

CARACTERIZACION BIOQUIMICA PRELIMINAR DE CLONAS DE *Babesia bovis* IRRADIADAS CON COBALTO 60^a

Sergio D. Rodríguez Camarillo^b

Gerald M. Buening^c

C. Andrew Carson^c

RESUMEN

Con objeto de caracterizar parcialmente los cambios inducidos por la irradiación gamma en el crecimiento *in vitro* y bioquímicamente, dos clonas de *Babesia bovis* fueron expuestas a dosis de 81, 135 y 189 Greys (Gy) de irradiación usando una fuente de ⁶⁰Co. Se registró la cinética del crecimiento *in vitro* postirradiación. Los parásitos que recibieron las dosis más altas fueron expandidos en cultivo *in vitro*, analizándose con respecto a su movilidad en geles delgados de agarosa las siguientes enzimas metabólicas del parásito, deshidrogenasa láctica, deshidrogenasa glutámica, glucosa fosfato isomerasa y hexoquinasa. No se encontraron cambios en el patrón de migración electroforética en las primeras tres enzimas, la movilidad de hexoquinasa sin embargo, comparada con la de los parásitos no irradiados, se mostró alterada y se encontró más hacia el ánodo en ambas clonas irradiadas. La electrofóresis en dos dimensiones (isoelectroenfoque y peso molecular) en geles de poliacrilamida reveló grandes diferencias en los perfiles protéicos de los parásitos irradiados con respecto de las clonas intactas.

Téc. Pecu. Méx. Vol. 31 No. 1 (1993)

INTRODUCCION

La radiación ionizante proveniente de fuentes de emisiones gamma (γ) resulta generalmente en la ruptura del esqueleto de fosfodiéster del ácido desoxirribonucleico (ADN). De esta manera, genes enteros pueden ser inactivados debido a cambios en la secuencia o por las deleciones de bases, cuando los sistemas de reparación del ADN son insuficientes. Este mecanismo ha tenido aplicación en parasitología, así, *Babesia rodhaini* ha sido expuesta a emisiones γ para inhibir en forma total o parcial su replicación en roedores^{2,10,11}, observándose además que algunos de estos parásitos no solo fueron inocuos, sino que también indujeron resistencia sólida al desafío^{2,11}

También han sido irradiadas *Babesias* de bovinos para ser usadas como inmunógenos con resultados variables^{1,4,8,13,14,19}. *Babesia bovis* viva irradiada se usó exitosamente como inmunógeno, induciendo protección y minimizando las reacciones clínicas al desafío^{21,22}. Actualmente, poblaciones irradiadas de *B. bovis* y de *B. bigemina* están siendo usadas como inmunógenos con alto grado de seguridad^{6,20}. La caracterización de parásitos irradiados ha sido hecha sólo a nivel de la protección que éstos inducen, pero muy poco se sabe de los cambios bioquímicos inducidos por la irradiación. El objetivo de esta investigación fue el de caracterizar el crecimiento *in vitro* y parcialmente en forma bioquímica los cambios inducidos por la irradiación en poblaciones homogéneas de parásitos clonados de *Babesia bovis*.

a Recibido para su publicación el 13 de abril de 1992.

b CENID-PAVET, INIFAP, SARH. Apartado Postal 206. CIVAC. C.P. 62500 Morelos, México.

c Department of Veterinary Microbiology, University of Missouri. Columbia, Mo. 65201.

MATERIALES Y METODOS

Parásitos: Las clonas 2B-2E-5G (2B) y 2F-

3E-3E (2F), fueron derivadas de la cepa de *B. bovis* designada Kbb (originalmente aislada en México y donada por K.L. Kuttler, U.S. Department of Agriculture, A.R.S. Hemoparasite Research Unit, Washington State University, Pullman Wa.). La derivación de estas clonas así como la técnica de clonación han sido descritas previamente¹⁶.

