



Evaluación de la Interacción de la Proteína del Cuello de las Roptrias 2 (RON2) de *Babesia bovis* a Eritrocitos Bovinos

Danny Barney Borrero

Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria

Bogotá, Colombia

Junio, 2021

Evaluación de la Interacción de la Proteína del Cuello de las Roptrias 2 (RON2) de *Babesia bovis* a Eritrocitos Bovinos

Danny Barney Borrero

Trabajo presentado como requisito para optar al título de:

Médico Veterinario

Director:

Sebastián García Castiblanco
Médico Veterinario

Codirectora:

Catalina Avendaño Valenzuela
Microbióloga Agrícola y Veterinaria, Esp, PhD.

Línea de Investigación: Sanidad Animal
Grupo de Investigación: Ciencia Animal

Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa de Medicina Veterinaria

Bogotá, Colombia

Junio, 2021

Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por el Acuerdo Superior N° 11 de 2017 y Acuerdo Académico N° 41 de 2017 para optar al título de Médico veterinario

Jurado

Jurado

Bogotá, __Día__ de __Mes__ de 2021



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Mi mas inmensa gratitud a mi madre y padre por el constante amor y apoyo que me han brindado a lo largo de este proceso de formación.

A Sebastián por todos los aportes realizados a este trabajo, su confianza y su amistad.

A Andrés Moreno, Catalina Avendaño y Laura Cuy por su constante guía, dirección, orientación, paciencia y confianza.

Al la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC por financiar y darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación; así como a todos los investigadores del instituto que de una u otra manera me nutrieron con sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

El parásito *Apicomplexa*, *Babesia bovis*, es principal agente causal de babesiosis bovina, la cual es la enfermedad de mayor importancia transmitida por artrópodos en el ganado bovino. Las vacunas disponibles en la actualidad son basadas en parásitos atenuados, lo cual dificulta su transporte y conservación, y a veces casos de reversión de virulencia pueden presentarse. En el mecanismo de invasión de parásitos *Apicomplexa*, como *Toxoplasma* y *Plasmodium*, la Proteína del Cuello de las Roptrias (RON2) se une a la membrana de la célula diana para ser el receptor del Antígeno de Membrana Apical (AMA-1), la cual es una interacción vital para el proceso de invasión del parásito, dándole así, propiedad de ser un potencial candidato a vacuna de subunidades. Dada la importancia de la investigación en caracterización de las interacciones proteína - célula, este estudio describe por primera vez la interacción a glóbulos rojos bovinos de la proteína RON2 de *B. bovis*. Para esto, se clonaron y expresaron en *E. coli* dos fragmentos conservados de RON2 (RON2 C y RON2 N), para así evaluar su porcentaje de unión a glóbulos rojos por medio de citometría de flujo. Ambos fragmentos recombinantes se expresaron y purificaron de manera exitosa a partir del medio heterólogo y presentaron actividad de unión a los glóbulos rojos, en mayor medida la porción carboxi-terminal de RON2. Estos hallazgos sugieren que RON2 de *B. bovis* interactúa con estas células y por ende posee un importante rol como proteína de invasión.

Palabras Claves: Proteína Recombinante, RON2, *Babesia bovis*, Babesiosis

ABSTRACT

The *Apicomplexa* parasite, *Babesia bovis*, is the main causal agent of bovine babesiosis, which is the most important disease transmitted by arthropods in cattle. Currently available vaccines are based on attenuated parasites, which makes their transport and storage difficult, and sometimes can cause reversion to virulence. In the invasion mechanism of *Apicomplexa* parasites, such as *Toxoplasma* and *Plasmodium*, Rhoptry Neck Protein (RON2) binds to the membrane of the target cell to be the receptor for Apical Membrane Antigen (AMA-1), this is a vital interaction for the invasion process of the parasite, giving it the property of being a potential candidate for a subunit-based vaccine. Given the importance of research in characterizing protein-cell interactions, this study describes for the first time the interaction of RON2 protein of *B. bovis* with bovine red blood cells. For this, two conserved fragments of RON2 (RON2 C and RON2 N) were cloned and expressed in *E. coli*, in order to evaluate their binding percentage to red blood cells by flow cytometry. Both recombinant fragments were successfully expressed in the heterologous system and showed binding activity to bovine red blood cells, predominantly the carboxy-terminal portion of RON2. These results suggested that RON2 from *B. bovis* interact with this type of cells and has an important role as an invasion protein.

Keywords: Recombinant Protein, RON2, *Babesia bovis*, Babesiosis

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MARCO TEÓRICO.....	14
3.1. Etiología y ciclo biológico.....	14
3.2. Patogénesis y fisiopatología	15
3.3. Diagnóstico	16
3.4. Epidemiología	17
3.5. Control y prevención	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1. Aspectos Éticos	11
4.2. Antecedentes	11
4.3. Objetivo Específico 1: Producir de forma recombinante la proteína RON2 de <i>B. bovis</i> en un medio procarionta (<i>E. coli</i>).....	12
4.4. Objetivo específico 2: Determinar la unión de proteína RON2 a la superficie de eritrocitos bovinos.	16
5. RESULTADOS	17
5.1. Transformación de los genes sintéticos en <i>E. coli</i>	17
5.2. Expresión de RON2.....	17
5.3. Purificación por cromatografía de afinidad	19
5.4. Unión de RON2 y glóbulos rojos bovinos.....	19
6. DISCUSIÓN.....	22
7. CONCLUSIONES	25
8. RECOMENDACIONES	26
9. REFERENCIAS.....	27
ANEXOS.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Babesia bovis</i>.	15
Figura 2. Mapa del vector pET-24b (+).	12
Figura 3. Confirmación de las colonias transformadas por medio PCR.	17
Figura 4. Análisis de expresión de las proteínas recombinantes por WB	18
Figura 5. Verificación de purificación de las proteínas recombinantes	19
Figura 6. Ejemplo de análisis de citometría de flujo en FlowJo™ v10.7.	20
Figura 7. Porcentaje de unión de RON2 a glóbulos rojos bovinos.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMA I:** Antígeno de Membrana Apical 1
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- APC:** Alofocianina
- CV:** Volúmenes de columna
- DO:** Densidad óptica
- ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- G-RED/O:** Glutación oxidado y reducido
- GAMA:** Antígeno de micronemas anclado a GPI
- ICA:** Instituto Colombiano Agropecuario
- IL-10:** Interleuquina 10
- IL-12:** Interleuquina 12
- IL- 18:** Interleuquina 18
- INF- γ :** Interferón γ
- IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- LAMP:** Amplificación isotérmica mediada por bucle
- LB:** Medio Luria Bertani
- MJ:** Unión móvil del inglés moving junction
- MSA:** Antígeno de membrana del merozoíto
- OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal
- ON:** Oxido Nítrico
- PBS:** Buffer fosfato salino
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- RAP:** Proteína asociada a las Roptrias
- RON2:** Proteína del cuello de las Roptrias 2
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato
- TA:** Temperatura Ambiente
- TNF α :** Factor de necrosis tumoral α
- TRAP:** Proteína adherente relacionada a trombospondina

UFC: Unidades formadoras de colonia

WB: Western Blot

1. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina conocida también como ranilla roja, es una enfermedad hemoparasitaria causada por protozoarios *Apicomplexa* del género *Babesia*, dentro del cual las especies *B. bovis* y *B. bigemina* producen la mayoría de las infecciones en los bovinos. Estos parásitos son transmitidos principalmente por la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Polanco & Ríos, 2016) del trópico suramericano y se replican dentro de los glóbulos rojos bovinos, causando cuadros de anemia, fiebre, pérdida de peso, hemoglobinuria, debilidad y deshidratación (Bock et al., 2004). A pesar de que el índice de mortalidad es bajo, la enfermedad causa un importante impacto económico reflejado en la disminución en la producción de leche y carne, la ocurrencia de abortos esporádicos y los costos del tratamiento (Osrio et al., 2010). Según cifras estimadas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), las pérdidas económicas de las enfermedades hemoparasitarias alcanzarían cifras aproximadas de \$12.000.000.000 de pesos anuales (Benavides, 2001), posicionándolas así, como la enfermedad transmitida por vectores de mayor importancia en la industria ganadera.

En los últimos años, la evidente aparición de resistencia, tanto del protozoario como del vector a los diferentes productos farmacológicos, ha conllevado a la búsqueda de otras estrategias de control y prevención de la enfermedad como el desarrollo de vacunas. Esta estrategia se ha estudiado en otros parásitos *Apicomplexa*, y ha mostrado tener resultados prometedores. Sin embargo, los estudios de vacunas contra *B. bovis* usando parásitos vivos (atenuados) han mostrado que, a pesar de disminuir virulencia y severidad del cuadro clínico, éstas generan una pobre inmunogenicidad, son poco eficientes por su variabilidad genética y tienen un alto costo de fabricación (de Waal & Combrink, 2006) (Rittipornlertrak et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, para el desarrollo de vacunas eficaces, se han llevado a cabo otros enfoques, como, por ejemplo, el estudio de moléculas individuales implicadas en el proceso de adhesión e invasión del protozoario a su célula diana, para así caracterizar y evaluar su rol como potenciales candidatos vacunales (Florin Christensen et al., 2014).

