

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Clonación de genes que codifican
para factores de infectividad en la
nueva Babesia NR831**

Informe Final del Trabajo Profesional en el Extranjero

Alumno: Sebastián Aguilar Pierlé

Tutor: Rogelio Alonso Morales



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Descripción de las actividades realizadas en la estancia	1
Introducción	2
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares	3
Antecedentes.....	4
Nueva especie de babesia.....	13
Materiales y métodos.....	17
Resultados.....	23
Conclusión.....	24
Bibliografía:.....	25

Descripción de las actividades realizadas en la estancia

La estancia se llevo a cabo en el Colegio de Medicina Veterinaria de la universidad de Texas A&M campus College Station en el estado de Texas. El entrenamiento y los trabajos desarrollados durante la estancia se realizaron particularmente en el Laboratorio de investigación en parasitología e inmunoparasitología veterinaria, que forma parte del departamento de Patobiología, bajo la supervisión de la Dra. Patricia Holman, investigadora y asistente profesora del Colegio de Medicina Veterinaria. La Dra. Holman y su equipo dedican su trabajo a la investigación en mecanismos moleculares que manejan la interacción entre *Babesia* spp. y sus huéspedes; caracterización de probables blancos para vacunas y fármacos contra la babesiosis; desarrollo de pruebas diagnosticas para hemoprotozoarios y filogenética molecular de hemoparasitos. El trabajo profesional dio inicio con un entrenamiento de aproximadamente 5 días sobre las técnicas más utilizadas en el laboratorio. Estas técnicas incluyen: aislamiento de RNA a partir de muestras de sangre, síntesis de cDNA, PCR, clonación, identificación de transformantes recombinantes y preparación de plásmidos. Posterior a este entrenamiento comenzó la clonación de tres genes que codifican para factores de infectividad en una nueva especie de *Babesia* que el grupo de la Dra. Holman trabaja. Las técnicas y los experimentos desarrollados para lograr la clonación de tres diferentes genes que codifican para factores de infectividad para la nueva especie de *Babesia* consistieron en la actividad principal

durante la estancia y se encuentran descritos en la segunda parte del informe. Las labores en el laboratorio se llevaban a cabo en un horario de 9:00 AM a 5:00 PM de Lunes a Viernes del 20 de Septiembre de 2005 hasta el 23 de Diciembre de 2005. El trabajo en el laboratorio se veía complementado por la asistencia a seminarios organizados por el departamento. Por otro lado se presentaron informes semanales sobre los avances del trabajo ante el grupo del Laboratorio de investigación en parasitología e inmunoparasitología veterinaria.

Clonacion de genes que codifican para factores de infectividad en la nueva
Babesia NR831

Introducción

La Babesiosis, enfermedad causada por parásitos intraeritrocíticos del género *Babesia*, es una de las enfermedades más comunes a nivel mundial en animales en vida libre y esta ganando interés como una zoonosis en humanos. Estos parásitos se replican en las células rojas del huésped y son llamados piroplasmas debido a la forma de pera que adoptan en la célula del huésped infectado. Algunas especies son específicas de huésped, mientras que otras son más promiscuas infectando huéspedes de diferentes clases taxonómicas incluyendo a los humanos. La babesiosis es por lo tanto una enfermedad de importancia económica veterinaria y médica (1). Recientemente fue descubierto un parásito similar a *Babesia divergens* (conocido hasta el momento como NR831) en conejos de cola blanca (*Sylvilagus floridanus*) en Nantucket Island. Este organismo resultó ser el mismo que causó tres casos de babesiosis humana en Missouri y en Kentucky, basándose en su morfología y en sus secuencias de subunidades de rRNA idénticas (2). Un estudio detallado de esta nueva especie zoonótica de *Babesia spp.* se vuelve necesario para estimar su impacto en la salud pública. Dentro de los estudios que han sido llevados a cabo en este nuevo microorganismo se trataron de clonar tres genes que codifican para factores de patogenicidad y que son utilizados en estudios filogenéticos. Se trata de la Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), una proteína de choque térmico (HSP) y la cysteine protease (CP).

Objetivo general

Clonar tres diferentes genes del nuevo microorganismo similar a babesia spp. conocido como NR831 encontrada en el conejo para obtener la secuencia y tener un mejor conocimiento de los diferentes mecanismos que utiliza para provocar enfermedad y una mejor concepción de su clasificación filogenética.

Objetivos particulares

A partir del protozooario NR831 clonar los genes que codifican para:

- La proteína TRAP
- La cistein proteasa
- Y la proteína de choque térmico

Antecedentes

a) Especificidad de huésped y ecología

La babesiosis fue descubierta en 1888 en Rumania como enfermedad de los bovinos por Babes, siendo la primera enfermedad conocida que se transmitiera por artrópodos a los animales. El primer caso humano se detectó en Yugoslavia (1957).

Las babesias son uno de los parásitos de la sangre más ubicuos y extendidos del mundo (1). A pesar de que son capaces de infectar una amplia variedad de vertebrados, las babesias necesitan tanto huéspedes vertebrados competentes como huéspedes no vertebrados competentes para mantener sus ciclos de vida (1). El vector específico (la garrapata) debe alimentarse de un reservorio vertebrado que es competente para mantener las babesias en un estado infeccioso. A la fecha sólo las garrapatas del género ixodes han sido identificadas como vectores para *Babesia* spp. Sólo existe un reporte donde se identificó a una garrapata no perteneciente a la familia Ixodidae, *Ornithodoros erraticus*, como reservorio para *Babesia meri* (1). Seis de los siete principales géneros de garrapatas ixodidae han sido demostrados como vectores naturales o experimentales de diversas especies de Babesia. Algunas especies de babesia son capaces de infectar más de un género de garrapata. Varios vectores pueden portar

más de una especie de *Babesia*, sin embargo no se sabe si pueden transportar más de una especie a la vez o si pueden transmitir más de una especie a la vez. En lo que concierne los huéspedes vertebrados de este tipo de parásitos, se conocen más de 100 especies de *Babesia* que infectan huéspedes mamíferos, particularmente de la clase Rodentia. Prácticamente cualquier mamífero capaz de hospedar garrapatas infectadas por *Babesia* es un reservorio potencial (1).

b) Ciclo de vida

Los miembros del phylum Apicomplexa pasan por lo general por tres etapas de reproducción: gametogonia correspondiente a la fusión de los gametos en el sistema digestivo de la garrapata, esporogonia reproducción asexual en las glándulas salivares, merogonia reproducción en el huésped vertebrado.