Irradiación de Parásitos: Cultivos asíncronos de las clonas 2B (11.5% de eritrocitos parasitados [PEP] y 2F (6.2 PEP) en suspensión al 5% de paquete celular en medio de cultivo fresco se depositaron en viales de congelación (NUnc, Kamstrup, D.K.-4000, Roskild, Dinamarca) en volúmenes de 800 μ l (6.3×10^6 y 3.4×10^6 eritrocitos infectados respectivamente). La irradiación se llevó a cabo en el reactor de investigaciones de la Universidad de Missouri, exponiendo las muestras a una fuente de ^{60}Co que emitía una dosis de 0.45 Gy seg^{-1} , por 3, 5 y 7 minutos resultando en dosis total de 81, 135 y 189 Gy respectivamente. Las muestras se mantuvieron a 10 C durante el transporte y la exposición. Un cultivo transportado al reactor junto con las muestras expuestas sirvió como control no irradiado.

Cinética de crecimiento: Las muestras irradiadas se llevaron a cultivo *in vitro* sin modificación de la parasitemia inicial ya que, se consideró que existiría una reducción substancial del número inicial de parásitos, según lo publicado por Wright²². Todas las muestras, irradiadas y normales se mantuvieron a una atmósfera de 2% O_2 , 5% CO_2 y 93% N_2 bajo condiciones de clonación^{15,16}. El medio de cultivo se reemplazó cada 24 h y los subcultivos se iniciaron cada 24, 48 o 72 h. El crecimiento se verificó contando al menos 1000 eritrocitos en laminillas de sangre teñidas con colorante de Giemsa. Los valores registrados se expresaron como porcentaje de eritrocitos infectados.

Enzimas metabólicas: Considerando la posibilidad de un cambio significativo en los parásitos irradiados y basados en el período de recuperación en cultivo *in vitro*, solo aquellos parásitos expuestos a la dosis más alta se utilizaron para determinar la migra-

ción de sus enzimas. Cuando el crecimiento de estas clonas estuvo bien establecido, éstas se expandieron en cultivo y los eritrocitos infectados se concentraron de acuerdo a la técnica de centrifugación isopícnica en gradientes de densidad¹⁷ en Percoll (Pharmacia-LKB). Los eritrocitos purificados se ajustaron a una concentración de $1 \times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$ en solución salina de Puck¹². La preparación de muestras y la electrofóresis en geles delgados (1 mm) de agarosa se realizó basados en resultados publicados con anterioridad¹⁸. Se analizaron las enzimas deshidrogenasa láctica (LDH), deshidrogenasa glutámica (GDH), hexoquinasa (HK) y glucosa fosfato isomerasa (GPI).

Marcado Biosintético: Las clonas intactas e irradiadas fueron marcadas metabólicamente con $\text{L}[\text{S}^{35}]\text{-metionina}$ de la siguiente manera: a cultivos de 24 h comenzados con 2 PEP se les reemplazó el sobrenadante con medio de cultivo completo suplementado con $\text{L}[\text{S}^{35}]\text{-metionina}$ (New England Nuclear, Boston Ma.) a una concentración final de $40 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ (actividad específica de 1052.4 CimM^{-1}). Los cultivos con la marca se incubaron por 24 h en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire a 37 C. Posterior a la incubación, los cultivos se procesaron para la purificación de merozoitos y eritrocitos infectados como se ha descrito previamente¹⁸. Los merozoitos o eritrocitos infectados colectados se lavaron dos veces en solución salina de Puck retirándoles el sobrenadante.

Preparación de muestras para electrofóresis: Los merozoitos y los eritrocitos infectados se solubilizaron con dos volúmenes de solución reguladora de extracción (9.8 M urea; 2% v/v Nonidet P-40; 2% anfolitos de rango pH 3-10; 5% v/v 2-mercaptoetanol), se incubaron a 4 C por 30 min, y se centrifugaron a 25,000 xg por 30 min a la misma temperatura. La actividad precipitable por ácido tricloroacético se determinó de acuerdo a un estudio previo¹⁵. Los extractos de detergente se congelaron a -70 C hasta su uso.