En ese sentido, el Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA-1) y las proteínas del cuello de las roptrias (RONs) son de particular interés dado que son esenciales para la invasión de otros parásitos Apicomplexa como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* a sus células diana. Se ha demostrado que estas proteínas forman un complejo AMA/RONs, en donde la proteína 2 del cuello de las roptrias (RON2) es secretada por el parásito y posteriormente se incorpora transmembranalmente en el eritrocito para cumplir el papel como receptor para el dominio I de la proteína AMA-1, la cual, al ser secretada, se ubica en la superficie de membrana del parásito (Hossain et al., 2012; Lamarque et al., 2011) formando de esta manera una unión estrecha entre el parásito y la célula conocida en inglés como “*tight junction/moving junction*” (MJ) (Shen & Sibley, 2012). En el caso de *Babesia*, se han identificado y caracterizado genes codificantes de la proteína RON2 en *B. microti* y *B. divergens* (Ord et al., 2016). Lo anterior es soportado, dado que se ha demostrado que el uso de anticuerpos contra RON2 disminuye la tasa de invasión del parásito a su célula diana, por consiguiente, caracterizar las interacciones inter e intramoleculares que ocurren con la proteína RON, sería vital para la identificación de posibles candidatos vacunales idóneos contra *B. bovis* (Besteiro et al., 2009; Collins et al., 2009; Ord et al., 2016).

Basado en lo anterior y teniendo en cuenta la importancia de la proteína RON2 en la formación de la unión estrecha entre los parásitos *Apicomplexa* y su célula diana, así como la falta de información científica de la misma en *B. bovis*, este trabajo tiene como propósito determinar el rol de unión a eritrocitos bovinos de dos fragmentos de RON2 de *B. bovis* obtenidos de forma recombinante en un medio procariota. Los resultados obtenidos permitirán contribuir con el conocimiento relacionado al rol de las proteínas de invasión del hemoparásito y de esta manera contribuir a futuro en el desarrollo de métodos de control basado en vacunas de subunidades.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción de la proteína del cuello de las roptrias 2 (RON2) de *B. bovis* a eritrocitos bovinos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Producir de forma recombinante la proteína RON2 de *B. bovis* en un medio procariota (*E. coli*).
- 2) Determinar la unión de proteína RON2 a los eritrocitos bovinos.

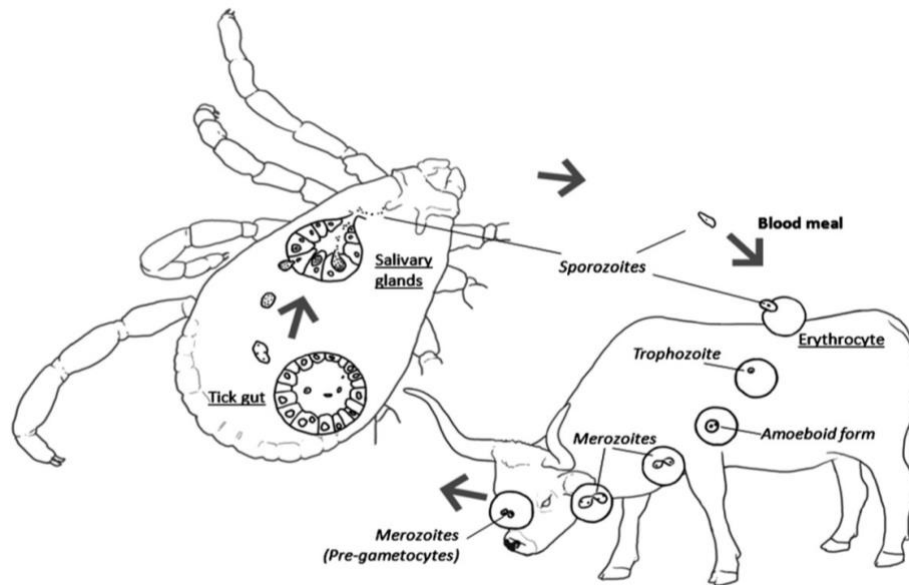
3. MARCO TEÓRICO

3.1. Etiología y ciclo biológico

La babesiosis bovina, es una enfermedad hemoparasitaria causada por protozoarios del phylum *Apicomplexa*, género *Babesia*, dentro del cual, las especies *B. bovis* y *B. bigemina* son las causantes de la mayoría de las infecciones en los bovinos. La transmisión de estos parásitos se produce a través de la picadura de garrapatas infectadas, donde la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es el principal vector del microorganismo en el trópico suramericano (Jalovecka et al., 2019; OIE, 2013). *Babesia bovis* es una especie pequeña y pleomórfica, típicamente identificada en el frotis sanguíneo como un único cuerpo intraeritrocitario, ya sea como un par unido en forma de pera o uno solo pequeño y redondo, estas miden de 1,5 por 2,4 μm o 1 a 1,5 μm respectivamente (Jalovecka et al., 2019; Taylor et al., 2015).

El ciclo de vida de *B. bovis* comprende dos fases: la fase sexual, realizada en un hospedero invertebrado (garrapata como hospedero definitivo) y una fase asexual, realizada en un hospedero vertebrado (bovino como hospedero intermediario) [Figura 1]. El bovino es infectado con el hemoparásito durante la alimentación de la garrapata. Los esporozoítos procedentes de la glándula salival del ectoparásito entran al torrente sanguíneo e invaden los glóbulos rojos del hospedero, donde se convierten en trofozoítos. Los trofozoítos se dividen en merozoítos mediante fisión binaria, posteriormente destruyen la célula e infectan a otros eritrocitos del hospedero. El ciclo continúa cuando algunos merozoítos diferenciados en gametogonias son ingeridos por una garrapata durante su alimentación. Ya en el lumen intestinal del artrópodo, los gametocitos se fusionan y crean un cigoto móvil denominado

ooquineto, este invade las células intestinales de la garrapata, donde comienza la división meiótica, resultando en la producción de quinetos los cuales se diseminan a través de la



hemolinfa teniendo como resultado una transmisión transovárica (al invadir el tejido ovárico) o transtadial (al invadir las glándulas salivales); en este último, los quinetos se convierten en esporoblastos, los cuales permanecen inactivos hasta que la garrapata se alimenta de otro hospedero, en donde el esporoblasto se activa y libera múltiples esporozoítos infecciosos hacia los vasos sanguíneos del hospedero (Jalovecka et al., 2019; Yabsley & Shock, 2013).

Figura 1. Ciclo de vida de *Babesia bovis*. Modificado de: (Marcelino et al., 2012)

3.2. Patogénesis y fisiopatología

La replicación del hemoparásito dentro de los glóbulos rojos bovinos implica una serie de cambios muy atípicos en la arquitectura celular de los mismos. Se ha demostrado que en infecciones por *B. bovis*, los glóbulos rojos tienden a presentar malformaciones estructurales en forma de crestas en su superficie (Gohil et al., 2010), haciendo que estos se adhieran y acumulen en el endotelio vascular, evitando así la destrucción de los mismos por el bazo; esto sumado a la liberación de citoquinas proinflamatorias por la presencia del parásito en la sangre lo que conlleva a desórdenes coagulativos, daño endotelial, aumento de la permeabilidad capilar y estasis circulatoria. Como resultado de los trastornos hemodinámicos

y de la destrucción de glóbulos rojos por parte el parásito, pueden presentarse signos de distrés respiratorio por la falta de oxígeno y fiebre persistente en respuesta a la infección (Boes & Durham, 2017; Suarez et al., 2019). Los casos agudos suelen estar acompañados de signos como ictericia, hematuria y esplenomegalia. Los signos neurológicos y pulmonares causados por secuestro de los glóbulos rojos parasitados en la microvasculatura son bastante característicos de *B. bovis* en sus etapas más graves. Se cree que esta presentación grave de la enfermedad estaría parcialmente medida a la respuesta inmunitaria del individuo, debido a una sobreproducción de mediadores como interferón γ (INF- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y Óxido Nítrico (NO), así como liberación de IL-10, IL-12 e IL-18, dando a lugar un aumento de repuesta inflamatoria y daño tisular en los tejidos que contienen los glóbulos rojos secuestrados (Bock et al., 2004; Suarez et al., 2019).

3.3. Diagnóstico

Los métodos diagnósticos laboratoriales para este hemoparásito suelen dividirse en directos (evidencia de la presencia del parásito) o indirectos (anticuerpos generados por el individuo). El diagnóstico microscópico se basa en la tinción de frotis sanguíneos con Giemsa, para así observar al parásito dentro de los glóbulos rojos. A pesar de ser económica y de rápida ejecución, suele estar limitada a individuos en fase aguda de la enfermedad y con una alta parasitemia. Por ende, en animales con baja parasitemia o en estado crónico de la enfermedad, se recomienda utilizar otros métodos más sofisticados para llegar a un diagnóstico definitivo (J. Mosqueda et al., 2012; Spickler, 2018).