Gran parte de la información que se posee sobre el ciclo de vida de *Babesia* spp. en la garrapata se obtuvo gracias a estudios con *B.microti*. Los organismos pueden ser detectados en la garrapata aproximadamente 10 horas después de que el vector se ha alimentado de un vertebrado infectado. Después de 40 a 60

horas de haberse alimentado los parásitos aun son detectables en los eritrocitos consumidos, los gametocitos comienzan a desarrollar diferentes organelos. Se puede notar particularmente un organelo con forma de punta de flecha que esta involucrado en la fusión de los gametos. Este puede ser encontrado en todas las infecciones de *Babesia* y *Theileria* spp.. El cigoto resultante utiliza las puntas de flecha para entrar a las células epiteliales del aparato digestivo de la garrapata. Desde las células epiteliales, el parásito se mueve hacia los acinis salivarios por la hemolinfa.

El desarrollo de los esporozoitos puede ser dividido en tres fases. Primero el parásito se expande y llena la célula hipertrofiada, formando un esporoblasto multinucleado que se encuentra relativamente indiferenciado. La segunda etapa comienza hasta que la garrapata huésped se alimenta de nueva cuenta. Los organelos especializados del futuro esporozoito se desarrollan. Finalmente los esporozoitos maduros se forman. Tienen un tamaño aproximado de 2.2 por 0.8 μm , son piriformes tienen un retículo endoplásmico, ribosomas libres, organelos similares a mitocondrias, un rhoptria anterior, y varias micronemes. Se producen aproximadamente de 5000 a 10000 esporozoitos a partir de un solo esporoblasto.

Se estima que varios miles de esporozoitos son depositados en la dermis alrededor de la boca de la garrapata durante las ultimas horas de alimentación. Este inoculo es menor al que se utiliza en ratones de laboratorio que es de aproximadamente 10000 a 25000 esporozoitos. La eficiencia de la transmisión por parte de la garrapata es atribuida a su saliva, que probablemente facilita la infección con una acción antiinflamatoria y/o inmunosupresiva.

Se considera que la cantidad de tiempo en que la garrapata se encuentra adherida al huésped afecta directamente la transmisión de esporozoitos en ratones de pies blancos y hamsters. Si se permite que la garrapata se alimente hasta su repleción, las tasas de infección se acercan al 100%.

Cuando se encuentran en el huésped vertebrado, los esporozoitos parecen infectar los eritrocitos, aunque en algunas especies de *Theileria* y *Babesia* los linfocitos son infectados antes. En este caso los esporozoitos invaden los linfocitos y se diferencian en esquizontes multinucleados, estos se diferencian en merozoitos los cuales lisan la célula. Estos merozoitos o esporozoitos (para las babesias sin fase preeritrocítica) infectan los eritrocitos del huésped. El merozoito invade al eritrocito por un proceso de invaginación, formando una vacuola. La membrana de la vacuola se desintegra poco a poco y deja al parásito con su característica membrana única. Dentro de los eritrocitos la mayoría de los merozoitos se convierten en trofozoitos y se dividen por fisión binaria; este tipo de reproducción asexual produce más merozoito, que lisan la célula y van a infectar eritrocitos adicionales. Cuatro parásitos se pueden formar simultáneamente. La rápida reproducción del parásito provoca la destrucción de células en el huésped y hemoglobinuria. Sin embargo algunos trofozoitos pueden convertirse en potenciales gametocitos. Estos trofozoitos no se reproducen en este punto solamente incrementa su tamaño.

Posteriormente cuando se encuentran en el sistema digestivo de la garrapata, estos gametocitos se desarrollaran y se convertirán en gametos antes de abandonar el eritrocito en el intestino de la garrapata (1).

c) Cuadro clínico

Producen alteración de la membrana de los glóbulos rojos, reduciendo su conformabilidad y aumentando la adherencia de los eritrocitos, lo que puede llegar a producir síndrome de estrés respiratorio. Indirectamente pueden causar una producción excesiva de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral, por lo que en humanos se requiere muy pequeña carga infectiva para producir enfermedad clínica. Es posible que tengan una etapa extra-eritrocítica que explique la cronicidad e inmunodepresión observada en algunos casos.

La babesiosis es una enfermedad cíclica similar a la malaria. Los pacientes que se recuperan de la infección inicial muestran periodos activos variables e impredecibles alternando con periodos latentes.

Los pacientes raramente eliminan las Babesias completamente por lo que cuando se produce inmunodepresión (por concurrente Ehrlichiosis, por causa iatrogénica como la administración de corticoesteroides, estrés...) fácilmente pueden ocasionar

recrudezencia de la parasitemia. La babesiosis afecta más severamente a: pacientes de edad avanzada, inmunodeprimidos, esplenectomizados o con Borreliosis de Lyme o enfermedades concomitantes como la enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fallo cardiaco congestivo. La intensidad de la parasitemia puede variar desde indetectable o tener concentraciones superiores al 85%. La tasa de mortalidad es del 6.5%. Los hallazgos en la exploración clínica son: fiebre, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia. En los pacientes con enfermedad más severa puede aparecer hipoxia.

