teñidas en el extremo apical de los merozoitos intraeritrocíticos con estructura similar a la de los cuerpos esféricos y además se observó una tinción intensa y homogénea en

los eritrocitos abandonados (fantasmas). A la fecha, no existen reportes que describan el patrón de expresión de esta proteína en *B. bigemina*, sin embargo, éste corresponde a lo reportado para SBP-4 de *B. bovis*, donde las proteínas de los cuerpos esféricos se han identificado en los cuerpos esféricos y en el citoplasma de los eritrocitos infectados y abandonados (Dowling *et al.*, 1996; Narum y Thomas, 1994; Terkawi *et al.*, 2011).

El análisis de los anticuerpos generados con estos péptidos identificó una sola banda en extractos de eritrocitos infectados, mediante inmunoelectrotransferencia, que mostró un peso molecular aproximado entre 37 y 50 kDa, el cual no corresponde al peso predicho de SBP-4 (33 kDa) en *B. bigemina*. La diferencia entre el peso predicho y el identificado podría deberse a modificaciones postraduccionales. Esto coincide con lo reportado para las proteínas de los gránulos densos en *T. gondii* que son homólogas a las proteínas de los cuerpos esféricos de las especies de *Babesia* y que sufren procesamientos postraduccionales que incrementan su peso predicho (Achbarou *et al.*, 1991; Zinecker *et al.*, 1998).

Los sueros de los conejos inmunizados contra cada uno de los péptidos de la proteína GP45 identificaron mediante inmunofluorescencia indirecta un patrón de expresión que corresponde a la membrana y el complejo apical en merozoitos intraeritrocíticos. Hasta el momento no existe un reporte del patrón de expresión de esta proteína en *B. bigemina*. Sin embargo se sabe que GP45 es una proteína de membrana y esto coincide con el hecho de que proteínas con sitios de anclaje a la membrana mediante GPI se expresan en la membrana y complejo apical de los merozoitos (Carcy *et al.*, 1994; Carcy *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 2001; Pachebat *et al.*, 2007).

Los sueros de los conejos inmunizados con péptidos de la proteína GP45 identificaron dos bandas entre un peso de 37 y 50 kDa en extractos de eritrocitos infectados mediante Inmunoelectrotransferencia. Estos resultados difieren de lo observado en distintos trabajos realizados con GP45 en *B. bigemina*, donde se identificó una sola banda cercana a los 50 kDa (Fisher *et al.*, 2001; McElwain *et al.*, 1987; McElwain *et al.*, 1991). Sin embargo nuestros resultados concuerdan con

reportes donde, mediante Inmunolectrotransferencia, se han identificado varias bandas al analizar proteínas ancladas a la membrana debido a que estas son procesadas (Carcy *et al.*, 1995; Pachebat *et al.*, 2007). A la fecha no existen estudios donde demuestren que GP45 es una proteína que es procesada, sin embargo los resultados observados en este trabajo sugieren esta proteína se procesa y las diferencias entre este trabajo y los publicados sobre el número de bandas encontradas en GP45 de *B. bigemina* pueden deberse al procesamiento de la muestra utilizada, a la sensibilidad de los métodos de detección utilizados o a ambas.

Sólo en el caso de los sueros de los conejos inmunizados con el péptido GP45-CS no se logró identificar la proteína mediante Western blot a pesar de haber utilizado una dilución de 1:400 para el anticuerpo primario. Sin embargo, sí se identificó un patrón de expresión mediante inmunofluorescencia indirecta. Estos resultados pueden deberse a que en las dos técnicas se utiliza antígeno que se procesa de forma distinta y por lo tanto es posible que si la secuencia de aminoácidos que corresponde a este epítipo se procesa a un fragmento muy pequeño, no se logre detectar su separación mediante Western blot pero sí en IFI. Esto podría comprobarse mediante inmunoprecipitación.

RAP-1 α 1 es una proteína que se almacena y es secretada por las roptrias (Suarez *et al.*, 2003). El patrón de expresión identificado para la proteína RAP-1 α 1 con los anticuerpos generados contra los seis péptidos corresponde con la tinción de las roptrias en los merozoitos que son organelos del complejo apical que se localizan en el extremo apical del parásito como se ha descrito anteriormente en *B. bigemina* (Friedhoff y Scholtyseck, 1969). Este resultado concuerda con lo reportado para RAP-1 de *B. bovis*, una proteína homóloga a RAP-1 de *B. bigemina* (Suarez *et al.*, 1991). Por lo tanto los resultados en este trabajo sugieren que los anticuerpos generados reconocen un patrón de tinción consistente con RAP-1 α 1 mediante inmunofluorescencia indirecta.

La especificidad de los anticuerpos generados contra RAP-1 α 1 fue evaluada mediante Inmunolectrotransferencia. Los resultados obtenidos mostraron bandas

únicas en extractos de eritrocitos infectados, que muestran un peso molecular aproximado entre 50 y 75 kDa y que corresponde al peso predicho de RAP-1 α 1 en *B. bigemina* que es de 60 kDa (Hotzel *et al.*, 1996). Se ha demostrado en protozoarios apicomplexos que la proteína RAP-1 sufre un procesamiento enzimático y por lo tanto se puede inmunodetectar en sus formas madura y procesada en ensayos de inmunotransferencia (Howard *et al.*, 1998). Todo lo anterior indica que los anticuerpos generados en este trabajo identifican a la proteína RAP-1 α 1 de *B. bigemina*.

Los anticuerpos generados contra los péptidos de la proteína MIC-1 de *B. bigemina* mostraron un patrón de expresión correspondiente a una proteína secretada de las micronemas. MIC-1 es una proteína que se expresa en la membrana y en las micronemas (Reiss *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2010). En *B. bovis* se encontró una proteína homóloga sin péptido señal. En contraste a ese reporte, en este trabajo se identificó una proteína de 55 kDa con péptido señal. Este resultado coincide con lo descrito para la proteína MIC-1 en *T. Gondii* (Fourmaux *et al.*, 1996). El hecho de que en *B. bovis* no se halla identificado un péptido señal sugiere que quizás el análisis *in silico* de predicción de péptido señal realizado en ese estudio no fue el adecuado. Esto puede deberse a que MIC-1 tiene muchos intrones que dificultan su análisis bioinformático (Brayton *et al.*, 2007).

En los análisis de los anticuerpos específicos mediante Inmunoelctrotransferencia para MIC-1 se identificaron bandas entre 25 y 75 kDa en extractos de eritrocitos infectados. Este resultado concuerda con lo reportado para *B. bovis*, donde identificaron dos o tres bandas en sueros que contenían anticuerpos para la proteína MIC-1 (Silva *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que esta proteína es procesada en las dos especies de *Babesia*, logrando inmunodetectarse dos o más bandas de un peso menor en extractos de eritrocitos infectados. Actualmente se sabe que las proteínas que se secretan de las micronemas son procesadas durante su biosíntesis y exportación al exterior de la célula (Reiss *et al.*, 2001; Dowse y Soldati, 2004).

En años anteriores ya se había reportado la presencia de epítomos B conservados en *B. bigemina* mediante anticuerpos monoclonales (McElwain *et al.*, 1987;

Shompole *et al.*, 1995; Madruga *et al.*, 1996). En *B. bovis* se ha demostrado que anticuerpos contra regiones conservadas de proteínas de membrana de los merozoitos pueden generar anticuerpos que neutralicen la invasión de merozoitos al eritrocito (Domínguez *et al.*, 2010; Salama *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la presencia de epítomos B en proteínas de *B. bigemina*. Los epítomos B identificados son conservados y localizados en la porción expuesta al sistema inmune de proteínas involucradas en el proceso de invasión a la célula blanco y son inmunogénicos. Todo esto consistente con características ideales de candidatos vacunales contra la enfermedad (Mosqueda *et al.*, 2012).

Se demostró mediante técnicas bioinformáticas la existencia de epítomos B lineales conservados entre distintos aislados en las proteínas candidatas vacunales de *B. bigemina*.

Se comprobó que al inmunizar conejos con péptidos que contienen epítomos B lineales conservados se genera una respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos generados contra los diferentes péptidos son específicos para cada una de las proteínas de *B. bigemina* evaluadas en este trabajo.

Los resultados obtenidos demuestran la hipótesis planteada.

Sin embargo, para considerar el uso de estos epítomos B como candidatos vacunales, es necesario evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados contra estos epítomos, mediante ensayos *in vitro*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abbas K.A., Lichtman A.H., Pillai S. 2012. Cellular and Molecular Immunology. Septima edition. Elsevier Saunders.

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. 103:321-329.

Álvarez J.A., Ramos J.A, Rojas E.E., Mosqueda J.J., Vega C.A., Olvera A.M., Figueroa J.V., Cantó G.J. 2004. Field Challenge of Cattle Vaccinated with a Combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* Frozen Immunogen. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026: 277–283.

Babes V., 1888. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf (on the bacterian hemoglobinuria of cattle) (in French). C. R. Hebd. Acad. Sci. 107:692–694.

Barker C., Murrell A. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56:169–172.

Benavides E., Vizcaino O., Britto C.M., Romero A., Rubio A. Attenuated trivalent vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Colombia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 916:613-616.

Blackman Michael J., Bannister Lawrence H. 2011. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. Mol. Biochem. Parasitol. 117: 11–25.