Las pruebas serológicas incluyen: (1) Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) utilizando antígenos recombinantes del parásito, detectan la presencia de anticuerpos ante el parásito y llegan a ser muy útiles al momento de procesar grandes números de muestras. Se ha observado que, según el antígeno utilizado, pueden presentarse reacciones cruzadas con *B. bigemina*. En ese sentido, investigaciones recientes en el uso de ELISA competitivas llegaría a mejorar este problema. (2) La inmunofluorescencia Indirecta detecta principalmente IgG bovina mediante el uso de un anticuerpo secundario policlonal, lo cual aumenta a

especificidad y sensibilidad, pero están limitadas a la calidad del antígeno que se utilice, experiencia del operador y a las posibles reacciones cruzadas con otras especies de *Babesia* (J. Alvarez et al., 2019; Boonchit et al., 2004; J. Mosqueda et al., 2012).

El diagnóstico molecular por PCR es reportado como el más sensible y específico aún en casos de baja parasitemia (hasta 1000 veces más sensible que el diagnóstico por frotis sanguíneo) y además pueden discriminar entre especies de *Babesia* (OIE, 2013). La amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) se ha considerado como una opción más económica y rápida para el diagnóstico molecular de la babesiosis. A pesar de no poseer la misma sensibilidad y especificidad que la PCR, como ventaja frente a esta tiene el no requerir equipamiento sofisticado, por lo que es una alternativa al diagnóstico molecular en campo y en laboratorios poco especializados (J. Mosqueda et al., 2012; Spickler, 2018).

3.4. Epidemiología

De acuerdo con la Organización Internacional para la Sanidad Animal (OIE), la babesiosis bovina es una enfermedad de reporte obligatorio debido al impacto económico y sanitario que causa a nivel internacional. Para el año 2019, la babesiosis bovina se encontraba en situación de enfermedad clínica demostrada en todo el territorio en 62 países y limitada para cierta(s) zona(s) en 8 países (OIE, 2019). Según el último reporte anual entregado por el ICA, hubo 9528 predios afectados por enfermedades infecciosas en el país, de los cuales el 6,87 % correspondieron a enfermedades causadas por hemoparásitos (ICA, 2016).

Los pocos estudios epidemiológicos realizados en el país se han concentrado principalmente en las zonas Norte Andina y Caribe. Se han reportado prevalencias para *B. bovis* de 14,4% en Turbo, Antioquia (González et al., 2018), seroprevalencias del 75% en Puerto Berrio, Antioquia (Osorio et al., 2010) y 73,4% en Córdoba (Zips, 1989), así como presencia del hemoparásito en garrapatas colectadas de hatos bovinos del norte del país (González Obando et al., 2020; López et al., 2012). Sumado a esto, en la última década se ha registrado presencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a mayores altitudes de lo usual, tal como el altiplano

cundiboyacense, lo cual pone en evidencia cambios en la ecología del vector y por ende, el riesgo de una alta transmisión del hemoparásito (Cortés, 2011; Cortes et al., 2010).

3.5. Control y prevención

El tratamiento exitoso de la babesiosis depende del diagnóstico temprano y la pronta administración de los fármacos escogidos. El diaceturato de diminazene (3-5 mg/kg) y dipropionato de imidocarb (1-3 mg/kg) se reportan como los fármacos de eficacia contra esta parásito (Taylor et al., 2015). Sin embargo, el control de las garrapatas y el manejo del entorno de los animales, son factores inherentes para el óptimo manejo de la babesiosis. Algunas estrategias de control y prevención son la rotación de potreros, la determinación relativa de la población de garrapatas a lo largo del año para implementar estrategias de aplicación de acaricidas, así como la rotación de estos productos; el manejo de las pasturas y la implementación de otros tipos de forraje en la producción (Rodríguez Vivas et al., 2018). Estudios *in vitro* en estrategias de control biológico de las garrapatas por medio de hogos entomopatógenos, se han reportado como prometedores, sin embargo, pocos son los estudios que arrojan resultados iguales o superiores al implementarse en campo (Rodríguez Vivas et al., 2018; Tofiño Rivera et al., 2018).

El control basado en vacunación se ha desarrollado principalmente mediante la producción e inoculación de cepas vivas atenuadas, ya sea a partir de sangre de donantes infectados o proveniente de cultivos *in vitro*. Generalmente esta formulación puede ser única para *B. bovis*, bivalente (*B. bovis* y *B. bigemina*) o trivalente, ofreciendo protección contra *Anaplasma spp* (OIE, 2010). En Latinoamérica, actualmente Argentina, Brasil, Colombia, México y Uruguay, son los países donde se reporta la producción de vacunas comerciales vivas atenuadas para la babesiosis bovina por *B. bovis* (Florin Christensen et al., 2014). Este tipo de formulación disminuye la severidad de los signos clínicos del animal, pero se reportan múltiples limitaciones en su funcionalidad, distribución y conservación, dentro de ellas: vida útil corta, susceptibilidad a contaminación, pérdida de inmunogenicidad por múltiples pasos sanguíneos y reversión de la virulencia. Por lo anterior, el estudio de vacunas de subunidades por medio de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos ha tomado mayor

importancia debido su bajo costo, facilidad de escalabilidad y estandarización, almacenamiento, distribución y análisis de seguridad. Las proteínas involucradas en la invasión de los *Apicomplexa* a su célula diana, han sido foco estudio como candidatos vacunales debido a que algunas se han reportado como conservadas en diferentes géneros y especies, lo cual evitaría problemas de baja eficiencia, asociada a la alta variabilidad genética de los parásitos (Florin Christensen et al., 2014; Shen & Sibley, 2012). En *B. bovis* se han identificado y caracterizado proteínas de invasión conservadas como posibles candidatos vacunales, entre estas: AMA-1 (Barreda et al., 2020), RON-2(Hidalgo Ruiz et al., 2018), MSA (Antígeno de superficie del merozoito)(Giménez et al., 2016), RAP-1 (Proteína asociada de las roptrias) y TRAP (Proteína adherente relacionada a trombospondina) (Terkawi et al., 2013); en su mayoría se ha realizado ensayos de respuesta inmune celular, generación de anticuerpos e inhibición de la invasión en modelos *in vitro*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

El presente trabajo considero lo estipulado en la Ley de 84 de 1989 y se realizó con el aval del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (Anexo 1)

4.2. Antecedentes

Diseño del gen sintético

Este trabajo se encuentra enmarcado dentro de un macroproyecto en el cual los investigadores realizaron el análisis *in silico* en búsqueda de regiones conservadas del gen de RON2 de *B. bovis* por medio del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)(Stecher et al., 2020). Teniendo en cuenta la funcionalidad reportada para la molécula en distintos microorganismos *Aplicomplexa.*, se hizo una selección de regiones conservadas del gen, tomando la secuencia de nucleótidos de referencia Bbov_I001630 de la cepa virulenta T2Bo de *B. bovis* (piroplasmadb.org). Una vez establecidas las regiones de los genes conservados y sus aminoácidos resultantes, se procedió a dividir las regiones de la proteína en las porciones carboxilo y amino terminal (**RON2C** y **RON2N**, respectivamente), para así poder ser expresadas eficientemente en un medio procariota debido al tamaño del gen y su proteína resultante. Posteriormente, se diseñó un gen sintético con codones optimizados para *E. coli* y se envió a sintetizar en GeneScript USA, Inc., con el fin de realizar la expresión de los fragmentos de RON2 de manera recombinante usando el vector **pET-24b (+)**. Este vector se caracteriza por poseer gen de resistencia bacteriana a kanamicina y una secuencia codificante para una cola de 6 histidinas, la cual es útil para identificar la proteína de interés por medio de un anticuerpo anti-histidinas y facilitar el proceso de purificación (Figura 2).

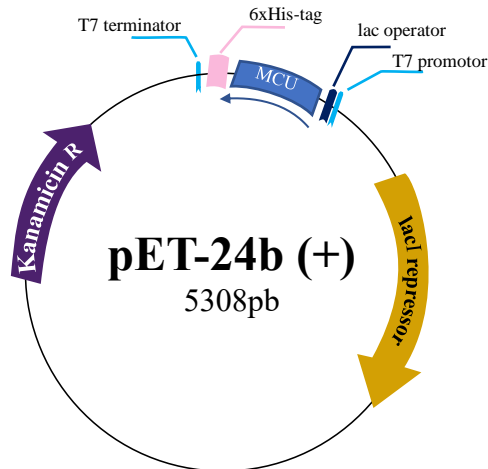


Figura 2. Mapa del vector pET-24b (+).

Esquematación del vector pET-24b (+) utilizado para clonación en bacterias, se ilustra la región del gen de resistencia a kanamicina, el represor y operador lac, T7 promotor y terminator, sitio múltiple de clonación (MCU) y etiqueta de polihistidinas (6xHis-tag).