Las pruebas diagnosticas utilizadas para detectar la infección por Babesia son:

extensiones de sangre periférica teñidas con Wright o Giemsa, aunque frecuentemente no pueden observarse los parásitos que son en forma de anillo o tétradas (cruz de malta) que son patognomónicas de babesiosis.

Inmunofluorescencia (IFA) se usa para confirmar el diagnóstico cuando la extensión de sangre periférica es negativa, Títulos de 1:256 indican infección aguda mientras que títulos menores de 1:64 son indicativos de infección crónica subclínica.

PCR es una prueba muy específica para confirmar el diagnóstico, puede ser usado también para monitorizar la progresión de la infección, además de poder detectar infección persistente en pacientes con sintomatología prolongada.

Inoculación del hámster dorado con la sangre del paciente y a continuación análisis de anticuerpos en la sangre del animal u observación directa en al microscopio, se usa cuando la extensión de sangre periférica y el diagnostico de laboratorio son equívocos.

Es necesario administrar terapia antibiótica y antimaláricos con el fin de reducir la parasitemia:

Diminazine aceturate en una sola dosis IM: no se debe sobredosificar puesto que este fármaco tiene un margen de seguridad muy estrecho. Para uso veterinario.

Imidocarb dipropionate: una dosis IM y repetir a los 14 días. Es el tratamiento de elección para uso veterinario.

En medicina humana:

Clindamycin+Quinine: se usa un curso de 2 semanas que resulta casi imposible de tolerar debido a los efectos secundarios.

Atovaquone+Azithromycin es la terapia de primera elección en casos en que no peligre la vida del paciente debido a sus menores efectos secundarios. Se necesitan 1-4 meses o más en caso de infecciones crónicas. Se puede usar Atovaquone combinado con proguanil.

Mefloquine+Artemesia: ensayado con éxito para babesiosis crónica.

Transfusión de recambio en casos de elevada parasitemia puede salvar la vida del paciente. Los pacientes que resulten PCR positivos después del curso de terapia necesitaran un nuevo tratamiento con diferentes fármacos, un curso más prolongado o dosis más elevadas. Se han observado fracasos del tratamiento con todos los regímenes

disponibles en la actualidad contra *Babesia* lo que puede ser consecuencia de una etapa exoeritrocítica de la infección o estado de portador crónico del paciente.

d) clasificación

Las babesias son protistas pertenecientes a un grupo de microorganismos llamados protozoos. Se puede definir un protozoo como un protista unicelular eucariota habitualmente móvil. Los protozoos sólo están directamente relacionados en base a una única característica negativa: el no ser multinucleares.

La clasificación taxonómica de *Babesia* spp. las coloca en el phylum *Apicomplexa*, clase *Aconoidasida* y en el orden *Piroplasmida*. Los apicomplexa poseen una etapa de esporulación en su ciclo vital y carecen de organelos locomotores específicos. Son parásitos intra o intercelulares de los animales y se distinguen por una disposición peculiar de fibrillas, microtubulos, vacuolas y otros organelos, denominados en conjunto complejo apical, que se localiza en un extremo de la célula. El complejo apical contiene varios componentes. En el extremo apical existen uno o dos anillos polares. El conoide existe en un cono de fibras dispuestas junto a los anillos polares. De los anillos polares parten microtubulos subpeliculares, que pudieran

actuar como soporte. Dos o más roptrias se extienden hasta la membrana plasmática y secretan su contenido en la superficie celular. Dos de las familias pertenecientes al orden *Piroplasmida* son *Babesiidae* y *Theileriidae*, las diferencias más notables entre estas dos familias son la ausencia de un ciclo preeritrocítico en *Babesia* y la ausencia de una transmisión transovarica en *Theileria*. Inicialmente las especies de *Babesia* eran identificadas en base a parámetros morfológicos de las formas intraeritrocíticas visibles en frotis de sangre de animales vertebrados infectados. Este análisis, junto con la especificidad de huésped, han sido utilizados para la clasificación de las múltiples especies. Se han descrito más de 100 especies de *Babesia* que infectan una amplia variedad de vertebrados. Se sospecha sin embargo que muchas de las descripciones son de organismos de especies similares o idénticas que las técnicas tradicionales no pueden distinguir. Estos métodos tradicionales son reemplazados poco a poco por métodos de biología molecular que son útiles para distinguir organismos similares haciendo distinciones basándose en características más subjetivas. Existen varias razones para justificar la utilización de la biología molecular en la clasificación de las diferentes babesias. Diferentes parásitos en un mismo huésped pueden parecer morfológicamente similares. El mismo parásito puede tener diferentes apariencias microscópicas en diferentes huéspedes, debido probablemente a factores de especificidad de huésped, como la función esplénica y la predisposición inmunológica. La clasificación

de las especies de *Babesia* según la especificidad de huésped ha resultado ser menos útil de lo que se creía, ya que en efecto especies que han sido estudiadas de manera extensiva como *Babesia microti* han demostrado una especificidad de especie muy amplia. Las nuevas técnicas son más objetivas que las que se basan en la observación de características visibles. Por lo tanto, se anticipa que la clasificación basada en la comparación de secuencias de ácidos nucleicos mostrara que muchas especies de *Babesia* pueden infectar diferentes organismos huéspedes, resultando en la sinonimia de especies previamente distintas (1).

Se agrupa de manera informal a las Babesias en Babesias pequeñas (trofozoitos de 1.0 a 2.5 μm incluyendo a *B.gibsoni*, *B. Microti*, y *B. Rodhaini*) y Babesias grandes (2.5 a 5.0 μm incluyendo *B.bovis*, *B.caballi* y *B.canis*). Estas clasificaciones morfológicas son generalmente consistentes con la caracterización filogenética basada en subunidades pequeñas de ADN ribosomal, que muestran que las babesias pequeñas y grandes caen en dos clusters filogenéticos, donde las Babesias pequeñas están más relacionadas a *Theileria spp* (con la excepción del patógeno en humanos *B.divergens*, que aparece pequeño en los frotis sanguíneos pero está genéticamente relacionado con las babesias grandes).