Bock R., Wos A.J., Kingston T.G., Shiels I.A., Dalgliesh R.J. 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet. Parasitol. 43:45-56.

Bock R., Jackson L., de Vos A. and Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitol.129: 247-69.

Brayton K.A., Lau A.O., Herndon D.R., Hannick L., Kappmeyer L.S., Berens S.J., Bidwell S.L., Brown W.C., Crabtree J., Fadrosch D., Feldblum T., Forberger H.A., Haas B.J., Howell J.M., Khouri H., Koo H., Mann D.J., Norimine J., Paulsen I.T., Radune D., Ren Q., Smith R.K., Jr., Suarez C.E., White O., Wortman J.R., Knowles D.P., Jr., McElwain T.F., Nene V.M., 2007. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS Pathog. 3:401-1413.

Brown W.C., Norimine J., Goff W.L., Suarez C.E., McElwain T.F. 2006. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related Parasites. *Parasit Immunol.* 28:315–327.

Buling A., Criado-Fornelio A., Asenzo G., Benitez D., Barba-Carretero J.C., Florin-Christensen M. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147: 16–25.

Callow L.L., Dalgliesht R.J., De Vos A.J. 1997. Depelovment of Effective living vaccines against bovine Babesiosis. The longest field trial? *Int. J. Parasitol.* 7:747-767.

Cantó A. G.J., Vega y M., C.A. y Smith, R.D. 1982. "Ensayos de vacunación contra *Babesia bovis* utilizando antígenos procedentes de cultivo *in vitro*". *Tec. Pecu. Mex.* (43):43-54.

Carcy B., Bonnefoy S., Guillotte M., Le Scanf C., Grellier P., Schrevel J., Fandeur T., Mercereau-Puijalon, O., 1994. A large multigene family expressed during the erythrocytic schizogony of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 68:221-233.

Carcy B., Precigout E., Valentin A., Gorenflot A., Schrevel J., 1995. A 37-kilodalton glycoprotein of *Babesia divergens* is a major component of a protective fraction containing low-molecular-mass culture-derived exoantigens. *Infect Immun* 63:811-817.

Carcy B., Pre'cigout E., Schetters T., Gorenflot A. 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.*138:33–49.

Dalrymple B.P. 1993. Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Act Trop.* 53:227-238.

De Vos A.J., Bock R.E. 2000. Vaccination against bovine Babesiosis. *Ann N Y Acad Sci.*916:540-5.

De Waal D.T., Combrink M.P. 2006. Live vaccines against bovine Babesiosis. *Vet Parasitol.* 138:88–96.

Dowling S.C., Perryman L.E., Jasmer D.P., 1996. A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infect Immun.* 64:2618-2626.

Dowse T., Soldati D., 2004. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr opinion in microbiology.* 7: 388-396.

Echaide I.E., de Echaide S.T., Guglielmone A.A. 1993. Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. Vet Parasitol. 51:35-40.

El-Ghaysh A., Sundquist B., Christensson D.A., Hilali M., A.M. Nassar. 1996. Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Vet Parasitol.* 62: 51-61.

Figuroa, J.V., Buening, G.M., 1991. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 29:997-1003.

Figuroa J.V., Cantó G.J., Álvarez J.A., Lona G.R., Ramos J.A., Vega y Murguía C.A. 1998. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo in vitro. *Téc Pec Méx.* 36:95-105.

Figuroa J.V, Álvarez M.A. 2007. Vacunas contra la babesiosis bovina: Actualidad y perspectiva. Simposium Internacional: Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. FMVZ-UAT. Cd. Victoria Tamaulipas. 82-96.

Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer L.L., Tate J., Punta M. 2014. The Pfam protein families database: *Nuc Acid Res.*

Fisher, T.G., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 2001. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infect Immun* 69:3782-3790.

Fourmaux M.N., Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferragut C., Camus D., Dubremetz J.F., 1996. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol Biochem Parasitol* 83:201-210.

Friedhoff K., Scholtyseck E., 1969. Fine structure of the merozoites of *Babesia bigemina* in the ovary of *Boophilus microplus* and *Boophilus decoloratus*. *Z Parasitenkd* 32:266-283.

Gaffar F.R., Yatsuda A.P., Franssen F.F., de Vries E. 2004. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun.* 72(5):2947-55.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. 2005. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.

Giovannini D., Spa" th. S., Line L.C., Perazzi A., Bargieri D., Lagal V., Lebugle C., Combe A., Thiberge S., Baldacci P., Tardieux I.. 2011. Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa. *Cell Host & Microbe.*10:591-602.

- Gohil S., Herrmann S., Günther S., Cooke B.M. 2012. Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics International Journal for Parasitology. En prensa.
- Gubbels M., Duraisingh M.T. 2012. Evolution of apicomplexan secretory organelles. Int J Parasitol. En prensa.
- Hines S.A., Palmer G.H., Jasmer D.P., Goff W.L., McElwain T. F. 1995. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. Infect. Immun. 63(1):349.
- Hodgson H.L. 1992. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. Ann N Y Acad Sci.653:42-51.
- Hope M., Riding G., Menzies M., Colditz I., Reverter A., Willadsen P., 2005. Potential for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate. Parasite immunology 27:439-445.
- Hotzel I., Brown W.C., McElwain T.F., Rodriguez S.D., Palmer G.H., 1996. Dimorphic sequences of rap-1 genes encode B and CD4+ T helper lymphocyte epitopes in the *Babesia bigemina* rhoptry associated protein-1. Mol Biochem Parasitol. 81:89-99.
- Howard R.F., Narum D.L., Blackman M., Thurman J., 1998. Analysis of the processing of *Plasmodium falciparum* rhoptry-associated protein 1 and localization of Pr86 to schizont rhoptries and p67 to free merozoites. Mol Biochem Parasitol. 92:111-122
- Krogh L., Von H.G., Sonnhammer E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol. 305(3):567–80.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox E.G., Deroux G., Grain J., Hongberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R, Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. J Protozool. 27(1): 37-58.
- Lew A., Jorgensen W. 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: Babesiosis and Anaplasmosis. African J Biotech. 4(4):292-302.
- Machado R.Z., McElwain T.F., Suarez C., Hines S., Palmer G.H. 1993. *Babesia bigemina*: Isolation and characterization of merozoite rhoptries. Exp Parasitol. 77: 315-325.

Machado R.Z., McElwain T.F., Pancraccio H.P., Freschi C.R., Palmer G.H. 1999. *Babesia bigemina*: Immunization with purified rophtries induces protection against acute parasitemia. *Exp Parasitol.* 93:105–108.

Madruga, C.R., Suarez, C.E., Mcelwain, T.F., Palmer, G.H. 1996. Conservation of merozoite membrane and apical complex B cell epitopes among *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* strains isolated in Brazil. *Vet Parasitol.* 61, 21–30.

Madruga C.R., Marques A.C., Araújo F.R., Miguita M., Carvalho M.E., Araújo F.S., Umaki C.S., Crocci A.J., Queiróz R.A. 2001. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and it's application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 21(2):72-76.

Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, Zapf F, Schein E, Mehlhorn H.1995. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol Res.* 81 (7):595-604.

McElwain, T.F., Perryman, L.E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *J Immunol* 138, 2298-2304.

McElwain, T.F., Perryman, L.E., Musoke, A.J., McGuire, T.C., 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 47, 213-222.

Mihalca, A.D., 2010. The quest for piroplasms: from Babes to Smith to molecules. *Sci. Parasitol.* 11:14–19.

Mishra V.S., Stephens E.B., Dame J.B., Perryman L.E., McGuire T.C., McElwain T.F. 1991. Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p58: a neutralization sensitive, antigenically conserved *Babesia bigemina* merozoite surface protein. *Mol Biochem Parasitol.* 47:207-212.

Mishra V.S., McElwain T.F., Dame J.B., Stephens E.B. 1992. Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol.* 53:149-158

Montero E., Rodriguez M., Oksov Y., Lobo C.A., 2009. *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. *Infect Immun.* 77:4783-4793.

Morilla G.A. 1981. Inmunología de la Babesiosis. *Ciencia Veterinaria* 3: 241-275.

Mosqueda J., Falcón A., Álvarez J. A., J.A., Oropeza-Hernández L.F., Figueroa J.V. 2004a. *Babesia bigemina* sexual stages are induced *in vitro* and are specifically

recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. Int J Parasitol. 34:1229–1236.

Mosqueda J., Ramos J.A., Falcón A., Alvarez J.A., Aragon V., Figueroa J.V. 2004b. *Babesia bigemina*: sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. Ann N Y Acad Scis.1026:222-31.

Mosqueda G.J.J., Ramos A.A., Falcón N.A., Figueroa J.V., Álvarez J.A. 2004c. Generalidades de la Babesiosis bovina. CENID-PAVET, INIFAP. Folleto técnico. No.3.

Mosqueda J., Figueroa J.V., Alvarez A., Bautista R., Falcon A., Ramos A., Canto G., Vega C.A., 2007. Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. Parassitologia 49 Suppl 1:19-22.

Mosqueda J., Figueroa J.V., Álvarez A., Bautista R., Falcón A., Ramos A., Cantó G., Vega C. A. 2007. Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in México. Parassitologia 49(suppl. 1)19-22.