Modificado de: SnapGene software (from Insightful Science; available at snapgene.com)

4.3. Objetivo Específico 1: Producir de forma recombinante la proteína RON2 de *B. bovis* en un medio procariota (*E. coli*)

Amplificación y clonación

Los plásmidos sintéticos, con el gen de interés, se utilizaron para transformar células *E. coli* JM109 (Promega) para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 50µL de células a las cuales se añadió 2µL del plásmido y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se hizo un choque térmico a 42°C por 1 minuto seguido de 5 minutos a 4°C, luego se adicionó medio S.O.C. (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM D-glucosa) y se incubó por 1 hora a 37°C a 240 rpm. El cultivo se plaqueó en medio Luria Bertani (LB) agar (10g triptona, 5g de extracto de levadura, 2g de NaCl y 15g agar bacteriológico) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 0,1% de D-Glucosa y luego se incubó a 37°C durante 16 horas. Al día siguiente se escogieron las unidades formadoras de colonia (UFC) con mejor morfología (colonias únicas, cremosas y redondas) a las cuales se les realizó PCR para confirmar la presencia del gen completo dentro del vector. En este procedimiento se

utilizaron cebadores comerciales correspondientes a la región del T7 promotor y terminador del plásmido. La amplificación se llevó a cabo utilizando la enzima ADN polimerasa GoTaq Flexi® (Promega) en una reacción final de 10 µL, realizándose de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 30 seg a 56°C y 1 min a 72°C, y finalmente, una extensión de 5 min paso a 72°C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% para confirmar su tamaño en pares de bases basándose en el marcador de pares de bases HyperLadderII. Los clones con amplicones de ~1324 y ~946 pb (RON2 N y RON2 N respectivamente) se consideraron como positivos a la transformación. Finalmente, el ADN plasmídico de los clones positivos se extrajo con el kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) y se cuantificó a una longitud de onda de 260 y 280 nm por medio del equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™)

Los ADN plasmídicos purificados se utilizaron para transformar células *E. coli* BL21-DE3 (OneShot® de Invitrogen) para posteriormente seleccionar las colonias transformadas como se describió anteriormente. De las colonias positivas en la PCR, se procedió a realizar expresiones piloto de cada proteína.

Expresiones piloto y a escala

Las UFC positivas se homogenizaron en 2,5 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 0,1% de D-Glucosa y luego se incubaron a 37°C por toda la noche a 250 rpm. Al día siguiente el cultivo se escaló a 50 ml con medio LB más kanamicina y D-Glucosa a las concentraciones ya mencionadas y se incubaron por tres horas y hasta alcanzar la DO₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, se adicionó Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1mM para inducir la expresión. Para evaluar la expresión en el tiempo, se tomaron alícuotas de 1ml del cultivo cada hora durante 4 horas las cuales se centrifugaron a 13'000 rpm por 5 min a 4°C. El pellet celular se trató con 100µL de Buffer Urea 8M (Urea8M; NaH₂PO₄ 100mM; Tris 10mM; Imidazol 30 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (SIGMAFAST®) y lisozima (1mg/ml). El sobrenadante que contiene la proteína de interés se obtuvo mediante centrifugación a 13'000 rpm por cinco min a 4°C.

La hora óptima de expresión post-inducción de las proteínas se analizó mediante Western Blot (WB). Para esto, se tomó 15µL del sobrenadante que contiene la proteína de interés, los cuales se homogenizaron con buffer laemmli (0,5M de tris-HCL pH 6,8; 25% de glicerol; 10% de SDS; 0,5% de azul de bromofenol y 0,5% de β-mercaptoetanol) y posteriormente se sometió la muestra a 95°C por 5 min. Estas muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida, que posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por 150 minutos a 12 voltios. Las membranas se incubaron con solución de bloqueo que contiene 5% de leche descremada preparada en PBS (13 mM de NaCl; 0,27mM de KCl; 0,43mM Na₂HPO₄.7H₂O y 0,14mM de KH₂PO₄) más detergente tween 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal anti-histidinas (Invitrogen) acoplado a peroxidasa en una dilución 1:4500 preparada en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. La interacción anticuerpo-proteína se determinó mediante el uso del kit sustrato para peroxidasa (Vector VIP SK-4600®).

Una vez se determinó la hora óptima de incubación post-inducción, se realizaron expresiones a mayor escala para aumentar la obtención de proteína. En este caso, se sembró el clon positivo a expresión en 20 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 0,1% de D-Glucosa y luego se incubó por toda la noche a 37°C a 250 rpm. Al día siguiente, se escaló el cultivo a 300ml de medio LB más kanamicina y D-glucosa a las concentraciones ya mencionadas y se incubó por 3 h y hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Posteriormente se adicionó IPTG a 1mM y se incubó el tiempo indicado para la expresión óptima de dicho clon. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm por 30min a 4°C para obtener el pellet celular.

Evaluación de Solubilidad

Para evaluar si la proteína de interés se encuentra de forma soluble (bien plegada y libre en citoplasma) o insoluble (agrupada en cuerpos de inclusión) se realizó la lisis del pellet celular usando dos buffers: Buffer Urea 8M (para la extracción denaturante) y Buffer B1 (50 mM TrisHCl pH 8.0; NaCl 300mM; 30 mM imidazol) [para la extracción no denaturante], ambos

suplementados inhibidores de proteasas y 1 mg/ml de lisozima. El pellet celular se homogenizó en 500µl de buffer B1 y se almacenó a -80°C o Urea 8M o a 4°C en rotación continua con 4 rpm, respectivamente. La extracción soluble se realizó haciendo un choque térmico, por medio de un proceso de congelación en nitrógeno líquido y luego en baño maría a 42°C, tres veces. Luego, los cultivos trabajados con ambos tratamientos se centrifugaron a 13.000g por 30 minutos a 4°C y se analizó el sobrenadante por WB con el protocolo antes mencionado.

Purificación de la proteína

La purificación de las proteínas se realizó mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados, usando una columna de resina de ácido nitrilotriacético de níquel (HisTrap FF™) [GE Healthcare] en el equipo ÄKTA™start (GE Healthcare). La columna se equilibró con 5 volúmenes de columna (CV) del buffer B1 o Urea 8M según se requiera, luego se adicionó la muestra a la columna y se guardó la fracción no retenida. Se lavó la columna con 15 CV del buffer respectivo suplementado con NaCl 0,3 mM y Tritón X100 0,1% para liberar las proteínas no unidas y las interacciones débiles a la resina. Posteriormente, en caso de tratarse la proteína con tratamiento denaturante, se realizó un proceso de replegamiento usando gradientes decrecientes de Buffer Urea 8M (75%, 50%, 25% y 0% de urea) complementados con glutatión oxidado y reducido (G-RED/OX) a concentraciones de 0,1 mM y 1mM respectivamente. Por último, las proteínas unidas a la resina, se eluyeron en fracciones de 1mL de PBS que tiene imidazol en gradiente (50mM a 500mM). Las fracciones de las proteínas purificadas se separaron por medio de SDS-PAGE y se verificaron por tinción con azul de Coomassie y WB. Una vez confirmada la pureza de las fracciones, se agruparon y dializaron abundantemente en PBS y posteriormente se concentraron con polietilenglicol Mn 20.000. La concentración de proteína se cuantifico usando el kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (ThermoScientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4. Objetivo específico 2: Determinar la unión de proteína RON2 a la superficie de eritrocitos bovinos.

Preparación de las muestras de sangre bovina

La sangre bovina con anticoagulante, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para separar el plasma y la capa flogística, los cuales se retiraron cuidadosamente. Luego, se realizaron dos lavados de la siguiente manera: se tomaron 500 μ l de los glóbulos rojos y se homogenizaron con 600 μ l PBS 1X, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante y remanentes de la capa flogística se descartaron.

Ensayo de unión

Tomando en cuenta el protocolo descrito por Baquero et al., 2017, se utilizó una concentración de 1,5 μ M de las proteínas purificadas y se incubaron por triplicado con una solución de PBS 1X que contiene 5 μ l de glóbulos rojos bovinos previamente lavados, durante 16 h, a 4 °C y con agitación constante de 4 rpm. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X y luego se incubaron con anticuerpo anti-histidinas acoplado a alofococianina (APC) [R&Dsystems] durante 25 min en oscuridad y a 4 °C. La unión de las proteínas a los eritrocitos bovinos se cuantificó adquiriendo 100 mil eventos en el citómetro FACSCanto II (BD Bioscience) y los datos obtenidos fueron analizados en el software FlowJo™ v10.7.