En realidad ciertas secuencias de *B. Microti* son más similares a *Theileria annulata*, un patógeno de bovinos, que a los miembros de su

propio genero (*B.bigemina*, por ejemplo). Esta fue la primera evidencia molecular de que las pequeñas Babesias están evolucionariamente relacionadas con *Theileria*. Esto aunado al hecho de que, así como las especies de *Theileria* y a diferencia de las grandes babesias, las babesias pequeñas parecen ser transmitidas de manera transovarica en la garrapata, ha llevado a la conclusión de que las pequeñas babesias deberían de ser clasificadas con *Theileria*. De hecho, descripciones de estos estadios en *B.equi* han llevado a la reclasificación de este organismo como *T.equi.*, lo cual pone una vez mas en tela de juicio la actual clasificación.

Las dos especies principales que infectan al ser humano son *B.microti* y *B.divergens*, así como otras especies que aun no han sido nombradas WA1, CA1 y MO1. Existen además reportes de otras especies como *B.bovis* y *B.canis*, pero estos casos no han sido bien documentados. Es interesante resaltar que existen miembros tanto de las babesias pequeñas como de las grandes son capaces de infectar al humano. No es sorprendente constatar que tienen diferentes requerimientos de huésped. También las manifestaciones de enfermedad se presentan de manera diferente (1).

e) Vacunas

Actualmente, no existen vacunas contra la babesiosis en humanos, y las infecciones no ocurren con suficiente frecuencia como para

considerar el esfuerzo de la elaboración de una. Se ha invertido un esfuerzo significativo en el desarrollo de vacunas para ganado y otros animales, estas pudieran ser útiles en la fabricación de una vacuna para humanos. Gran parte del trabajo realizado en vacunas se enfocan a las babesias grandes, como B. Bovis, B. Divergens y B. Bigemina. La búsqueda por vacunas ha resultado en vacunas atenuadas, vacunas que utilizan antígenos solubles de cultivos in vitro, y vacunas recombinantes. Comparando varios aspectos de las cepas atenuadas y virulentas se han profundizado el conocimiento sobre el proceso de enfermedad que se desarrolla. Si se lograra una vacuna que ofreciera una protección efectiva para humanos, resultaría útil para pacientes que han sido esplenectomizados o que se encuentran comprometidos inmunológicamente en áreas de alto riesgo.

Vacunas vivas: La utilización de parásitos vivos para la inmunización del ganado contra la babesiosis ha sido empleada por mucho tiempo con diversos resultados. En 1964, una cepa atenuada de B.bovis fue producida por adaptación en becerros esplenectomizados. Esta vacuna resulto ser muy útil. Desde entonces se han desarrollado muchas vacunas atenuadas de diferentes especies de Babesia.

Vacunas recombinantes: Aunque las vacunas atenuadas han tenido éxito, varios inconvenientes de estas han sido expuestos; dentro de los más importantes tenemos que la cotransmisión de otros agentes enzooticos, como el virus de la leukosis bovina, además de la inestabilidad de este tipo de inmunogenos. Por lo tanto numerosos

estudios se enfocan en el desarrollo de otras técnicas preventivas. Eritrocitos infectados con *B.bovis* y *B.bigemina* han sido irradiados y utilizados para prevenir parasitemias pero con un éxito menor que el resto de las vacunas.

La investigación en vacunas recombinantes se ha enfocado en desarrollar vacunas de los antígenos de superficie mayores en la forma de esporozoito. En particular, las proteínas del complejo apical son de especial interés debido a su función en la invasión de la célula huésped. Los antígenos de estas proteínas han demostrado que pueden suscitar respuestas inmunes que pueden llegar a ser suficientes para una protección. Gran parte de las vacunas candidatas incluyen proteínas asociadas a las rhoptrias (RAP) y han tenido éxitos parciales. Es importante señalar para esto que las múltiples facetas del ciclo de vida de las babesias y de su proceso infeccioso necesitan ser mejor conocidos para desarrollar mejores vacunas. Mas adelante mencionaremos las posibilidades que ofrece la proteína TRAP para esto.

Nueva especie de babesia

La babesiosis humana es causada comúnmente por el hemoprotozoario *Babesia microti* en los Estados Unidos y por *Babesia divergens* en Europa. Aunque este ultimo organismo provoca una enfermedad clínica en individuos inmunocompetentes, una infección fatal solo se produce en pacientes inmunocomprometidos. Ni *B.divergens* ni su vector son endémicos en la Estados

Unidos, sin embargo dos casos de babesiosis humana aguda en Missouri y en Kentucky fueron atribuidos a parásitos similares a *B.divergens* que comparten similares patologías y secuencias de subunidades de rRNA idénticas. Una tercera infección similar fue reportada en el estado de Washington (3).

La evidencia molecular indica que los organismos identificados en los casos de Missouri y Kentucky son también encontrados en el conejo cola blanca (*Sylvilagus floridanus*) en poblaciones en Nantucket Island, Massachussets, lo cual sugiere que quizás estos animales actúen como reservorio para este parásito. Actualmente, el rango geográfico que ocupa este conejo va desde Canadá hasta América del Sur. Los conejos cola blanca no son nativos de Massachussets, fueron introducidos en principios del siglo 20 por cazadores. Miles de conejos fueron transportados de estados del medio oeste, incluyendo Missouri y Kentucky, a Massachussets y liberados con propósitos de caza deportiva. Esta especie se estableció y desplazo a una especie nativa como el "New England cottontail" (*Sylvilagus transitionalis*). Se considera entonces que es posible que la especie de Babesia presente en estos conejos haya sido introducida al mismo tiempo que su huésped. Una coincidencia interesante que es digna de mención el hecho de que el paciente de Kentucky acostumbraba cazar conejos cola blanca previo a los primeros signos clínicos de babesiosis (2).