Mosqueda J., Olvera-Ramírez A., Aguilar-Tipacamú G., Cantó G.J. 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. Current Medicinal Chemistry. 19:1504-1518.

Mosqueda J., Falcón N.A., Ramos J.A., Canto G.J., Camacho-Nuez M. 2012. Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 3(Supl 1):51-59.

Narum D.L., Thomas A.W., 1994. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol. 67:59-68.

Norimine J., Mosqueda J., Suarez C., Palmer G.H., McElwain T. F., Mbassa G., Brown W. 2003. Stimulation of T-Helper Cell Gamma Interferon and Immunoglobulin G Responses Specific for *Babesia bovis* Rhoptry-Associated Protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 Protein Lacking the Carboxy-Terminal Repeat Region is Insufficient To Provide Protective Immunity against Virulent *B. bovis* Challenge. Infect Immun. 5021–5032.

OIE. 2004. Babesiosis bovina. *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. 548-559.

Pachebat J.A., Kadekoppala M., Grainger M., Dluzewski A.R., Gunaratne R.S., Scott-Finnigan T.J., Ogun S.A., Ling I.T., Bannister L.H., Taylor H.M., Mitchell G.H., Holder A.A. 2007. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite

surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 151:59-69.

Palmer G.H., McElwain T.F., Perryman L.E., Davis W.C., Reduker D.R., Jasmer D.P., Shkap V., Pipano E., Goff W.L., Mcguire T.C. 1991. Strain Variation of *Babesia bovis* Merozoite Surface-Exposed Epitopes. *Infect Immun.* 3340-3342.

Palmer G.H., McElwain T.F. 1995. Molecular basis for vaccine development against Anaplasmosis and Babesiosis. *Vet Parasitol.* 57:233-253.

Patarroyo J. H., Prates A.A., Tavares A.P., Mafra C.L. 1995. Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against Bovine babesiosis. *Vet Parasitol.* 59:189-199.

Pérez de León A.A, Strickman D.A, Knowles D.P, Fish D., Thacker E., de la Fuente J., Krause P.J, Wikel S.K, Miller R.S., Wagner G.G., Almazán C., Hillman R., Messenger M.T, Ugstad P.O., Duhaime R.A., Teel P.D., Ortega-Santos A., Hewitt D.G., Bowers E.J., Bent S.J., Cochran M.H., McElwain T.F, Scoles G.A., Suarez C.E., Davey R., Howell J.M., Lohmeyer K., Li A.Y., Guerrero F.D., Kammlah D.M., Phillips P., Pound J.M., The Group for Emerging Babesioses and One Health Research and Development in the U.S. 2010. One Health approach to identify research needs in bovine and human Babesioses: workshop report. *Parasites & Vectors.* 3:36.

Pérez de la Rosa J.J., Vargas U.P., Álvarez J.A., Rojas M.C., González V.M., Figueroa J.V. 2012. Identificación inicial de genes en *Babesia bigemina* mediante análisis de Etiquetas de Secuencia Expresadas en el estadio intraeritrocítico del parásito. *Rev Mex Cienc Pecu.* 3(Supl 1):61-87.

Petersen T.N., Brunak S., Von H.G., Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Method.* 8:785-786.

Pipano E. 1995. Live vaccines against hemoparasitic diseases in Livestock. *Vet Parasitol.* 57:213-231.

Quiroz R.H., 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, SA de CV. México, D.F.

Ramírez-Cruz G.T., Domínguez-Alpizar J.L., Sierra E.M. 1997. La inmunización contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* como método de control de la babesiosis bovina. *Rev Biomed.* 8:240-246.

Ravindran R., Mishra A.K., Rao J.R. 2007. Slide enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. *Vet Res Comm.* 31(8):999-1004.

Reiss M., Viebig N., Brecht S., Fourmaux M.N., Soete M., Di Cristina M., Dubremetz J.F., Soldati D., 2001. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* 152:563-578.

Ristic M., Kreier J.P. 1981. New York: Academic Express.

Rodríguez S.D., Buening G.M., Carson C. 1993. Caracterización bioquímica preliminar de clonas de *Babesia bovis* irradiadas con cobalto. *Tec Pec Méx.* 31:16-24.

Rojas M.C., Figueroa J.V., Álvarez J.A., 2009. Cultivo in vitro de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, CENID-PAVET, INIFAP. Folleto técnico. No.5.

Rojas C., Figueroa J.V., Alvarado A., Mejía P., Mosqueda J.J., Falcón A., Vega C.A., Álvarez A. 2006. Bovine Babesiosis live vaccine production use of gamma irradiation on the substrate. *Ann N Y Acad Sci.* 1081: 405–416.

Romero R.R., González B.A., Nevárez G.A., Rodríguez T.L. 2011. Informe de tres casos de rabia parálitica y babesiosis bovina en el municipio de Aldama, Tamaulipas. *Vet Méx.* Vol. 42 (4):331-338.

Ruef B.J., Dowling S.C, Conley P.G., Perryman L.E., Brown W., Jasmer D.P., Rice-Ficht A.C. 2000. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. *Mol Biochem Parasitol.* 105:1–12.

Salama A.A., Terkawi M.A., Kawai S., Aboulaila M., Nayel M., Mousa A., Zaghawa A., Yokoyama N., Igarashi I., 2013. Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp Parasitol.*135:623-628.

Sam-Yellowe. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. 1996. *Parasitol Today.* 12: 8.

Schettters T., Montenegro-James S. 1995. Vaccines against Babesiosis using soluble parasite antigens. *Parasitol Today.* 1(12):456-462.

Schettters T. 2005. Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol.* 21(4): 79-184.

Schnittger L., Rodriguez A.E., Florin-Christensen M., Morrison D.A. 2012. *Babesia*: A world emerging infection. *Genetics and Evolution.*12:1788–1809.

Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS* (1998). 95: 5857-5864.

Silva M.G., Ueti M.W., Norimine J., Florin-Christensen M., Bastos R.G., Goff W.L., Brown W.C., Oliva A., Suarez, C.E., 2010. Babesia bovis expresses a neutralization-sensitive antigen that contains a microneme adhesive repeat (MAR) domain. Parasitol Int .59:294-297.

Shompole S., Musoke A.J., Wells C.W., Mcguire T.C., Perryman L.E., Rurangirwa, F.R. 1995. Monoclonal Antibody to a Conserved Epitope on Proteins Encoded by Babesia bigemina and Present on the Surface of infected erythrocytes. 1995. Infect. Immun. 63(9):3507.

Smith, R.D., James, M.A., Ristic, M. Aiakawa, M. y Vega, C.A.1981. "Bovine babesiosis: Protection of cattle with culture-derived soluble Babesia bovis antigen". Science 212:335-338.

Smith T., Kilbourne E.L., 1893. Investigation into the nature causation and prevention of southern cattle fever. US Dept. Agri. Bur. Anim. Ind. Bull. 1:1–311.

Solorio-Rivera J.L., Rodríguez-Vivas R.I. 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina I, Componentes Epidemiológicos. Rev Biomed. 8:37-47.

Suarez C.E., Palmer G.H., Jasmer D.P., Hines S.A., Perryman L.E., McElwain T.F., 1991. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton Babesia bovis merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. Mol Biochem Parasitol. 46:45-52.

Suarez C.E, McElwain T.F, Stephens E.B, Mishra V.S, Palmer G.H.1991 Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of Babesia bovis, Babesia bigemina and other apicomplexa. Mol Biochem Parasitol. 49(2):329-32.

Suarez C.E., Palmer G.H., Florin-Christensen M., Hines S.A., Hotze, I., McElwain T.F., 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the Babesia bigemina rap-1 locus. Mol Biochem Parasitol. 127:101-112.

Terkawi M.A., Seuseu F.J., Eko-Wibowo P., Huyen N.X., Minoda Y., AbouLaila M., Kawai S., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I., 2011. Secretion of a new spherical body protein of Babesia bovis into the cytoplasm of infected erythrocytes. Mol Biochem Parasitol. 178:40-45.

Terkawi M.A., Huyen N.X., Wibowo P.E., Seuseu F.J., Aboulaila M., Ueno A., Goo Y., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011. Spherical Body Protein 4 is a new serological antigen for global detection of Babesia bovis infection in cattle. Clinical and Vaccine Immunology. 18(2): 337–342.

Thompson K. C, Todorovic R. A, Hidalgo R. J. 1977. Antigenic variation of Babesia bigemina. Res Vet Sci. 23(1):51-4.

Thompson K.C, Todorovict R.A, Hidalgo R.J.1978. The immune responses to antigenic variants of *Babesia bigemina* in the bovine. Res Vet Sci. 24(2):234-7.

Torina A., Agnone A., Sireci G., Mosqueda J.J., Blanda V., Albanese I., La Farina M., Cerrone A., Cusumano F., Caracappa S., 2010. Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. Transboundary and emerging diseases. 57:52-56.

Tyler J.S., Treeck M., Boothroyd J.C. 2011. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. Trends in Parasitol. 27(9): 410-420.

United States Animal Health Association. 2008. Foreign animal diseases seventh edition. Babesiosis.147-158.

Uilenberg G. 2006. Babesia A historical overview. Vet Parasitol. 138; 3-10.

Vallejo E. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.