Análisis Estadístico

Los valores de las medias y desviaciones estándar, se calcularon y graficaron de las mediciones de tres experimentos independientes. La significancia estadística se evaluó comparando las medias, usando un nivel de significancia de $P < 0,05$. Para determinar la existencia o no de una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, se realizó un comparación múltiple de las medias de los grupos experimentales con el control, para esto se utilizó la prueba de Tukey's y el análisis de varianza (ANOVA). Para el análisis estadístico y la realización de las gráficas se uso el software GraphPad Prism v8.0.0 (San Diego, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Transformación de los genes sintéticos en *E. coli*

Las UFC seleccionadas fueron sometidas a PCR de colonia y evaluadas en un gel de agarosa al 1% (Fig. 3), donde se observó la amplificación de fragmentos de **~946 pb** (RON2 C) y **~1324 pb** (RON2 N), cubriendo ~ 753pb para el gen de RON2 C, ~ 1131 pb para el gen de RON2 N y **~193 pb** correspondientes a los primers del vector plasmídico

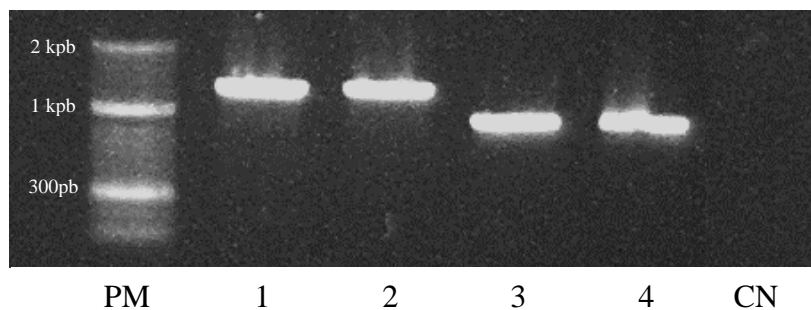


Figura 3. Confirmación de las colonias transformadas por medio PCR.

Carriles 1 y 2 corresponden producto de **~1324 pb** (RON2 N). Carriles 3 y 4 producto de **~946 pb** (RON2 C). CN: Control Negativo. PM: Patrón molecular (HyperLadder II).

5.2. Expresión de RON2

Las expresiones pilotos se llevaron a cabo con las colonias positivas a la PCR. Los resultados en expresión con respecto al tiempo demostraron que para RON2 N con tan solo 1 hora post inducción, se obtenía una buena cantidad de proteína (Figura 4 A), mientras que RON2 C requirió como mínimo 3 horas de incubación con el IPTG (Figura 4 B). Posteriormente, las expresiones a escala con el tratamiento denaturante y no denaturante, se verificaron por SDS-

PAGE y WB. Como se observa en la Figura 4 C, se obtuvieron proteínas de ~ **42 kDa** (RON2 N) y ~ **48 kDa** (RON2 C).

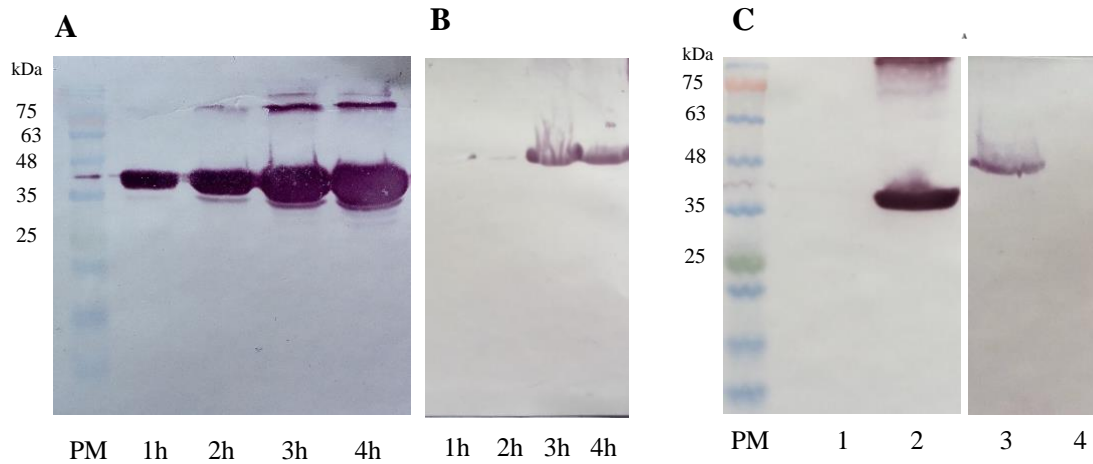


Figura 4. Análisis de expresión de las proteínas recombinantes por WB.

A. Reconocimiento de la expresión en horas de RON2 N post-inducción. **B.** Reconocimiento de la expresión en horas de RON2 C post-inducción. **C.** Expresión a escala y tratamiento del pellet celular. Carriles 1 y 2 corresponden al tratamiento no denaturante y denaturante de RON2 N respectivamente. Carriles 3 y 4 corresponden al tratamiento denaturante y no denaturante de RON2 C respectivamente. PM: Patrón molecular (Opti-Protein XL Marker).

En general, ambos fragmentos recombinantes de RON2 pudieron expresarse exitosamente. Se observó que ambas proteínas fueron recuperadas de cuerpos de inclusión con el tratamiento denaturante (Fig C, carril 2 y 3).

5.3. Purificación por cromatografía de afinidad

Los resultados de purificación evaluados por tinción de azul de Coomassie muestran una única banda a la altura correspondiente para ambas recombinantes (Figura 5 A y B, línea 1), los cuales evidencia de un eficaz proceso de purificación libre de contaminantes. En el análisis por WB (Figura 5 A y B, línea 2, las diferentes bandas para RON2C y RON2N fueron reconocidas por el anticuerpo anti-histidinas sin inspecificidades (Figura 5 A y B, línea 2).

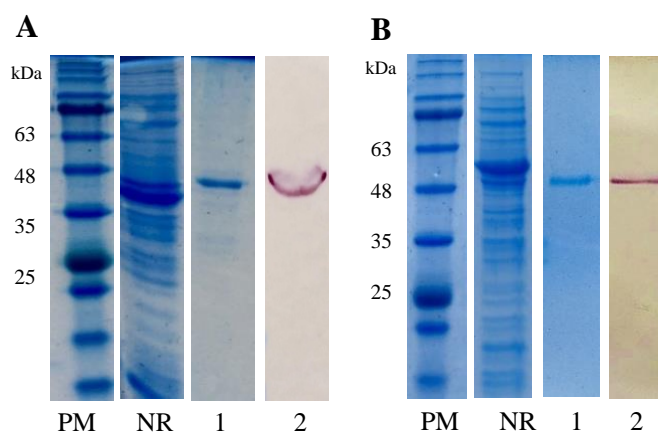


Figura 5. Verificación de purificación de las proteínas recombinantes.

A. Purificación de RON2N bajo condiciones denaturantes, carriles 1 y 2 **B.** Purificación de RON2C bajo condiciones denaturantes carriles 1 y 2, proteína purificada identificada con tinción de Coomassie y por WB respectivamente. PM: Patrón molecular (Opti-Protein XL Marker). NR: Fracción no retenida.

5.4. Unión de RON2 y glóbulos rojos bovinos

Las proteínas purificadas e incubadas con los glóbulos rojos bovinos, se analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar la interacción. A partir de la población excluida de glóbulos rojos (Figura 6 A y B), se calculó el porcentaje de unión de cada proteína (marcada con un anticuerpo anti-His acoplado a APC) a los glóbulos rojos bovinos (Figura 6 C). Para ambas proteínas se observó desplazamiento de la población al ser comparada con el control (Glóbulos rojos bovinos no incubados con proteína recombinante)