La caracterización de un numero importante de especies de Babesia ha sido facilitada por el establecimiento de aislados de laboratorio, ya sea por subinoculacion en un animal de laboratorio adecuado o por

cultivo in vitro del parásito. Los intentos de infectar animales de laboratorio o de establecer cultivos con el microorganismo del caso de Missouri fueron infructuosos y ninguna de estas técnicas fue reportada en el caso de Kentucky. El descubrimiento de que los conejos cola blanca de la isla de Nantucket portan estos parásitos se traduce como una fuente para iniciar cultivos (3).

Por otro lado considerando que las secuencias de los organismos encontrados en los casos humanos y en las poblaciones de conejos de Nantucket compartían 99.8% de su secuencia con *Babesia divergens* se decidió verificar si no se trataba en realidad de este agente. Se decidió entonces inocular becerros de Holstein-Freisan con *B.divergens* y con aislados cultivados del organismo detectado en los conejos de Nantucket (conocido hasta la fecha como NR831). Se monitorearon los signos clínicos de los becerros, se realizaron tinciones de Giemsa, PCR y se cultivaron los organismos. Los becerros que fueron inoculados con NR831 no presentaron ningún signo clínico y exhibieron resultados negativos en todas las pruebas. Los becerros inoculados con *B.divergens* desarrollaron infecciones clínicas y dieron positivo a todas las pruebas. Los becerros inoculados con NR831 fueron completamente susceptibles al ser desafiados con *B.divergens*. Esto confirmó que la especie de *Babesia* de la isla de Nantucket no es conespecífica con *B.divergens* basándonos en la especificidad de huésped en ganado (2).

a) Cistein Proteasas (CP)

Las cistein proteasas (CP) sirven roles vitales en el metabolismo, desarrollo e infectividad de los parásitos protozoarios. Estas proteínas son cada vez más populares como blanco en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapeúticos y la fabricación de inmunógenos. En contraste con la mayoría de los protozoarios que codifican la CP, no se ha logrado describir genes o funciones de la CP en ninguna *Babesia* spp.

b) proteína de choque térmico (HSP)

Una respuesta al aumento de temperatura es la síntesis de proteínas de choque térmico. Las HSP han sido clasificadas en 5 grupos principales de acuerdo a su masa molecular expresada en kDa y llamadas respectivamente: HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 y HSP chicas. Las HSP pueden actuar como antígenos en muchas enfermedades infecciosas. Se han observado respuestas inmunológicas hacia la HSP 60, HSP 70 y HSP 90 en enfermedades causadas por patógenos bacterianos y protozoarios. Estas proteínas resultan muy útiles también para la realización de comparaciones filogenéticas (4).

c) Thrombospondin related adhesive protein

La Thrombospondin related adhesive protein (TRAP) fue reportada por primera vez en 1988 por Robson (5). Fue encontrada en el parásito humano de la malaria: *Plasmodium falciparum*. Se bautizo como thrombospondin related adhesive protein debido a la presencia en tres copias de la región uno de la tromboespondina. También se le conoce como proteína de superficie de los esporozoitos. Se considera que esta proteína juega un papel importante en la infectividad de los esporozoitos de diferentes especies de protozoarios. Se ha demostrado que esta proteína esta conservada en todas las especies de plasmodiums. Esta proteína tiene diferentes funciones en Plasmodium spp. Los parásitos del phylum apicomplexa invaden a sus células huésped utilizando moléculas presentes en su superficie y en los organelos secretorios apicales. Estos organelos se encuentran en la parte anterior de ciertos estadios invasivos, particularmente en los gránulos densos, en los micronemas y en los rhoptrias. Las proteínas micronemales son de gran importancia para la adherencia y la invasión de la célula huésped. Estas proteínas son frecuentemente secretadas casi al contacto con la célula huésped. En el caso de los plasmodiums se considera que TRAP juega un papel fundamental en la infectividad de los esporozoitos (6). Se encuentra presente en la

superficie del parásito y en los micronemes. Se ha reportado por otro lado que esta proteína se expresa con frecuencia en esporozoitos presentes en las glándulas salivales (en este caso de un mosquito considerándolo como el vector más viable). Cuales serian entonces las funciones que lleva a cabo esta proteína en la infectividad de *Plasmodium* spp. (7). Considerando que los esporozoitos necesitan ir del sistema digestivo del mosquito a las glándulas salivales de este para ser inyectados al huésped mamífero, la función de esta proteína que le permite al esporozoito invadir las glándulas salivales del mosquito es fundamental. Además se ha demostrado que TRAP es esencial para la infección del hígado de los mamíferos. Otra función de gran importancia que ha sido verificada es la motilidad que le confiere esta proteína al parásito, aunque cabe señalar que esto solo se ha comprobado en estudios in vitro. Es muy interesante mencionar que ya existe un numero importante de estudios donde al tratar de inhibir esta proteína se ha logrado inhibir la infección por *plasmodium*. Ha quedado demostrado que al construir *plasmodiums* con deleciones de esta proteína su infectividad se ve inhibida (8).

Un numero importante de estudios que demostraron el rol crucial que esta proteína tiene en la invasión de células y en la motilidad de protozoarios inspiro una búsqueda por proteínas similares en *Babesia bovis*. En 2004, de Vries (10) reportó una proteína en *B.bovis* con una arquitectura remarcablemente similar a la de la TRAP encontrada en *Plasmodium*. Este fue el primer ejemplo de una proteína de la familia

TRAP en el otro orden de los piroplasmidos. Considerando las importantes funciones que desempeña esta proteína en otros protozoarios, encontrarla en otras especies de Babesia se vuelve necesario. Esta proteína se presenta además como una gran candidata para el diseño de vacunas.