Vega y M., C.A.: "Actualidad e Importancia de las Enfermedades causadas por los Hemoparásitos" En: Vega y M. *et al.* (Editores) "GARRAPATAS Y ENFERMEDADES QUE TRANSMITEN". pp. 144-152. MEMORIAS II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos; México. Del 9 al 11 de octubre de 1991

Vial H.J., Gorenflot A. 2006. Chemotherapy against babesiosis. Vet Parasitol. 138: 147–160.

Vichido R., Falcón A., Ramos J.A., Álvarez A., Figueroa J.V., Norimine J., Brown W.C., Castro L.A., Mosqueda J. 2008. Expression Analysis of Heat Shock Protein 20 and Rhoptry-associated Protein 1a in Sexual Stages and Kinetes of *Babesia bigemina*. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann N Y Acad Sci. 1149: 136–140.

Yokoyama N., Okamura M., Igarashi I. 2006. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol. 138:22–32.

Young A. S, Morzaria S. P. 1986. Biology of Babesia. Parasitol Today. 2(8):211-9.

Zinecker C.F., Striepen B., Tomavo S., Dubremetz J.F., Schwarz R.T., 1998. The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. Mol Biochem Parasitol .97:241-246.

X. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias nucleotídicas obtenidas.

1. *ama-1* Cintalapa, Chiapas.

```
>readseq-I20141013-211548-0742-55260753-pg_sequence_1 1788 bp
ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTTTTTCTATGG
CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
TCCACGAGAGGCCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCATCAACAGGCGACTTCTAGT
ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
AAGCTTATCCCACAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
CACGGATCCGGTATTTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
CGTATGCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGGTGGC
GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCGGAG
ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
TACAGGTACCCCTTCGTCTATGATGGAAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCG
ATGCAGTACAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCGAAGGAAGGGCCT
AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGA
TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCATTAAGGACGCC
ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
GTGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTGAACATTCAGCTGCGGATGTTGAC
ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
CTTCAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGCTGTTTGGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
GCCACACTTTCCAAGGTGTGCGTATGAACTGGGCGAACTACGAGTCCGAAACCGGTGTT
TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ACCGCCCTCGGTTCCCGTTGGAGTCTGACGCCATTAACATCCCATGCCACATCGACACC
CTTGGTTACGTGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACGAAGCTCAACTGA
```

2. *gp45* Cintalapa, Chiapas.

```
>readseq-I20141013-212530-0489-24966918-pg_sequence_1 1059 bp
ATGATGCTCGCTAAGTTTTCTATCGCAGCGCTGTGCTGCTTAATCGCACAACTGTTTCGT
GCTTCAACAGAACCTGTTATCGTTCCTGGTAGTAGTCGCACAAGTGATCCTTTTGGAAATG
CGGTTGCGAAGACAGCCACGCACGTTGCGTGAAGAAATGCATATTGTTAGCAATTTGCTA
GATGTAGAACCTATAGTAGGGATGTATGGTAAGAACAACCCGGTGTGCCCCGAAGATGTG
CCCCAAAGGGGAGAAAGTAGCAGATATAAATGCGAAGCTAGCGACACTGAAGGCATTAATT
GACGGGGAGAAGTGGATTTTCCACGATTCACCTTGTGGTGGAACTCCCTAATTACCAGGGA
GTTAATCGCTATGTGTTTTTCAAGGGTCTTTTGAAGTCTATGGCACTGAAATTGGAGACT
TTATATGGATTTTTGTGCGACTGCTACTGACGTGCCAGAAAGTGAATTTGGCGAAAAAGCG
ATCGAATTGAATTTGGTTAAGGAGAATGAAATAGTTGAAGGATTGAATTTGGAAAACCTC
CAGATGTTCTTGAAGGTATTTTATAACAAAACAGCCCTCTTTTCTCCTTACTAAATCTT
```

TTCGATGAGTACGAGGCTAATTTATCACCGAGAGATATATGGTCGGCGAGCACACATCCT
TTTGATAAGTTTTATAAAGATACGGATGGGGAATCGGAGGGGTTGAGTACTCTTGACGAA
AGCAATTCAGAATGGAAATCCACGTTCCGGACACTGTTAAACTGCCGAATTTGTCGGTG
GATGTAGAGGAACCTGGAGTGGTTGTTAGAGAAGATGCGGAAGCGGAGGCTGTACAGGTT
AATGGGGAGAGGGCTCTTTTCGGGTGCCACCACACATGGCGGGCAGCGAGGGGGCTGAAC
CCAACTCCAGGCGCAACTTCTTCTTCTTCTACTACTACTACATCGGAGTCCACGTCTTTA
AGGTCTGGAGCTGCCGAGGCATCACCGAAGAAGGCATCTTCTGCATTCGAGCCGTTTGTA
ATGCTGCTTATTGTTATGAGTGTCTGCTTTTACATTTTAA

3. *rap1-α1* Cintalapa, Chiapas.

```
>readseq-I20141013-213157-0578-93407979-oy_sequence_1 1443 bp
ATGAGGAGCTTCTTGGGTGTGTGTTTTGGAGCTCTCTTGCTCGTAGCAAGGAGCGGTTCT
GCTATTTCGCTATACTCACCGTTCCGGGTGTTATGTTCAGCAGAGGTGGTTGGAGATGTGTCC
AAGACCTTGCTGGCAGCCAACGAGGTTGTCAATGCTGAAATGGAAGCAGCTCAGATTAAC
GAAGATATGAAGATTCAGTTGGCGAACGTCAAGGAGACCATCGTTGATGAGGTCTGCAGA
AAAGATGCTGGAAGCCCTACGTGCCGCAAGAGCGTAATTGCCTATGTTGACCGTTGTGAT
GAGGGCGATTGTCTGACGCTTGACAGCATGAAGTACAAGCCGTTGAGTCTGCCGAATCCT
TACCAGTTGGACGCTGCCTTCATGCTTTTTCAGGGAAAGTGATTCTAACCCCTGCGAAGAAT
GAGGTGAAGTGCTTCTGGATGCGTTCGAGGAGCAGCCACGGCGACTACCATCACTTTGTT
GTTAGCTTGTTGAAGAAGAATGTTGTACGCGACCCTGAATCCAATGATGTTGAGAATTC
GCATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTACTACAAGACTTACCTGACCGTTGACTTT
ACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTCACAACCTCGCCTGTTTCGGTTTTCGGTATC
CAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCCTTGACCTTGGAACCCGCCCT
GAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCT
GCGATGACCTCGTTTCGCTGAGCGTTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACC
GTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTC
ATTGTGAACTTCTTTACTGACCCTGCCAAGTTGATTATGAAGCACGTCTCTCAGCCTGTA
AAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCCGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGAATGTGCTC
GGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAGGAG
CCTAGCCAACAATAATTTCGTGAGAAGCTGCCTCACTACCTTTCTAAGGCAAAGGGAGCC
GTTGAGCACGTTGTTAAGAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCAAAGGGCGACCAA
CCATCCGAAGCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCCGCTTGCGGATTCCGCGGAAACTGAATTT
GAGGTCCCTGAAGAACAATACGTGATGCTGTTACTACTCAGCAGGTTAACAGCGAGAAG
GTTGATGCCGACGATGCGGGTAATGCCGAAACCCAGCAGCTTCCAGATGCAGAAAATGAA
GTGCGCGCTGATGACCCAAAAATGAAGATCTTCAAGTTCTTCAAGTTCTTTCAGATGAT
TCA
```

4. *rap1-α1* Martínez de la Torre, Veracruz.

```
>readseq-I20141013-213322-0425-84589602-es_sequence_1 1443 bp
ATGAGGAGCTTCTTGGGTGTGTGTTTTGGAGCTCTCTTGCTCGTAGCAAGGAGCGGTTCT
GCTATTTCGCTATACTCACCGTTCCGGGTGTTATGTTCAGCAGAGGTGGTTGGAGATGTGTCC
AAGACCTTGCTGGAAGCCAATGAGGTTGTCAATGCTGAAATGGAAGCAACTCAGGTCAAC
AAAGATATGCAAAGTCAATTGTCTAATGTTAAGGAGACCATTGTTGGTGAGGTCTGCGAG
AAAGTTGCTGGAAGCTCTACCTGCGGTGAGAGCGTAATTGCCTATGTTAACCGTTGTGAT
GAGGGCGATTGTCTGACGCTTGACAGCATGAAGTACAAGCCGTTGAGTCTGCCAAATCCT
TACCAGTTGGACGCTGCCTTCATGCTTTTTCAGGGAAAGTGATTCTAACCCCTGCGAAGAAT
GAGGTGAAGCGCTTCTGGATGCGTTCGAGGAGCAGCCACGGCGACTACCATCACTTTGTT
GTTAGCTTGTTGAAGAAGAATGTTGTACGCGACCCTGAATCCAATGATGTTGAGAATTC
GCATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTACTACAAGACTTACCTGACCGTTGACTTT
ACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTCACAACCTCGCCTGTTTCGGTTTTCGGTATC
CAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCCTTGACCTTGGAACCCACCCT
GAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCT
```

GCGATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACC
GTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTC
ATTGTGAACCTTCTTTACTGACCCTGCCAAGTTGATTATGAAGCACGTCTCTCAGCCTGTA
AAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCCGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGAATGTCGTC
GGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAGGAG
CCTAGCCAACAAATAATTTCGTGAGAAGCTGCCTCACTACCTTTCTAAGGCAAAGGGAGCC
GTTGAGCACGTTGTTGACAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCAAAGGGCGACCAA
CCATCCGAAGCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCGGTCTGGCGATTCCGCGGAAACTGAATTT
GAGGTCCCTGAAGAACAATACGTCGATGCTGTTACTACTCAGGAGGTTAACAGCGAGAAG
GTTGATGCCGACGATGCGGGTAATGCCGAAACCCAGCAGCTTCCAGATGCAGAAAATGAA
GTGCGCGCTGATGACCCCAAAAATGAAGATTCTTCAAGTTCTTCAAATGATTGATGAG
TAA

5. *rap1-α1* Tamasopo, San Luis Potosí.