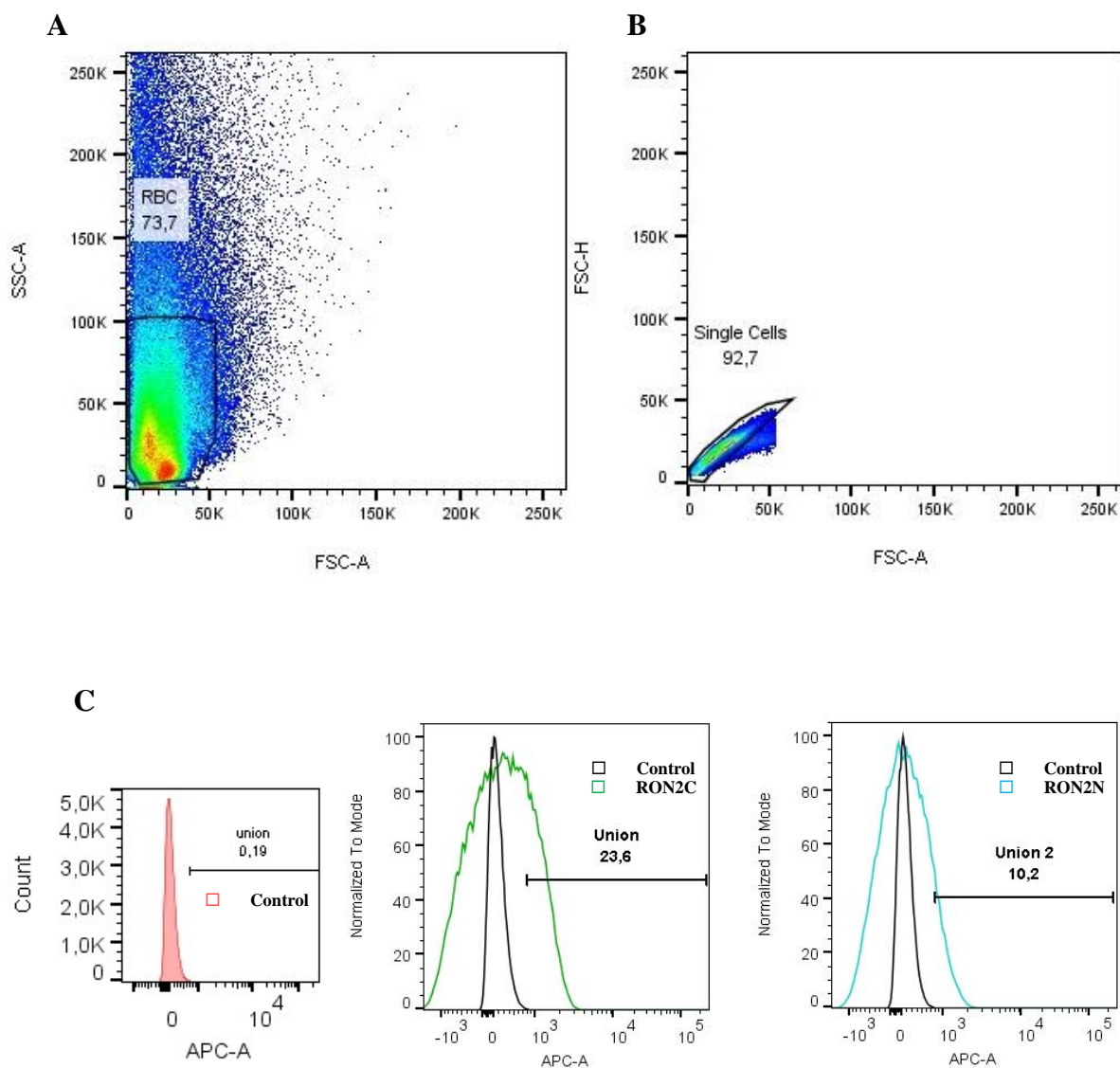


Figura 6. Ejemplo de análisis de citometría de flujo en FlowJo™ v10.7.

Los diagramas muestran la estrategia de selección de la población de eritrocitos en dot-plot y el análisis de unión en histogramas. **A.** Las células se seleccionaron por su complejidad y tamaño analizando la señal SSC-A contra FCS-A. **B.** En seguida, se excluyeron las dupletas enfrentando la señal FSC-H contra FSC-A. **C.** Por último, el porcentaje de las células unidas a la proteína se calculó mediante la señal de APC en comparación con el control.

En el análisis de los tres experimentos, se evidenció que el fragmento RON2N se une en un **12,6%±7,96** a los eritrocitos bovinos. En comparación, el fragmento RON2C se unió en mayor proporción, con valores de **23,6%±17,6** (Figura 7). Estos hallazgos son una sólida evidencia para sugerir que la proteína RON2 (principalmente la región carboxi-terminal) de *B. bovis* interactúa con los eritrocitos bovinos.

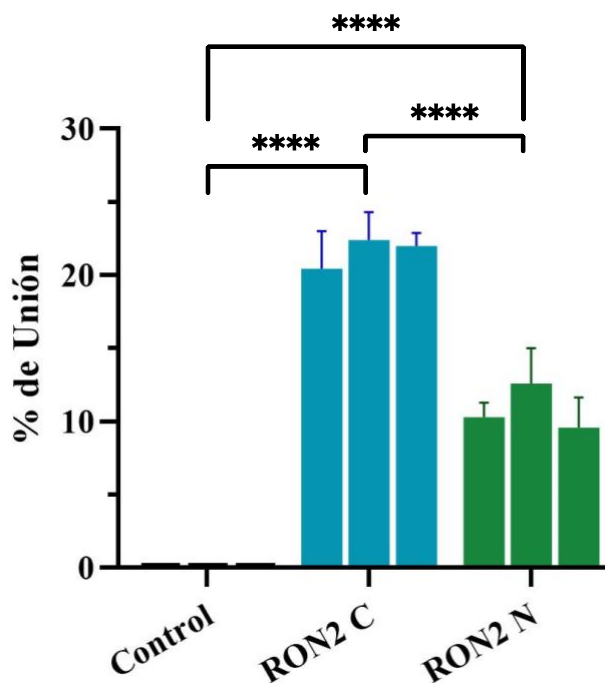


Figura 7. Porcentaje de unión de RON2 a glóbulos rojos bovinos.

El análisis de la citometría de flujo muestra el porcentaje de unión de los fragmentos recombinantes a los glóbulos rojos bovinos. El porcentaje de unión se expresó como la media y la desviación estándar de los tres experimentos independientes.

**** indica una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0,0001$.

6. DISCUSIÓN

La babesiosis bovina es la enfermedad transmitida por vectores de mayor importancia en el ganado bovino, por ende, la investigación de nuevas estrategias de control es de suma importancia para evitar las grandes pérdidas económicas que esta enfermedad genera. Se ha demostrado que los candidatos vacunales de subunidades contra *Babesia* podrían apuntar a varias etapas del ciclo de invasión del parásito, en donde las proteínas de superficie de los merozoítos y las proteínas secretadas por el parásito para internalizarse en los glóbulos rojos, se consideran como objetivos clave para el desarrollo de una vacuna eficaz (Rathinasamy et al., 2019). En este estudio se utilizó la proteína RON2 para evaluar su posible interacción con los eritrocitos, ya que esta proteína hace parte del primer complejo proteico que secretan parásitos como *Toxoplasma* y *Plasmodium* para la formación del MJ y posterior invasión (Tonkin et al., 2011). En contraste, aparte de RON2, la única proteína que hace parte del MJ de la cual se ha estudiado en *Babesia* es AMA-1. Esta se ha caracterizado y utilizado en ensayos de inhibición de la invasión con resultados positivos en *B. bovis* (Salama et al., 2013), *B. microti* (Moitra et al., 2015), *B. bigemina* (Torina et al., 2010) y *B. orientalis* (He et al., 2015). La proteína TRAP, además de estar involucrada en la unión inicial y movilidad del parásito en la superficie de la célula diana (Sibley et al., 1998), ha mostrado resultados de inmunidad proyectiva en *P. falciparum* (Lu et al., 2020; Tiono et al., 2018); esta se ha caracterizado en *B. bovis* y ha presentado inhibición de la invasión *in vitro* (Terkawi et al., 2013), en *B. orientalis* se ha caracterizado y en *B. bigemina* también se ha caracterizado y localizado, sin embargo, pese a que los ensayos de inhibición de la invasión *in vitro* con estas dos especies han dado resultados satisfactorios se ha determinado que esta proteína no es un antígeno inmunodominante (Montenegro et al., 2020). Anticuerpos obtenidos a partir de inmunización con las proteínas de superficie MSA y RAP han demostrado inhibición de invasión *in vitro*, pero al ser utilizadas como inmunógenos en modelos *in vivo*, a pesar de mostrar producción de anticuerpos, poca es la protección que producen al ser sometidos los bovinos a cepas virulentas (J. A. Alvarez et al., 2010; Giménez et al., 2016; Norimine et al., 2002). Esto se ha atribuido, a que, al ser proteínas expuestas, la variabilidad antigénica de las

mismas podría ser mayor y por ende sería un mecanismo utilizado por el parásito para evadir la respuesta inmunológica (J. A. Alvarez et al., 2010). En ese sentido, las moléculas involucradas en la formación del complejo MJ en los *Apicomplexa* son de particular interés, que además de ser conservadas, se han descrito como vitales dentro de este phylum de protozoarios (Shen & Sibley, 2012; Tonkin et al., 2011). Un estudio realizado con formulaciones vacúnales de AMA1-RON2 de *P. falciparum* en monos *Aotus* demostró producción de anticuerpos neutralizantes y protección en un 50% de los animales contra la infección (Srinivasan et al., 2017). Lo anterior nos da a entender que la investigación en formulaciones vacúnales con enfoque funcional, basadas en este complejo proteico, sería el enfoque más apropiado.

La expresión de los fragmentos recombinantes de la proteína RON2 se realizó por un medio procariota (*E. coli*), el cual se reporta como el más utilizado por sus ventajas metodológicas y económicas. A pesar de lo anterior, un problema común en este sistema de expresión, es la acumulación e interacción de las proteínas expresadas en el citoplasma, conllevando a la formación de cuerpos de inclusión insolubles (Ferrer Miralles et al., 2015). Este fenómeno se evidenció en este estudio tras recuperar la proteína únicamente mediante el tratamiento denaturante del pellet celular, haciendo necesario la implementación de un proceso de replegamiento para obtener una proteína estructuralmente idónea; por consiguiente, durante la purificación, se llevó a cabo un proceso de replegamiento de la proteína utilizando G-RED/OX a medida que se realizaba la diálisis de la urea.