Materiales y métodos

a) Colección de muestras

Durante un periodo de 2 años, en 2002 y 2003, se colectaron muestras de sangre de la misma población de conejos cola blanca que ha sido estudiada en la isla de Nantucket en Massachussets. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos vacutainers. Los conejos de vida libre fueron capturados con permiso de la división de pesca y vida silvestre de Massachussets. Se examinaron tinciones de Giemsa de frotis sanguíneos, y se busco la presencia de babesias en las muestras con un PCR, como ha sido descrito previamente (8).

b) Aislamiento del RNA

Se realizó aislamiento de RNA en una de las muestras de los conejos que dio positivo a la presencia de Babesia tanto en los frotis tenidos con la técnica de Giemsa como con PCR. Iniciando con un volumen de 300 µl de muestra, esta porción se liso por medio de un mortero Tembreek. Se le añadieron 300 µl de fenol cloroformo al lisado. Se agito la muestra en un vortex por 1 minuto. La muestra con fenol fue

depositada en hielo durante 5 minutos. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 2000 rpm a 4 C durante 5 minutos. Se trasladó el sobrenadante acuoso a otro vial. Se midió el volumen de esta fase acuosa. Se añadieron 20 µl de solución de acetato de sodio y se agitó la muestra por 10 segundos. Se añadieron 300 µl de fenol cloroformo ácido y se colocó la muestra en el vortex por 1 minuto. Se repitieron los 5 minutos en hielo y una centrifugación extra de 2000 rpm a 4 C durante 5 minutos. Se volvió a transferir el sobrenadante a un nuevo vial. Se midió el volumen de la muestra y se le añadió un volumen igual de isopropanol (300 µl). Se almacenó la muestra a -20 C durante la noche. Se centrifugó al día siguiente la muestra a 12000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado, se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente (300 µl). La muestra fue agitada por un minuto. Se recuperó el RNA llevando a cabo una centrifugación de 7500 rpm durante 10 minutos. Se decantó el Etanol sobrenadante y se conservó el pellet que fue analizado con espectrofotometría.

c) Síntesis del cDNA

Al haber obtenido el RNA de las muestras de sangre de conejos cola blanca se llevó a cabo una amplificación de cDNA de este RNA. En

dos tubos de 0.5 ml se colocó respectivamente: 3 µl de muestra de RNA, 1 µl de 5' CDS primer 1 µl y 3 µl de muestra de RNA, 1 µl de 3' CDS primer y 1 µl de oligo. Se incubaron los tubos a 70 C durante 2 minutos y se enfriaron los tubos durante dos minutos en hielo. Posteriormente se le añadió a cada tubo: 2 µl de Buffer 5X, 1 µl de DTT (20 mM), 1 µl de mix de dNTP (10 mM) y 1 µl de transcriptasa reversa. Se incubó a 42 C durante 1 hora 30 minutos. Se obtuvieron entonces muestras de cDNA 3' y 5'.

d) PCR para la cysteine protease

En lo que concierne la cysteine protease se llevaron a cabo varios experimentos. Se llevó a cabo un PCR con el cDNA 3' obtenido y con los primers BDCPR 2 y BDCPF 2. Se añadieron 20.75 µl de Master Mix, 1.25 µl de 3' cDNA, 2.5 µl de UPM y 1 µl del primer BDCPF 2. En un control positivo se utilizaron 20.75 µl de Master mix, 1.25 µl de 3' cDNA, 1 µl de BDCPR 2 y 1 µl BDCPF 2. En un control negativo se colocaron 20.75 µl de Master Mix, 1.25 µl de agua, 2.5 µl de UPM y 1 µl del primer BDCPF 2. Las condiciones fueron de 94 C por 30 segundos, 65 C por 30 segundos y 72 C por 2 minutos durante 30 ciclos. Por otro lado se llevó a cabo el mismo experimento en las mismas condiciones pero esta vez se utilizó una dilución de 1:10 del cDNA 5' obtenido previamente.

Nuevamente el mismo experimento fue llevado a cabo pero esta vez utilizando cDNA 5' sin diluir y los primers BDCPR 2 y BDCPF 2 fueron reemplazados por los primers BDCPR 6 y BDCPF 6.

e) PCR para la proteína de choque térmico

Para la proteína de choque térmico, se llevó a cabo un PCR con el cDNA 3' y los primers HSP 760F y 840 F. Las reacciones se prepararon con la misma metodología mencionada para la Cysteine protease. Las condiciones fueron de 94 C por 30 segundos, 65 C por 30 segundos y 72 C por 2 minutos durante 30 ciclos. Para encontrar resultados con el cDNA 5' fue utilizado otro primer, el HSP 700R. Utilizando la metodología previamente mencionada se llevó a cabo un PCR donde las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 94 C por 30 segundos, 68 C por 30 segundos y 72 C por 2 minutos durante 25 ciclos.

f) PCR para la proteína TRAP

Para la proteína TRAP se llevó a cabo un PCR con cDNA 5' y los primers TRAP 110F y 990R. En este caso se llevó nuevamente a cabo el procedimiento señalado pero se substituyó el buffer 10X incluido en

el Master mix original por el buffer SA 10 X. Por otro lado las condiciones fueron las siguientes: 96 C por 3 minutos, 94 C por 30 segundos, 65 C por 30 segundos, 72 C por 2 minutos durante 40 ciclos un ciclo de 72 C por 10 minutos.