>readseq-I20141013-213434-0740-92784519-pg_sequence_1 1443 bp
ATGAGGAGCTTCTTGGGTGTGTGTTTTGGAGCTCTCTTGCTCGTAGCAAGGAGCGGTTCT
GCTATTCGCTATACTACCGTTTCGGGTGTTATGTCAGCAGAGGTGGTTGGAGATGTGTCC
AAGACCTTGCTGGAAGCCAATGAGGTTGTCAATGCTGAAATGGAAGCAACTCAGGTCAAC
AAAGATATGCAAAGTCAATTGTCTAATGTTAAGGAGACCATTGTTGGTGAGGTCTGCGAG
AAAGTTGCTGGAAGCTCTACCTGCGGTGAGAGCGTAATTGCCTATGTTAACCGTTGTGAT
GAGGGCGATTGTCTGACGCTTGACAGCATGAAGTACAAGCCGTTGAGTCTGCCAAATCCT
TACCAGTTGGACGCTGCCTTCATGCTTTTTCAGGGAAAGTGATTCTAACCTGCGAAGAAT
GAGGTGAAGCGCTTCTGGATGCGTTCGAGGAGCAGCCACGGCGACTACCATCACTTTGTT
GTTAGCTTGTTGAAGAAGAATGTTGTACGCGACCCTGAATCCAATGATGTTGAGAATTC
GCATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTACTACAAGACTTACCTGACCGTTGACTTT
ACGGCGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTTCAACTCGCCTGTTTCGGTTTTCGGTATC
CAGAAGGCGTTGAAGCGTTTTGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGACCTTGAACCCACCCT
GAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCT
GCGATGACCTCGTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACC
GTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTC
ATTGTGAACCTTCTTTACTGACCCTGCCAAGTTGATTATGAAGCACGTCTCTCAGCCTGTA
AAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCCGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGAATGTCGTC
GGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAGGAG
CCTAGCCAACAAATAATTTCGTGAGAAGCTGCCTCACTACCTTTCTAAGGCAAAGGGAGCC
GTTGAGCACGTTGTTAAGAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCAAAGGGCGACCAA
CCATCCGAAGCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCGGTCTGGCGATTCCGCGGAAACTGAATTT
GAGGTCCCTGAAGAACAATACGTCGATGCTGTTACTACTCAGGAGGTTAACAGCGAGAAG
GTTGATGCCGACGATGCGGGTAATGCCGAAACCCAGCAGCTTCCAGATGCAGAAAATGAA
GTGCGCGCTGATGACCCCAAAAATGAAGATTCTTCAAGTTCTTCAAATGATTGATGAG
TCA

6. *rap1-α1* Río Grande, Brasil.

>readseq-I20141013-213554-0193-79059476-pg_sequence_1 1443 bp
ATGAGGAGCTTCTTGGGTGTGTGTTTTGGAGCTCTCTTGCTCGTAGCAAGGAGCGGTTCT
GCTATTCGCTATACTACCGTTTCGGGTGTTATGTCAGCAGAGGTGGTTGGAGATGTGTCC
AAGACCTTGCTGGCAGCCAACGAGGTTGTCAATGCTGAAATGGAAGCAGCTCAGATTAAC
GAAGATATGAAGATTGAGTTGGCGAACGTCAAGGAGACCATCGTTGATGAGGTCTGCAGA
AAAGATGCTGGAAGCCCTACGTGCCGCAAGAGCGTAATTGCCTATGTTGACCGTTGTGAT
GAGGGCGATTGTCTGACGCTTGACAGCATGAAGTACAAGCCGTTGAGTCTGCCAAATCCT
TACCAGTTGGACGCTGCCTTCATGCTTTTTCAGGGAAAGTGATTCTAACCTGCGAAGAAT
GAGGTGAAGTGCTTCTGGATGCGTTCGAAGAGCAGCCACGGCGACTACCATCACTTTGTT
GTTAGCTTGTTGAAGAAGAATGTTGTACGCGACCCTGAATCCAATGATGTTGAGAATTC

```
GCATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTACTACAAGACTTACCTGACCGTTGACTTT
ACGGCGGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTTCAACTCGCCTGTTTCGGTTTTCGGTATC
CAGAAAGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGTTGACCTTGGAACCCACCCT
GAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCT
GCGATGACCTCGTTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACC
GTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTC
ATTGTGAAGTTCTTTACTGACCCTGCCAAGTTGATTATGAAGCACGTCTCTCAGCCTGTA
AAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCCGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTCGTC
GGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAGGAG
CCTAGCCAACAAATAATTTCGTGAGAAGCTGCCTCACTACCTTTCTAAGGCAAAGGGGAGCC
GTTGAGCACGTTGTTAAGAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCAAAGGGCGACCAA
CCATCCGAAGCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCCGTCTGGCGATTCCGCGGAAACTGAATTT
GAGGTCCCTGAAGAACAATACGTGATGCTGTTACTACTCAGCAGGTTAACAGCGAGAAG
GTTGATGCCGACGATGCGGGTAATGCCGAAACCCAGCAGCTTCCAGATGCAGAAAATGAA
GTGCGCGCTGATGACCCCAAAAATGAAGATTCTTCAAGTTCTTCAAGTTCTTTCAGATGAT
TCA
```

7. *rap1-α1* Rondonia, Brasil.

```
>readseq-I20141013-213706-0204-53115738-pg_sequence_1 1443 bp
ATGAGGAGCTTCTTGGGTGTGTGTTTTGGAGCTCTCTTGCTCGTAGCAAGGAGCGGTTCT
GCTATTTCGCTATACTCACCGTTTCGGGTGTTATGTCAGCAGAGGTGGTTGGAGATGTGTCC
AAGACCTTGCTGGAAGCCAATGAGGTTGTCAATGCTGAAATGGAAGCAACTCAGGTCAAC
AAAGATATGCAAAGTCAATTGTCTAATGTTAAGGAGACCATTGTTGGTGAGGTCTGCGAG
AAAGTTGCTGGAAACTCTACCTGCGGTGAGAGCGTAATTGCCTATGTTAACCGTTGTGAT
GAGGGCGATTGTCTGACGCTTGACAGCATGAAGTACAAGCCGTTGAGTCTGCCAAATCCT
TACCAGTTGGACGCTGCCTTCATGCTTTTTCAGGGAAAGTGATTCTAACCTGCGAAGAAT
GAGGTGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCGAGGAGCAGCCACGGCGACTACCATCACTTTGTT
GTTAGCTTGTGGAAGAAGAATGTTGTACGCGACCCTGAATCCAATGATGTTGAGAAGTTT
GCATCGCAGTACTTCTACATGACTACGTTGTACTACAAGACTTACCTGACCGTTGACTTT
ACGGCGGGCTAAGTTCTTCAACAAGCTTGCTTTTCAACTCGCCTGTTTCGGTTTTCGGTATC
CAGAAGGCGTTGAAGCGTTTGGTTAGGAGCAACCTTCCCGCTGACCTTGGAACCCACCCT
GAGGCCACCATCCGCGAAATAGCTAGCGGGCTACGGCGAGTACATGATGACCCAGGTGCCT
GCGATGACCTCGTTTCGCTGAGCGTTTCTCCAAGATGGCTACTAAGACTCTGTTGGTTACC
GTCAGCGACTACGTCCATTTGCCCGCGTACAAGAGGTGGTACAGGAAGTTCAAGGAGTTC
ATTGTGAAGTTCTTTACTGACCCTGCCAAGTTGATTATGAAGCACGTCTCTCAGCCTGTA
AAGACTGCCTACACAAAGCTGGTCCCCGAAGAGCACAGGCAGGCTATCAGGGATGTCGTC
GGTCAAAGCACCAAGCATATTGCCAACGGTGTACGTGATTTGGCAAGGATGATTAAGGAG
CCTAGCCAACAAATAATTTCGTGAGAAGCTGCCTCACTACCTTTCTAAGGCAAAGGGGAGCC
GTTGAGCACGTTGTTAAGAAGGTTAAATCCGTTGTGCCGATAAAGCAAAGGGCGACCAA
CCATCCGAAGCAGCTGTAGAGGAAACCGTTCCGTCTGGCGATTCCGCGGAAACTGAATTT
GAGGTCCCTGAAGAACAATACGTGATGCTGTTACTACTCAGCAGGTTAACAGCGAGAAG
GTTGATGCCGACGATGCGGGTAATGCCGAAACCCAGCAGCTTCCAGATGCAGAAAATGAA
GTGCGCGCTGATGACCCCAAAAATGAAGATTCTTCAAGTTCTTCAAGTTCTTTCAGATGAT
TCA
```