Este proceso se implementó directamente en la columna de purificación (previo a la elución de la proteína), el cual se ha reportado como un método eficaz para el replegamiento, ya que al estar las proteínas de interés fijadas a una matriz, se disminuyen interacciones entre sí o con otras proteínas de la bacteria durante el proceso de cromatografía (The QIAexpressionist, 2005; Yamaguchi et al., 2013). De la misma manera, el uso de G-RED/OX desencadena un conjunto de ciclos de reducción y oxidación en la proteína, dando como resultado ruptura de enlaces disulfuro incorrectos y la formación de enlaces correctos y estables (Yamaguchi et al., 2013). Estudios realizados con proteínas de invasión como GAMA (Baquero et al., 2017), AMA I (Arévalo Pinzón et al., 2017) y RON2 (Bermúdez et al., 2018) de *Plasmodium vivax*,

que fueron sometidas a un proceso de replegamiento, no afectaron los diferentes experimentos. De la misma manera, estudios con el antígeno apical de membrana (MSA) de *B. microti* y la proteína asociada a roptrias (RAP) *B. bovis*, en los cuales las proteínas se recuperaron en cuerpos de inclusión y tuvieron que ser replegadas, se obtuvieron proteínas funcionales para ensayos de interacción proteína-célula e inhibición de invasión (Moitra et al., 2015); así como una proteína inmunológicamente activa (Norimine et al., 2002), respectivamente.

En el análisis de la citometría de flujo se encontró que los dos fragmentos recombinantes de RON2 presentaron unión a los eritrocitos bovinos, lo cual permite sugerir que la proteína si interactúa con estas células. Resultados similares se han descrito en *P. vivax*; en un estudio realizado por Bermúdez et al., 2018, se evidenció que dos regiones conservadas de RON2 expresadas en sistemas procariotas tuvieron la capacidad de interactuar con su célula diana, en este caso, reticulocitos humanos. Por otro lado, el fragmento carboxilo-terminal de RON2, fue el que presentó mayor porcentaje de unión a los eritrocitos bovinos en este estudio; esto es concordante con los resultados de estudios realizados con la proteína RON2 en *P. falciparum* (Hossain et al., 2012) en donde se ha descrito que la región carboxi-terminal de la proteína, es la responsable de la interacción con la membrana celular glóbulos rojos. De la misma manera en *T. gondii*, las regiones cercanas al carboxi-terminal de RON2, se han descrito como esenciales para la unión a la célula diana y posterior formación del complejo MJ (Tyler & Boothroyd, 2011).

Los hallazgos de este estudio soportan que, al igual que en otros *Apicomplexa*, la proteína RON2 de *B. bovis* posee regiones que interactúan con los glóbulos rojos bovinos, por tanto, es un avance significativo en el conocimiento acerca de la biología este hemoparásito. En las últimas décadas la búsqueda de candidatos contra la babesiosis bovina ha pasado del uso de organismos completos a la investigación de vacunas de subunidades, por esta razón los estudios actuales y futuros en identificación y caracterización de nuevos antígenos, junto con la comprensión de las interacciones parásito-hospedero, serán piezas claves para el desarrollo de estrategias de control sostenibles, novedosas y sobre todo efectivas contra este patógeno que genera tanto perjuicio en la industria ganadera de nuestro país.

7. CONCLUSIONES

- En este estudio se logró expresar y purificar exitosamente dos fragmentos recombinantes derivados de regiones conservadas y funcionales de RON2 de *B. bovis*, en un sistema heterólogo procariota: *E. coli*.
- El desarrollo de este trabajo determinó por primera vez que la proteína RON2, se unen a los glóbulos rojos bovinos, exhibiendo sus propiedades como proteína de unión durante la invasión de *B. bovis*.
- Similarmente a en otros *Apicomplexa*, la región carboxi-terminal de RON2C se une en mayor proporción a los glóbulos rojos bovinos. Este hallazgo proporciona una información importante en cuanto a la dinámica que posee esta proteína de invasión.

8. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de entender las diferentes interacciones entre la molécula RON2, el glóbulo rojo y las demás proteínas del complejo MJ, así como su capacidad inmunogénica, se requiere investigar en los siguientes campos:

- Con respecto a determinar la dependencia de la proteína en el proceso de invasión de *B. bovis*, sería de gran utilidad la realización ensayos de inhibición de invasión del parásito a glóbulos rojos mediante el uso de anticuerpos derivados de esta proteína.
- Evaluar la interacción entre los fragmentos de RON2 con las regiones conservadas reportadas de AMA-I, la cual se describe como fundamental para la formación del MJ en los *Apicomplexa*.
- Finalmente, para poder demostrar el potencial de RON2 como candidato vacunal, es necesaria la realización de estudios de inmunogenicidad y protección en modelos experimentales *in-vivo*.

9. REFERENCIAS

- Alvarez, J. A., Lopez, U., Rojas, C., Borgonio, V. M., Sanchez, V., Castañeda, R., Vargas, P., & Figueroa, J. V. (2010). Immunization of *Bos taurus* steers with *Babesia bovis* recombinant antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(1–2), 87–90. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01117.x>
- Alvarez, J., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia sp.* In persistently infected cattle. In *Pathogens* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
- Arévalo Pinzón, G., Bermúdez, M., Hernández, D., Curtidor, H., & Patarroyo, M. A. (2017). *Plasmodium vivax* ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain i contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10025-6>
- Baquero, L. A., Moreno-Pérez, D. A., Garzón Ospina, D., Forero Rodríguez, J., Ortiz, Suárez, H. D., & Patarroyo, M. A. (2017). PvGAMA reticulocyte binding activity: predicting conserved functional regions by natural selection analysis. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2183-8>
- Barreda, D., Hidalgo-Ruiz, M., Hernandez-Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo-Velasco, E., & Mosqueda, J. (2020). Identification of conserved peptides containing B-cell epitopes of *Babesia bovis* AMA-1 and their potential as diagnostics candidates. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(S2), 60–68. <https://doi.org/10.1111/tbed.13213>
- Benavides, E. (2001) Manejo integrado de plagas y enfermedades en explotaciones ganaderas. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. *Instituto Colombiano Agropecuario. Carta Fedegan*. 69: 52-6
- Bermúdez, M., Arévalo Pinzón, G., Rubio, L., Chaloin, O., Muller, S., Curtidor, H., & Patarroyo, M. A. (2018). Receptor–ligand and parasite protein–protein interactions in

- Plasmodium vivax*: Analysing rhoptry neck proteins 2 and 4. *Cellular Microbiology*, 20(7). <https://doi.org/10.1111/cmi.12835>
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathogens*, 5(2), 1000309. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. In *Parasitology* (Vol. 129, Issue SUPPL., pp. S247–S269). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Boes, K. M., & Durham, A. C. (2017). Bone Marrow, Blood Cells, and the Lymphoid/Lymphatic System. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult* (6th ed., pp. 724-804.e2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00013-8>
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Waghela, S. D., Wagner, G., & Igarashi, I. (2004). Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using C-Terminal Truncated Recombinant Antigens of *Babesia bovis* Rhoptry-Associated Protein-1 for Detection of Specific Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1601–1604. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1601-1604.2004>
- Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., & Blackman, M. J. (2009). An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathogens*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000273>
- Cortés, J. A. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *Biomédica*, 31(3), 268–271.
- Cortes, J. A., Echeverri, J. A. B., Cárdenas, J. A., & Herrera, L. A. P. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:197
- de Waal, D. T., & Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.042>
- Ferrer Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & Garcfa-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble

- proteins. In E. García (Ed.), *Insoluble Proteins. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1258, pp. 1–24). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1
- Florin Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. In *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Giménez, A. M., Françoso, K. S., Ersching, J., Icimoto, M. Y., Oliveira, V., Rodriguez, A. E., Schnittger, L., Florin-Christensen, M., Rodrigues, M. M., & Soares, I. S. (2016). A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN- γ producing cells. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1862-1>
- Gohil, S., Kats, L. M., Sturm, A., & Cooke, B. M. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: Moovin' forward. In *Trends in Parasitology* (Vol. 26, Issue 12, pp. 591–599). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>
- Gonzalez, J., Echaide, I., Pabón, A., Gabriel Piñeros, J., Blair, S., & Tobón-Castaño, A. (2018). Babesiosis prevalence in malaria-endemic regions of Colombia. *Journal of Vector Borne Diseases*. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.249480>
- González Obando, J., Holguín Rocha, A. F., & Tobón Castaño, A. (2020). Diagnóstico de *Babesia bovis* (Babesiidae) y *Babesia bigemina* (Babesiidae) en garrapatas recolectadas en los municipios Turbo y Necoclí (Antioquia) en 2014. *Actualidades Biológicas*. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a05>
- He, L., Fan, L., Hu, J., Miao, X., Huang, Y., Zhou, Y., Hu, M., & Zhao, J. (2015). Characterisation of a *Babesia orientalis* apical membrane antigen, and comparison of its orthologues among selected apicomplexans. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(3), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.010>
- Hidalgo Ruiz, M., Suarez, C. E., Mercado Uriostegui, M. A., Hernandez Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo-Velasco, E., León Ávila, G., Hernández, J. M., & Mosqueda, J. (2018). *Babesia bovis* RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3164-2>