g) Clonación

Los productos obtenidos en estos PCRs se ligaron con el kit TOPO cloning. Se colocó en un tubo 4 µl del producto de PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl del vector TOPO. Se mezcló gentilmente y se llevó a cabo una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. La muestra se colocó en hielo simultáneamente con el vial que contiene E.coli que se derritió lentamente en el hielo. Se incubó la muestra durante 30 minutos en hielo. Se colocaron 2 µl de la muestra con la mezcla TOPO cloning en el vial que contenía E.coli. Se le aplicó un choque térmico a la muestra a 42 C durante 30 segundos y se colocó la muestra en hielo nuevamente. Se añadieron 250 µl de medio SOC a las células. Se incuban y agitan los tubos a 37 C durante una hora. Se “sembraron” cajas de petri con medio enriquecido LB y tratadas con lincomicina con 50 µl de muestra en cada una. Se incubaron durante toda la noche a 37 C. Al día siguiente se escogieron

10 colonias blancas por caja para llevar a cabo un análisis en un PCR de colonias.

h) Identificación de transformantes recombinantes

El procedimiento utilizado para analizar el inserto de DNA en 10 colonias fue el siguiente. Se pipetearon 9 μ l de agua ultra pura en 10 tubos para PCR respectivamente. Se realizó una mezcla maestra con 100 μ l de buffer para PCR 2X Qiagen, 4 μ l del primer M13 reversa del kit de invitrogen , 2 μ l del primer M13F del kit de invitrogen y 1 μ l de agua ultra pura. Se tocó con la punta de una pipeta cada una de las 10 colonias aisladas y se mezcló con los 9 μ l de agua ultra pura de su respectivo tubo. Se colocaron los tubos en el termociclador durante 10 minutos a 94 C. Se pausó el termociclador para añadirle a cada tubo 11 μ l de la mezcla maestra elaborada previamente y se procede con el siguiente programa: 94 C por 30 segundos, 50 C por 30 segundos, 72 C por 2 minutos durante 30 ciclos y 72 C durante 10 minutos. Se observaron los productos en gel de agarosa tenido con etidio de bromuro.

i) Preparación de plasmidos

Después de verificar el inserto en el gel se aplicó el protocolo Qiagen para preparaciones de plasmidos. Se pipetearon 6 ml de caldo Miller LB y 6 μ l de ampicilina (50mg/ml) en tubos de centrifuga de 50 ml. Se

inoculo cada tubo con una sola colonia blanca y se incubo por la noche a 37 C y a 225 rpm. Al día siguiente se centrifugó para obtener un pellet de bacterias (durante 30 minutos a 1800 rpm). Se removió todo el sobrenadante buscando que el pellet se encontrara lo más seco posible. Se resuspendió el pellet en 250 µl de buffer P1 y se transfirió a un tubo de 2 ml de centrifuga. Se pipeteó hasta que las células estuvieran suspendidas de manera heterogénea. Se añadieron 350 µl de buffer P2 y se mezclo gentilmente el tubo. Se añadieron 350 µl y se mezclo gentilmente. Se centrifugo durante 10 minutos a 10000 XG. Se pipeteo cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a la columna spin incluida en el kit. Se centrifugó nuevamente durante un minuto y se descarto el liquido. Se lavo la columna añadiendo 0.5 ml de buffer PB y se centrifugó durante un minuto. Nuevamente se descartó el liquido. Se lavó la columna con 0.75 ml del buffer PE y se centrifugo durante 1 minuto. Se descartó el liquido y se centrifugo nuevamente durante otro minuto. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 ml. Se añadieron 50 µl de agua ultra pura a la columna, se dejo reposar durante un minuto y se centrifugó durante otro minuto. Se verificaron los plasmidos en un gel de agarosa. Se corrieron 1 µl de cada plasmido y 2 µl del marcador.

Las plasmidos fueron enviados para secuenciacion a los laboratorios gene tech ubicados en el campus de Texas A&M en College Station Texas.

Resultados

Se obtuvo dentro de todos los PCR s y clones realizados la secuencia de la proteína de choque térmico del nuevo parásito.

NR HSP

```
ATGGCTTCACCAGTTATTGGTATCGACTTGGGTACTIONACTACTCCT
GTGTGGGTGTATAACAAGGACAACAATGTAGAAATTATCCCTAACG
ATCAGGGTAACAGGACCACCCCTTCTACGTGCGCTTCACTGACA
CTGAGCGTCTCATTGGTGACGCCGCTAAGAACCAGGAGGCCCGT
AACCCAGAGAACACTIONGTGTTGATGCCAAGAGGCTTATCGGAAGG
AGGTTGACGACCCCACTGTCAGGATGACATGAAGCACTIONGGCC
ATTCAAGGTTATCAACGGTGTGGCGGCAAGCCCACTIONCGAAGT
AACCTTCCAGGGACAGAAGAAGACCTTCCACCCCGAGGAAATTTC
ATCCATGGTCCTTATCAAGATGAAGGAAATTGCTGAACTIONTACTCTT
GGCAAGACCGTCAAGGATGCCGTCATTACCGTCCCTGCCTATTTTC
AATGACTCTCAGCGTCAGGCCACCAAGGATGCCGGTACCATTGCT
GGACTCAACGTCATGCGTATCATTAAATGAACCCACCGCCGCGCT
ATTGCCTACGGTCTCGACAAGAAGGGATCGACCGAGAAGAAGT
CCTTATCTTCGATCTCGGAGGTGGTACTTTTCGATGTATCCATCCTT
ACCATCGAAGACGGTATCTTCGAAGTCAAGGCAACCGCTGGTGAT
ACCCACCTCGGTGGTGAGGACTTCGACAACCTCCTCGTTGAGCA
CTGTGTCCGTGACTTCATGAGGATGAACAATGGAAAGAACATTGC
CACCAACAAGCGTGCTCTCCGTCGGCTCAGGACCCACTIONGTGAAC
GTGCGAAGCGTGTACTCTCAAGCTCAACCCAAGCCACCATCGAG
CTTGACTCCCTCTTCGAAGGTATCGATTACAACACCACCATCAGC
CGTGCTCGTTTTCGAGGAGATGTGTGGTGAGAAGTTCAGGGGAAC
TCTCATCCCTGTGAAAAGGCTCTGGAGTCCAGTGGCCTAGACAA
GAGGAAGATCCACGAGGTGTTCTTGTGGTGGTTCCACCCGTAT
CCCCAAGATCCAACAGCTCATCAAGGACTTCTTCAACGGAAAGGA
ACCCAGCCGCTCGATCAACCCCGATGAAGCTGTGCGCTACGGTG
CCGCTGTCCAGGCTGCCATCCTTTCCGGTGACCAGTCTGGTAAGA
TCCAAGAACTIONCCTGTTGCTCGATGTTGCTCCCTTTTCGCTCGGTC
```