8. *mic-1* Cintalapa, Chiapas

```
>readseq-I20141013-214321-0507-16709615-oy_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTCCAGATGATTATGATTGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACCTACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGAGCTGTGA
```


9. *mic-1* Martínez de la Torre, Veracruz.

```
>readseq-I20141013-214417-0429-30260505-es_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAATACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTCCAGATGATTATGATTGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACCTACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGAGCTGTGA
```

10. *mic-1* Tamasopo, San Luis Potosí.

```
>readseq-I20141013-214524-0125-864335-es_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAGTATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTCCAGATGATTATGATTGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACATAACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
```

11. *mic-1* Soto la Marina, Tamaulipas.

```
>readseq-I20141013-214621-0356-58863259-pg_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTCCAGATGATTATGATCGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACATAACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
```

12. *mic-1* Río Grande, Brasil.

```
>readseq-I20141013-214718-0150-85552456-pg_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTCCAGATGATTATGATTGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACATAACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
```

13. *mic-1* Rondonia, Brasil.

```
>readseq-I20141013-214801-0734-27396752-oy_sequence_1 267 bp
ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATCGATTAC
AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGTTTCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
GCCGAAATACTGAAAACATAACAAGAACGTGGACCAGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
```

Anexo 2. Alineamientos múltiples.

1. Alineamiento múltiple de la proteína AMA-1.

Australia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRNQQATSS
SP3-Argentina	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRNQQATSS
8CTItalia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
6PA-Italia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
5RG-Italia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQDEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
4PG-Italia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Chiapas	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
7PA-Italia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Sicilia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Turquia	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
M1P-Argentina	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Argentina	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
M1A-Argentina	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Corrientes	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Ragusa	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
Benevento	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSTRGTRRSSRSSRHQQATSS
México	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSMEISPAGCAFVTFQNEPTSARGTRRSSRSSRHQQATSS
Río	MQCILNRITLLATPVIFFLWLSTEISPAGCAFVTFQNEPTSARGTRRSSRSSRHQQATSS

*****:*****:*****:*****:*****.*****

Australia	TSQAGAGEATERTGGRAAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
SP3-Argentina	TSQAGAGEATERTGGRAAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
8CTItalia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
6PA-Italia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
5RG-Italia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
4PG-Italia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Chiapas	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
7PA-Italia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Sicilia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Turquia	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
M1P-Argentina	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGSKYY
Argentina	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
M1A-Argentina	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Corrientes	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Ragusa	TSEAGAGEATERAGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Benevento	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
México	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY
Río	TSQAGAGEATERTGGRTAGSKLIPQTPWTRYMIKYDIARCHGSGIFVDIGGYEAVGNKYY

:***:***:*****.***

Australia	RMPTGKCPVMGKVINLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGSIH
SP3-Argentina	RMPTGKCPVMGKVINLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGSIH
8CTItalia	RMPTGKCPDMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
6PA-Italia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
5RG-Italia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
4PG-Italia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Chiapas	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
7PA-Italia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Sicilia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Turquia	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
M1P-Argentina	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Argentina	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
M1A-Argentina	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Corrientes	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Ragusa	RMPTGKCPVMGKVISLASGADLLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Benevento	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
México	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH
Río	RMPTGKCPVMGKVISLASGADFLEPISADNPRYRGLAFPETVIKHTGASAGALTNAGNIH

Ragusa	RQHDDYDRILMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRTRDAYIWGEAAARPSDITPVHMAKLN
Benevento	RQHDDYDRILMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRTRDAYIWGEAAARPSDITPVHMAKLN
México	RQHDDYDRILMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRTRDAYIWGEAAARPSDITPVHMLTKLN
Río	RQHDDYDRILMSKYEYDDVSHDNIEPEHQLRTRDAYIWGEAAARPSDITPVHMLTKLN
	*****.***** **::**

2. Alineamiento múltiple de la proteína GP45.

Australia	MILAKVSFAALCCFIAQAVRSTDPVIVPGTSRPSDFPGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Chiapas	MMLAKFSIAALCCLIAQTVRASTEPIVPGSSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSNLL
Argentina	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
SA2	-----VPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
SD3	-----VPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Sudafrical	-----VPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
SD	-----VPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
México	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Méx2	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Guerrero	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
México (J. Mosqueda)	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Nayarit	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Seed	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Jalisco	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
Véracruz	MMLATFSIAALCCLIAQTVRSTDPVIVPGTSRTSDPFGMAVAEQPRTLREEMHIVSKLL
	: *****:***

Australia	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Chiapas	DVEPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Argentina	DVQPIVGMYGKDKPVLPEVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
SA2	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
SD3	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Sudafrical	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVEVPNYQG
SD	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVEVPNYQG
México	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Méx2	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Guerrero	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLAALKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
México (J. Mosqueda)	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLAALKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Nayarit	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Seed	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Jalisco	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLAALKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
Véracruz	DVQPIVGMYGKPKVLPEDVDPQREKVADINAKLATLTKALIDGKWI FHDLSLVVELPNYQG
	::***:*** * *****:*****:*****:***

Australia	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
Chiapas	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLNLENL
Argentina	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
SA2	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
SD3	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
Sudafrical	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
SD	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
México	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
Méx2	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
Guerrero	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLKLN
México (J. Mosqueda)	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLKLN
Nayarit	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLAKENEIVEGLDLENL
Seed	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLKLN
Jalisco	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
Véracruz	VNRYVFFKGLLKSMAKLETLYGFLSTATDVPESDLAKKAIELNLVKENEIVEGLDLENL
	*****:***** *****.*****:***

Australia	QMFLKVFYKNKNSPLFTLLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDQFYKDTDGESEGLSTLDE
Chiapas	QMFLKVFYKNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTDGESEGLSTLDE
Argentina	QMFLKVFYKNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTDGESEGLSTLDE

SA2	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTDGESEGLSTLDE
SD3	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTDGESEGLSTLDE
Sudafrical	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTYGESEGLSTLDE
SD	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYKDTDGESEGLSTLDE
México	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Méx2	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Guerrero	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
México (J.Mosqueda)	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Nayarit	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Seed	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Jalisco	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
Véracruz	QMFLKVFYFNKNSPLFSLNLFDEYEANLSPRDIWSASTHPFDKFKYEDTDGESEGLSTLDE
	*****:*****:*** ** *
Australia	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEAEAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Chiapas	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEAEAVQVNGERALSATTHGGDARGVN
Argentina	SNSRMEIHAPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
SA2	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
SD3	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Sudafrical	SNSRMEINVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
SD	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
México	SNSRMEIHVPDAVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Méx2	SNSRMEIHVPDAVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Guerrero	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
México (J.Mosqueda)	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Nayarit	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Seed	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Jalisco	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
Véracruz	SNSRMEIHVPDPTVKLPNLSVDVEEPGVVVREDAEADAVQVNGERAVSGATTHGGDARGVN
	*****.***:*****:*****.*** *****:*****.***
Australia	PTPGVTST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Chiapas	PTPGATSSSSTTTTTSESTSLRSGAAEASPKKASSAFEPFVMLLI VMSAAFTF
Argentina	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
SA2	PT-----
SD3	PT-----
Sudafrical	PT-----
SD	PT-----
México	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Méx2	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Guerrero	PTPGVTSST--TTTTPEPTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
México (J.Mosqueda)	PTPGVTSST--TTTTSEPTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Nayarit	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Seed	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Jalisco	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
Véracruz	PTPGVTSST--TTTTSESTSLRSGAAEASPKKASYAFEPFAMLLI VMSAAAF
	**

3. Alineamiento múltiple de la proteína RAP1- α 1.

Australia	MRSLLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEAAQIN
Puerto	-----
P	-----
Texcoco	-----
S1A	-----
CGP	-----
CGA	-----
Chiapas	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEAAQIN
Rio	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEAAQIN
México1	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEAAQIN
S2P	-----
UYA	-----
p58-1	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEATQVN
México2	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEATQVN
p58-2	MRSFLGVCFGALLLVARSASAIRYTHRSGVMSAEVVGDVSKTLLAANEVVAEMEATQVN