- Hossain, M. E., Dhawan, S., & Mohmmmed, A. (2012). The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2690-z>
- ICA. (2016). *Sanidad Animal*. Reporte Anual 2016. <https://www.ica.gov.co/getattachment/6d2f08b5-da5d-49a2-ad3c-ef3ccfe06df7/Boletin-2016-Sanidad-Animal.aspx>
- J. Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, & G. J. Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 5, pp. 356–368). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- López, L., Flórez, S., Múnera, A., Ríos, S., & Ríos, L. (2012). Evaluación de la infección por Babesia spp. en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la infestación en bovinos de 3 a 9 meses de edad en 9 hatos ganaderos del Magdalena medio Colombiano. *Universidad de Antioquia*, 3(2), 37–44. <http://www.udea.edu.co/hm>
- Lu, C., Song, G., Beale, K., Yan, J., Garst, E., Feng, J., Lund, E., Catteruccia, F., & Springer, T. A. (2020). Design and assessment of TRAP-CSP fusion antigens as effective malaria vaccines. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216260>
- Marcelino, I., Martinho De Almeida, A., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D. F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., & Varela Coelho, A. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines ☆. *Journal of Proteomics*, 75, 4232–4250. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.026>
- Moitra, P., Zheng, H., Anantharaman, V., Banerjee, R., Takeda, K., Kozakai, Y., Lepore, T., Krause, P. J., Aravind, L., & Kumar, S. (2015). Expression, purification, and biological

- characterization of *Babesia microti* apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, 83(10), 3890–3901. <https://doi.org/10.1128/IAI.00168-15>
- Montenegro, V. N., Paoletta, M. S., Ortiz, J. M. J., Suarez, C. E., & Wilkowsky, S. E. (2020). Identification and characterization of a *Babesia bigemina* thrombospondin-related superfamily member, TRAP-1: a novel antigen containing neutralizing epitopes involved in merozoite invasion. *Parasites & Vectors* 2020 13:1, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04469-5>
- Norimine, J., Suarez, C. E., McElwain, T. F., Florin-Christensen, M., & Brown, W. C. (2002). Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4⁺-T-lymphocyte responses in B. bovis-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infection and Immunity*, 70(4), 2039–2048. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2039-2048.2002>
- OIE. (2010). OIE World Organization for Animal Health Terrestrial Manual. Bovine Babesiosis, Chapter 2.4.2. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_BOVINE_BABESIOSIS.pdf
- OIE. (2013). *Bovine Babesiosis. Disease Cards*. 1–6. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE_BABESIOSIS.pdf
- OIE. (2019) WAHIS Interface. *World Organization for Animal Health*. https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
- Ord, R. L., Rodriguez, M., Cursino-Santos, J. R., Hong, H., Singh, M., Gray, J., & Lobo, C. A. (2016). Identification and characterization of the rhoptry neck protein 2 in *Babesia divergens* and *B. microti*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00107-16>
- Osorio, L. A. R., Salas, R. Z., Reyes, J., Mejía, J., & Baena, A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de puerto berrío, Colombia. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*.
- Polanco, D., & Ríos, L. (2016). Biological and ecological aspects of hard ticks. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463
- Rathinasamy, V., Poole, W. A., Bastos, R. G., Suarez, C. E., & Cooke, B. M. (2019). Babesiosis Vaccines: Lessons Learned, Challenges Ahead, and Future Glimpses. In

Trends in Parasitology (Vol. 35, Issue 8, pp. 622–635). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.002>

- Rittipornlertrak, A., Nambooppha, B., Simking, P., Punyapornwithaya, V., Tiwananthagorn, S., Jittapalpong, S., Chung, Y. T., & Sthitmatee, N. (2017). Low levels of genetic diversity associated with evidence of negative selection on the *Babesia bovis* apical membrane antigen 1 from parasite populations in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.009>
- Rodriguez Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. In *Parasitology Research* (Vol. 117, Issue 1, pp. 3–29). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- 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. *Experimental Parasitology*, 135(3), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.017>
- Shen, B., & Sibley, L. D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. In *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.02.007>
- Sibley, L. D., Håkansson, S., & Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*, 8(1), R12–R14. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70008-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70008-9)
- Spickler, A. (2018). *Bovine Babesiosis*. CFSPH. cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/factsheets/
- Srinivasan, P., Baldeviano, G. C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., Orr-Gonzalez, S., Zhu, D., Villasante, E., Soisson, L., Narum, D. L., Pierce, S. K., Long, C. A., Diggs, C., Duffy, P. E., Lescano, A. G., & Miller, L. H. (2017). A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *Npj Vaccines*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0015-7>

- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4). <https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>
- Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? In *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>
- Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2015). *Veterinary Parasitology* (4th ed., Vol. 1). Wiley-Blackwell.
- Terkawi, M. A., Ratthanophart, J., Salama, A., AbouLaila, M., Asada, M., Ueno, A., Alhasan, H., Guswanto, A., Masatani, T., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Xuan, X., & Igarashi, I. (2013). Molecular characterization of a new *Babesia bovis* thrombospondin-related anonymous protein (BbTRAP2). *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083305>
- The QIAexpressionist. (2005). *A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins* (Quiagen (ed.); 5th ed.). Quiagen.
- Tiono, A. B., Nébié, I., Anagnostou, N., Coulibaly, A. S., Bowyer, G., Lam, E., Bougouma, E. C., Ouedraogo, A., Yaro, J. B. B., Barry, A., Roberts, R., Rampling, T., Bliss, C., Hodgson, S., Lawrie, A., Ouedraogo, A., Imoukhuede, E. B., Ewer, K. J., Viebig, N. K., ... Sirima, S. B. (2018). First field efficacy trial of the ChAd63 MVA ME-TRAP vectored malaria vaccine candidate in 5-17 months old infants and children. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0208328>
- Tofiño Rivera, A. P., Ortega Cuadros, M., Pedraza Claros, B., Perdomo Ayola, S. C., & Moya Romero, D. C. (2018). Effectiveness of *Beauveria bassiana* (Baubassil®) on the common cattle tick *Rhipicephalus microplus* in the Department of Guajira, Colombia. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(4), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.005>
- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: Insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1204988>

- 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(1–2), 52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01118.x>
- Tyler, J. S., & Boothroyd, J. C. (2011). The C-terminus of *Toxoplasma* RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. *PLoS Pathogens*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001282>
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. In *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* (Vol. 2, Issue 1, pp. 18–31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., & Nagamune, T. (2013). Protein refolding using chemical refolding additives. In *Biotechnology Journal* (Vol. 8, Issue 1, pp. 17–31). <https://doi.org/10.1002/biot.201200025>
- Zips, S. G. (1989). An epidemiological survey of *Babesia bovis* infections in Cordoba, Colombia. *An Epidemiological Survey of Babesia Bovis Infections in Cordoba, Colombia*.



DIRECTOR

Sebastián García Castiblanco



CODIRECTORA

Catalina Avendaño Valenzuela

ANEXOS

Anexo 1: Carta aval del comité de ética



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COMITÉ DE BIOÉTICA U.D.C.A
2019**

Bogotá, D.C. Miércoles, 14 de Agosto de 2019

Doctor

MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC

U.D.C.A

Ciudad

Respetado Doctor, reciba un cordial saludo.

*En reunión de sesión del comité de bioética, realizado el pasado 9 de Agosto de 2019, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, se analizó el Programa **"Contribución al conocimiento relacionado con la interacción patógeno-hospedero de parásitos Apicomplexa que afectan la salud y producción animal"**, presentado por usted y Catalina Avendaño Valenzuela, Darwin Andrés Moreno Pérez, Diana Díaz Arévalo; una vez recibidas las correcciones sugeridas en carta de Agosto 12 de 2019, se tomó la siguiente decisión:*

*Teniendo en cuenta que en la propuesta de investigación se han acogido las definiciones en las normas nacionales e internacionales sobre bienestar animal, **este comité da su aval para el desarrollo de la propuesta.***

*Cabe aclarar que este aval cubre el Programa titulado: **"Contribución al conocimiento relacionado con la interacción patógeno-hospedero de parásitos Apicomplexa que afectan la salud y producción animal"**, el cual está conformado por tres proyectos cuyos títulos son:*

- 1. Estudio de interacciones proteína-proteína esenciales en la invasión de Babesia bovis a eritrocitos bovinos.*
- 2. Caracterización de proteínas de esporozoítos de Cryptosporidium parvum implicadas en el proceso de invasión a enterocitos.*
- 3. Evaluación del efecto sobre la invasión de Toxoplasma gondii a la célula hospedera con péptidos de proteínas involucradas en la adhesión/invasión del parásito.*

Cordialmente,


Teresa Carvajal Salcedo
Decana Facultad de Ciencias Agropecuarias

Miembros: ASCUN - IAUP - UDUAL - AUALCPI - RED UREL - OUI - ASOCIACIÓN ORION - RCI - ARIUSA

CAMPUS UNIVERSITARIO: Calle 222 No. 55 - 37 PBX: (57-1) 668 4700 FAX: (57-1) 676 1132
SEDE NORTE: Calle 72 No. 14 - 20 TELS.: 217 9345 - 345 0396
NIT.: 860.403.721-2 - www.udca.edu.co - Bogotá D.C. - Colombia