TCGAAACCGCCGGAGGTGTCATGACTGTGCTTATTAAGCGTAATA
CCACCATCCCTACCAAGAAGACTCAGGTATTCACCACCAACGAGG
ACAGGCAGGAGGGTGTGTTTCATCCAGGTCTTCGAGGGTGTAGCGT
GCCATGACCAAGGACAACAACCTCCTCGGAAAGTTCCACCTTACT
GGAATTGCCCCAGCACCCAGGGGAGTTCCCCAGATCGAGGTCAC
CTTCGATATCGACGCCAACGGTATTCTCAACGTTACTGCCATGGA
CAAGTCCACCGGAAAGTCTGAGCACGTACCATACCAACGACAA
GGGACGTCTCAGCACTGCCGACATTGAGCGTATGGTTGCAGAGG
CTGAGAAGTTCAAGGAAGAGGATGAGAATAGGCGCTCCTGCGTT
GAAGCCAAGCACCAAGTTGGAGAATACTGCTACAGCATGAGGTC
CACCTTGGTGACGATAATGTCAAGAGCAAGCTCGAAGCCGGTG
AGGTAGAGGAGGCTCTTAAGGTCATAGAGGAAGCCATAAAATGGC
TCGAAAGCAACCAAACTGCCACCAAGGAAGAGTTTGAATACAAGC
TCAAGGAGGTCGAAAAGGTCTGCCAGCCCCTCGCCACCAAGATG
TACCA

Met A S P V I G I D L G T T Y S C V G V Y K D N N V E I I P N D Q G
N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q E A R N P E N T V
F D A K R L I G R R F D D P T V Q D D **Met** K H W P F K V I N G V G
G K P T I E V T F Q G Q K K T F H P E E I S S **Met** V L I K **Met** K E I A
E L Y L G K T V K D A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I A
G L N V **Met** R I I N E P T A A A I A Y G L D K K G S T E K N V L I F D
L G G G T F D V S I L T I E D G I F E V K A T A G D T H L G G E D F
D N L L V E H C V R D F **Met** R **Met** N N G K N I A T N K R A L R R L
R T H C E R A K R V L S S S T Q A T I E L D S L F E G I D Y N T T I
S R A R F E E **Met** C G E K F R G T L I P V E K A L E S S G L D K R
K I H E V V L V G G S T R I P K I Q Q L I K D F F N G K E P S R S I N
P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D Q S G K I Q E L L L L D V A P
L S L G L E T A G G V **Met** T V L I K R N T T I P T K K T Q V F T T N
E D R Q E G V F I Q V F E G E R A **Met** T K D N N L L G K F H L T G
I A P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L N V T A **Met** D K S T G
K S E H V T I T N D K G R L S T A D I E R **Met** V A E A E K F K E E D
E N R R S C V E A K H Q L E N Y C Y S **Met** R S T L G D D N V K S K
L E A G E V E E A L K V I E E A I K W L E S N Q T A T K E E F E Y K
L K E V E K V C Q P L A T K **Met** Y

Bibliografía

1. Homer M.J., Aguilar I., Telford III S.R., Krause P. J. y Persing D. J. 2000. Babesiosis, *Clinical Microbiology Reviews* 13:451-469
2. Holman P.J., Spencer A.M., Telford III S.R., Goethert H.K., Allen A.J., Knowles D.P. y Goff W.L. 2005 Comparative infectivity of *Babesia divergens* and a zoonotic *Babesia divergens*-like parasite *Am. J. Med. Hyg.*, 73:865-870
3. Holman P.J., Spencer A.M., Drosleskey R.E., Goerthert H.K. y Telford III S.R. 2005 In vitro cultivation of a zoonotic *Babesia* sp. Isolated from eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts *J. Clin. Microbiology* 43:3995-4001
4. Dzaman Serafin S., Telatynska Mieszek B., Ciechanowski K. 2005 Heat shock proteins and their characteristics *Pol. Merkuriusz Lek.* 110 215-219
5. Robson KJ, Hall JR, Jennings MW, Harris TJ, Marsh K, Newbold CI, Tate VE, Weatherall DJ. 1998 A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature.* 335(6185):79–82.
6. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 1992. W O Rogers, A Malik, S Mellouk, K Nakamura, M

- D Rogers, A Szarfman, D M Gordon, A K Nussler, M Aikawa, and S L Hoffman Proc Natl Acad Sci U S A.; 89(19): 9176–9180.
7. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Menard R 1997 TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites..Cell. ;90(3):511-22.
 8. Bhanot P, Frevert U, Nussenzweig V, Persson C. 2003 Defective sorting of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) inhibits Plasmodium infectivity Mol Biochem Parasitol. Feb;126(2):263-73
 9. Gantt S, Persson C, Rose K, Birkett AJ, Abagyan R, Nussenzweig V. 2000 Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit Plasmodium sporozoite infectivity in vivo. Infect Immun. Jun;68(6):3667-73.
 10. de Vries E, Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FJ. 2004 A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. Mol Biochem Parasitol. Feb; 136: 25-34