Vacunal	MRSFLGVCFGALLLVARS	SGSAIRYTHRSGVMSAEVVG	DVSKTLLLEANEVVNAEMEATQVN
Veracruz	MRSFLGVCFGALLLVARS	SGSAIRYTHRSGVMSAEVVG	DVSKTLLLEANEVVNAEMEATQVN
Tamasopo	MRSFLGVCFGALLLVARS	SGSAIRYTHRSGVMSAEVVG	DVSKTLLLEANEVVNAEMEATQVN
Rondonia	MRSFLGVCFGALLLVARS	SGSAIRYTHRSGVMSAEVVG	DVSKTLLLEANEVVNAEMEATQVN
Australia	EDMKIQLANVKQTI	VDEVCRKDAGSPTCRKN	VIAYVDRCD
Puerto	-----	-----	-----
P	-----	-----	-----
Texcoco	-----	-----	-----
S1A	-----	-----	-----
CGP	-----	-----	-----
CGA	-----	-----	-----
Chiapas	EDMKIQLANVKETI	VDEVCRKDAGSPTCRKS	SVIAYVDRCD
Rio	EDMKIQLANVKETI	VDEVCRKDAGSPTCRKS	SVIAYVDRCD
México1	EDMKIQLANVKETI	VDEVCRKDAGSPTCRKS	SVIAYVDRCD
S2P	-----	-----	-----
UYA	-----	-----	-----
p58-1	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
México2	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
p58-2	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
Vacunal	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
Veracruz	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
Tamasopo	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
Rondonia	KDMQSQLSNVKETI	VGEVCEKVAGNSTCGE	SVIAYVNRCD
Australia	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Puerto	-----	-----	-----F
P	-----	-----	-----F
Texcoco	-----	-----	-----F
S1A	-----	-----	-----F
CGP	-----	-----	-----F
CGA	-----	-----	-----F
Chiapas	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKCFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Rio	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKCFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
México1	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKCFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
S2P	-----	-----	-----F
UYA	-----	-----	-----F
p58-1	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
México2	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
p58-2	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Vacunal	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Veracruz	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Tamasopo	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Rondonia	YQLDAAFMLFRES	DSNPAKNEVKRFWMRS	RSRSSHGDYHHFVVS
Australia	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Puerto	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
P	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Texcoco	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
S1A	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
CGP	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
CGA	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Chiapas	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Rio	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
México1	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
S2P	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
UYA	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
p58-1	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
México2	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
p58-2	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Vacunal	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Veracruz	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Tamasopo	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
Rondonia	ASQYFYMTTLYYKTY	LTVDFTA	AAKFFNKLAFTTR
*****:***:*****.****:*			

S1A	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
CGP	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
CGA	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
Chiapas	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
Rio	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
México1	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
S2P	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
UYA	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
p58-1	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
México2	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
p58-2	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
Vacunal	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSDSDA
Veracruz	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSNDSE
Tamasopo	EVPEEQYVDAVTTQEVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD
Rondonia	EVPEEQYVDAVTTQQVNSEKVDADDAGNAETQQLPDAENEVRADDPKNESSSSSSSSDD

*****: **:*:*****:*.*****..**

Australia	---
Puerto	SDA
P	SDA
Texcoco	SDA
S1A	SDA
CGP	SDA
CGA	SDA
Chiapas	S--
Rio	S--
México1	---
S2P	---
UYA	SDA
p58-1	---
México2	---
p58-2	---
Vacunal	---
Veracruz	---
Tamasopo	S--
Rondonia	S--

4. Alineamiento múltiple de MIC-1.

Australia	MQLDMDEYCAATNGGITMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
Rondonia-Brasil	MQLDMDEYCAATNGGITMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
SLM-Tamps	MQLDMDEYCAATNGGITMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
Chiapas	MQLDMDEYCAATNGGLTMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
Veracruz	MQLDMDEYCAATNGGITMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
Tamasopo-SLP	MQLDMDEYCAATNGGLTMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT
RioGrande-Brasil	MQLDMDEYCAATNGGLTMCARCENIETLKCYCVQMIMIDYSSDTNQCLNNCSSPTKCAGT

*****:*****.*****

Australia	AEILKTYKNVDPTVIKRLHHKYCGKHAL
Rondonia-Brasil	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHAL
SLM-Tamps	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHAL
Chiapas	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHEL
Veracruz	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHEL
Tamasopo-SLP	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHAL
RioGrande-Brasil	AEILKTYKNVDQTVIKRLHHKYCGKHAL

***** ***** *

Australia ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGCGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
Rondonia ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
SotoLaMarina ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA
Tamasopo ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
RioGrande ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
Chiapas ATGCAATTGGATATGGACGAGTACTGTGCAGCGACAAACGGCGGCCTAACGATGTGCGCA
Veracruz ATGCAATTGGATATGGACGAATACTGTGCAGCGACAAACGGCGGAATAACGATGTGCGCA

Australia CGATGTGAAAACATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATTGATTAC
Rondonia CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATCGATTAC
SotoLaMarina CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATCGATTAC
Tamasopo CGATGTGAAAAGTATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATTGATTAC
RioGrande CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATTGATTAC
Chiapas CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATTGATTAC
Veracruz CGATGTGAAAATATCGAAACTTTGAAATGCTACTGCGTTCAGATGATTATGATTGATTAC

Australia AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
Rondonia AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
SotoLaMarina AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
Tamasopo AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
RioGrande AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
Chiapas AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC
Veracruz AGCTCTGACACGAACCAATGCCTCAACAATTGCTCCTCCCCGACGAAATGCGCTGGAACC

Australia GCCGAAATACTGAAAACCTACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
Rondonia GCCGAAATACTGAAAACATACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
SotoLaMarina GCCGAAATACTGAAAACATACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
Tamasopo GCCGAAATACTGAAAACATACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
RioGrande GCCGAAATACTGAAAACATACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
Chiapas GCCGAAATACTGAAAACCTACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC
Veracruz GCCGAAATACTGAAAACCTACAAGAACGTGGACCCGACGGTCATAAAGAGGTTACACCAC

Australia AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
Rondonia AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
SotoLaMarina AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
Tamasopo AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
RioGrande AAGTACTGCGGTAAGCATGCGCTTTGA
Chiapas AAGTACTGCGGTAAGCATGAGCTGTGA
Veracruz AAGTACTGCGGTAAGCATGAGCTGTGA

5. Alineamiento múltiple de la proteína SBP4.

Australia FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVW
Kutter FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVW
Acayucan FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVW
Tamasopo FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVW
Chiapas FDNVIEVTFQEHGESDNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGAPRTPVVYTPVRPNKLRHLVW
B38-Salta, Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
Brasil -----YTPVRPNKLRHLVW
M1A-Corrientes, Argerntina -----YTPVRPNKLRHLVW
M1P -----YTPVRPNKLRHLVW
M2P, Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
M30-Salta, Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
México -----YTPVRPNKLRHLVW
S1A-Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
S2A-Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
S2P-Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW
S3P-Argentina -----YTPVRPNKLRHLVW

Colombia	-----YTPVRPNKLRHLVW *****
Australia	SDTVHGVGDDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFVSEHKYQEEL
Kutter	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
Acayucan	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
Tamasopo	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
Chiapas	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
B38-Salta, Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
Brasil	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
M1A-Corrientes, Argerntina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
M1P	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
M2P, Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
M30-Salta, Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
México	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
S1A-Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
S2A-Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
S2P-Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
S3P-Argentina	SDTVHGVGEDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL
Colombia	SDTVHGVGDDDEDTEIKVTVHHTHCHETLIEVSLGSTKVHYLGRDGEFEFISEHKYQEEL *****.*****.*****.*****

Australia	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Kutter	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Acayucan	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Tamasopo	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Chiapas	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
B38-Salta, Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Brasil	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
M1A-Corrientes, Argerntina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
M1P	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
M2P, Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
M30-Salta, Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
México	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
S1A-Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
S2A-Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
S2P-Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
S3P-Argentina	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH
Colombia	REMTKTIVVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSDKVVAGNVTVWTGVGCH *****

Australia	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAA
Kutter	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAA
Acayucan	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAA
Tamasopo	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAA
Chiapas	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAA
B38-Salta, Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
Brasil	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
M1A-Corrientes, Argerntina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
M1P	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
M2P, Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
M30-Salta, Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
México	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
S1A-Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
S2A-Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
S2P-Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
S3P-Argentina	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE-----
Colombia	QRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE----- *****

Australia	GKNSVDAEVRKEVEEHQ
Kutter	GKNSVDAEVRKEVEEHQ
Acayucan	GKNSVDAEVRKE-----
Tamasopo	GKNSVDAEVRKE-----
Chiapas	GKNSVDAEVRKEVEEHQ
B38-Salta, Argentina	-----
Brasil	-----
M1A-Corrientes, Argerntina	-----

M1P -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
México -----
S1A-Argentina -----
S2A-Argentina -----
S2P-Argentina -----
S3P-Argentina -----
Colombia -----

Brasil -----
S2P-Argerntina -----
México -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
Veracruz -----CACC
Kuttler ATGGTCGCCATTTTCGGCCGCTTTCGTCGCCTGCATTTTCGGCCTGACGGCCGTGCGCGGT
Tamasopo -----CACC
B38. Salta, Argentina -----
M1A-Corrientes, -----
M1P-Corrientes, -----
S1A-Argentina -----
S2A-Argentina -----
S3P-Argentina -----
Chiapas -----CACC
Colombia -----
Australia ATGGTCGCCATTTTCGGCCGCTTTCGTCGCCTGCATTTTCGGCCTTACGGCCGTGCGCGGT

Brasil -----
S2P-Argerntina -----
México -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
Veracruz TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
Kuttler TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
Tamasopo TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
B38. Salta, Argentina -----
M1A-Corrientes, -----
M1P-Corrientes, -----
S1A-Argentina -----
S2A-Argentina -----
S3P-Argentina -----
Chiapas TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
Colombia -----
Australia TTTGACAATGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG

Brasil -----
S2P-Argerntina -----
México -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
Veracruz GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
Kuttler GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
Tamasopo GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
B38. Salta, Argentina -----
M1A-Corrientes, -----
M1P-Corrientes, -----
S1A-Argentina -----
S2A-Argentina -----
S3P-Argentina -----
Chiapas GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
Colombia -----

Australia GACCTGTCCATCCCCAGCGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT

Brasil -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 S2P-Argerntina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 México -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 M2P, Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 M30-Salta, Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Veracruz CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Kuttler CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Tamasopo CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 B38. Salta, Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 M1A-Corrientes, -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 M1P-Corrientes, -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 S1A-Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 S2A-Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 S3P-Argentina -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Chiapas CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Colombia -----TACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Australia CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG

Brasil AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 S2P-Argerntina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 México AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 M2P, Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 M30-Salta, Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Veracruz AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Kuttler AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Tamasopo AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 B38. Salta, Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 M1A-Corrientes, AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 M1P-Corrientes, AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 S1A-Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 S2A-Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 S3P-Argentina AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Chiapas AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Colombia AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Australia AGCGACACCCGTGATCCACGGCGTCGGTGAGGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC

Brasil GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 S2P-Argerntina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 México GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 M2P, Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 M30-Salta, Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Veracruz GTCCACACCCACTGCCATGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Kuttler GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Tamasopo GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 B38. Salta, Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 M1A-Corrientes, GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 M1P-Corrientes, GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 S1A-Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 S2A-Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 S3P-Argentina GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Chiapas GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Colombia GTCCACAACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Australia GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCCTATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC

Brasil TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 S2P-Argerntina TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 México TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 M2P, Argentina TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 M30-Salta, Argentina TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Veracruz TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Kuttler TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Tamasopo TACCTTGCCCGGATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC

B38.Salta, Argentina TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
M1A-Corrientes, TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
M1P-Corrientes, TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
S1A-Argentina TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
S2A-Argentina TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
S3P-Argentina TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
Chiapas TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
Colombia TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC
Australia TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAAGTACCAGGAGGAGCTC

Brasil CGCGAGATGACGAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
S2P-Argerntina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
México CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
M2P, Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
M30-Salta, Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Veracruz CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Kuttler CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Tamasopo CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
B38.Salta, Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
M1A-Corrientes, CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
M1P-Corrientes, CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
S1A-Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
S2A-Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
S3P-Argentina CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Chiapas CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Colombia CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
Australia CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG

Brasil AGCTACGAGACGAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
S2P-Argerntina AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
México AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
M2P, Argentina AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
M30-Salta, Argentina AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Veracruz AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Kuttler AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Tamasopo AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
B38.Salta, Argentina AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
M1A-Corrientes, AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
M1P-Corrientes, AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
S1A-Argentina AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
S2A-Argentina AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
S3P-Argentina AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Chiapas AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Colombia AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
Australia AGTTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCCATTTTCGTGC
** *****

Brasil TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
S2P-Argerntina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
México TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
M2P, Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
M30-Salta, Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Veracruz TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Kuttler TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Tamasopo TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
B38.Salta, Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
M1A-Corrientes, TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
M1P-Corrientes, TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
S1A-Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
S2A-Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
S3P-Argentina TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Chiapas TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Colombia TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
Australia TTCTACTCCGACAAGGTTCGTTGCTGGCAACGTACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC

Brasil CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
S2P-Argerntina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
México CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTAGCCCTTATC
M2P, Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
M30-Salta, Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Veracruz CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Kuttler CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Tamasopo CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
B38. Salta, Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
M1A-Corrientes, CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
M1P-Corrientes, CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
S1A-Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
S2A-Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
S3P-Argentina CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Chiapas CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Colombia CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
Australia CAGCGCTTCGCCGGCGCCAGCGGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC

Brasil TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
S2P-Argerntina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
México TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
M2P, Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
M30-Salta, Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
Veracruz TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
Kuttler TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
Tamasopo TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
B38. Salta, Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
M1A-Corrientes, TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
M1P-Corrientes, TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
S1A-Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
S2A-Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
S3P-Argentina TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
Chiapas TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
Colombia TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAG-----
Australia TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGGTTCTACGAG

Brasil -----
S2P-Argerntina -----
México -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
Veracruz GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
Kuttler GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
Tamasopo GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
B38. Salta, Argentina -----
M1A-Corrientes, -----
M1P-Corrientes, -----
S1A-Argentina -----
S2A-Argentina -----
S3P-Argentina -----
Chiapas GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
Colombia -----
Australia GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCTGCT

Brasil -----
S2P-Argerntina -----
México -----
M2P, Argentina -----
M30-Salta, Argentina -----
Veracruz GGCAAGAACAGCGTTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGT-----
Kuttler GGCAAGAACAGCGTAGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTGAGGAGCACCAGTGA
Tamasopo GGCAAGAACAGCGTTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGT-----
B38. Salta, Argentina -----
M1A-Corrientes, -----
M1P-Corrientes, -----

S1A-Argentina -----
 S2A-Argentina -----
 S3P-Argentina -----
 Chiapas GGCAAGAACAGCGTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA
 Colombia -----
 Australia GGCAAGAACAGCGTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA

Australia ATGGTCGCCATTTTCGGCCGCTTTCGTCGCTGCATTTTCGGCCTTACGGCCGTGCGCGGT
 Kuttler ATGGTCGCCATTTTCGGCCGCTTTCGTCGCTGCATTTTCGGCCTGACGGCCGTGCGCGGT
 Tamasopo -----CACC
 Chiapas -----CACC
 Veracruz -----CACC
 *

Australia TTTGACAATGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
 Kuttler TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
 Tamasopo TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
 Chiapas TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG
 Veracruz TTTGACAACGTCATCGAGGTGACCTTCCAGGAGCACGGCGAGTCCGACAACATGGTGTTG

Australia GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
 Kuttler GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
 Tamasopo GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
 Chiapas GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT
 Veracruz GACCTGTCCATCCCCAGCGAGAGCGACATGATGATCCACAGGCAGACTGACGGCTGTGCT

Australia CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Kuttler CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Tamasopo CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Chiapas CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG
 Veracruz CCCCACACCCCGTCGTCTACACGCCTGTCAGGCCAACAAGCTGAGGCACCTGGTCTGG

Australia AGCGACACCGTGATCCACGGCGTCGGTGACGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Kuttler AGCGACACCGTGATCCACGGCGTCGGTGACGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Tamasopo AGCGACACCGTGATCCACGGCGTCGGTGACGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Chiapas AGCGACACCGTGATCCACGGCGTCGGTGACGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC
 Veracruz AGCGACACCGTGATCCACGGCGTCGGTGACGACGACGAGGACACCATCGAGAAGGTCACC

Australia GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCTCATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Kuttler GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCTCATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Tamasopo GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCTCATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Chiapas GTCCACACCCACTGCCACGAGACCCTCATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC
 Veracruz GTCCACACCCACTGCCATGAGACCCTCATTGAGGTGTCCCTCGGCAGCACCAAGGTCCAC

Australia TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Kuttler TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Tamasopo TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Chiapas TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC
 Veracruz TACCTTGCCCGCATGGCGAGTTCGAGTTCATCTCTGAGCACAAGTACCAGGAGGAGCTC

Australia CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTGCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
 Kuttler CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTGCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
 Tamasopo CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTGCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
 Chiapas CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTGCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG
 Veracruz CGCGAGATGACCAAGACCATCGTTGTGCGACATCAACGACGTCAACGACAACAAGTACTTG

Australia AGCTACGAGACCAACACCGCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCATTTTCGTGC
 Kuttler AGCTACGAGACCAACACCGCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCATTTTCGTGC
 Tamasopo AGCTACGAGACCAACACCGCTACGGCATCACGTGGTACAACATTGTCCCATTTTCGTGC

Chiapas
Veracruz

AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATGTCCCCATTTCTGTGC
AGCTACGAGACCAACACCGCCTACGGCATCACGTGGTACAACATGTCCCCATTTCTGTGC

Australia
Kuttler
Tamasopo
Chiapas
Veracruz

TTCTACTCCGACAAGGTCGTTGCTGGCAACGTCACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
TTCTACTCCGACAAGGTCGTTGCTGGCAACGTCACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
TTCTACTCCGACAAGGTCGTTGCTGGCAACGTCACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC
TTCTACTCCGACAAGGTCGTTGCTGGCAACGTCACCGTCTGGACCGGTGTTGGCTGCCAC

Australia
Kuttler
Tamasopo
Chiapas
Veracruz

CAGCGCTTCGCCGGCCAGCGTGTACGTGAACGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
CAGCGCTTCGCCGGCCAGCGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
CAGCGCTTCGCCGGCCAGCGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC
CAGCGCTTCGCCGGCCAGCGTGTACGTGAATGGCCACGAGAAGCTCGTCGCCCTTATC

Australia
Kuttler
Tamasopo
Chiapas
Veracruz

TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGGTCTACGAG
TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG
TACCACGACGTTGACGGCATGAAGGAGGCTCTCTACCACGGCAAGAACGAGATCTACGAG

Australia
Kuttler
Tamasopo
Chiapas
Veracruz

GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT
GAGCTGACCCTTGAGCAGTTCGACGAGCAGTTCAAGCTCCTCGAGGAGAAGTTCGCCGCT

Australia
Kuttler
Tamasopo
Chiapas
Veracruz

GGCAAGAACAGCGTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA
GGCAAGAACAGCGTAGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA
GGCAAGAACAGCGTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA
GGCAAGAACAGCGTCGACGCTGAGGTGCGCAAGGAGGTTGAGGAGCACCAGTGA