Electrofóresis de dos dimensiones: Esta se llevó a cabo de acuerdo a O'farrel⁹. Las

proteínas se separaron en la primera dimensión usando enfoque isoeléctrico en un rango de pH de 3-10 en geles de poliacrilamida de 4% en tubos de vidrio de 13 mm x 2.5 mm diámetro interno; la segunda dimensión se efectuó en geles de poliacrilamida discontinuos, utilizando geles de resolución de 10% de acuerdo a la técnica de Laemli⁷. Como marcadores de peso molecular se usaron: lisozima, 14.3 kilodalton (Kda); beta-lactoglobulina, 18.4 Kda; alfa quimotripsinógeno, 25.7 Kda; ovalbumina, 43 Kda; albúmina sérica bovina, 69 Kda; fosforilasa B, 97 Kda; y miosina, cadena pesada 200 Kda (Sigma Chemical Co. St. Luis, Mo.) Los geles se procesaron para fluorografía de acuerdo a Bonner y Laskey³, luego se secaron y se expusieron a película autorradiográfica (Kodak) XOMAR R10, en cartuchos a prueba de luz a -80 C por 5 a 7 días según fuera necesario.

RESULTADOS

Cinética de crecimiento: La cinética de crecimiento de clonas pos-irradiación se ilustra en las figuras 1 y 2, se puede observar que existe una relación dosis-efecto en los parásitos irradiados; la exposición de ambas clonas a 189 Gy resultó en un claro decremento en la tasa de crecimiento a las 24 h mientras que exposición a 135 y 81 greys indujo decremento en la clona 2B, pero observó crecimiento durante el mismo período en la clona 2F. La adición de eritrocitos frescos al subcultivo restauró el crecimiento de los parásitos irradiados, a excepción de los expuestos a 189 Gy, los cuales no presentaron un crecimiento substancial sino hasta el segundo o tercer subcultivo. El patrón de crecimiento de los parásitos control fluctuó debido a un sobrecrecimiento de 72 h, sin subcultivo y la baja tensión de oxígeno. Los parásitos irradiados mostraron un patrón de crecimiento normal después de siete u ocho días *in vitro*. La observación al microscopio óptico de frotis de los cultivos reveló, que la morfología de los parásitos irradiados se vio severamente afectada en los parásitos expuestos a 135 y 189 Gy,

apareciendo como anillos irregulares con variaciones en tamaño y en la intensidad de la tinción; estas formas irregulares se observaron a lo largo de los primeros 8 días postirradiación y desaparecieron gradualmente, desafortunadamente, no se pudieron conservar frotis de estos cultivos y no se presentan fotografías de estos.

Análisis de enzimas metabólicas: El patrón electroforético de migración de las enzimas LDH, GDH y GPI en geles de agarosa fue similar tanto en los parásitos irradiados como en los controles normales. La migración de HK en contraste, fue diferente ya que la hexoquinasa derivada de las clonas irradiadas se encontró más hacia el ánodo (figura 3); este patrón fue observado en ambas clonas irradiadas.

Electroforesis de dos dimensiones: La distribución de proteínas en la primera dimensión fue a lo largo de un gradiente de pH de 5.3 a 7.5 y apareció lineal de pH 5.4 a 7.3. El análisis autorradiográfico de los geles de dos dimensiones de material soluble, derivado de parásitos biosintéticamente marcados, revelaron patrones muy complejos, mostrando cientos de proteínas en ellos. Las similitudes se observaron fácilmente al comparar los perfiles de los parásitos irradiados con los de sus controles normales. En el caso de la clona 2F hubo pocas diferencias (figura 4a y 4b) como la desaparición de la proteína g1' (~190 Kd) y la aparición de proteínas variables g5', de 96 Kd, y g6' de 95.5 Kd, exactamente encima de sus contrapartes de g5 y g6 (ambas de 94 Kd). La proteína h8 de 52 Kd que aparecía como un componente menor en la clona 2F, se mostró con mucha mayor intensidad en el parásito irradiado. Otras proteínas que desaparecieron incluyen las C25 (~33KDa), b1, b2 y b10 (~66, 62 y 37 KDa, respectivamente). En el caso de la clona 2B irradiada (figura 5a y 5b), se presenta la aparición de proteínas nuevas como la i1" ligeramente más ácida que i1' (~155 KDa), desaparición de g1 (195 KDa), la aparición de la variante de menor peso de g2 (g2', ~165 KDa), la aparente duplicidad de variantes ligeramente más pesadas de las proteínas i15, i16 i18

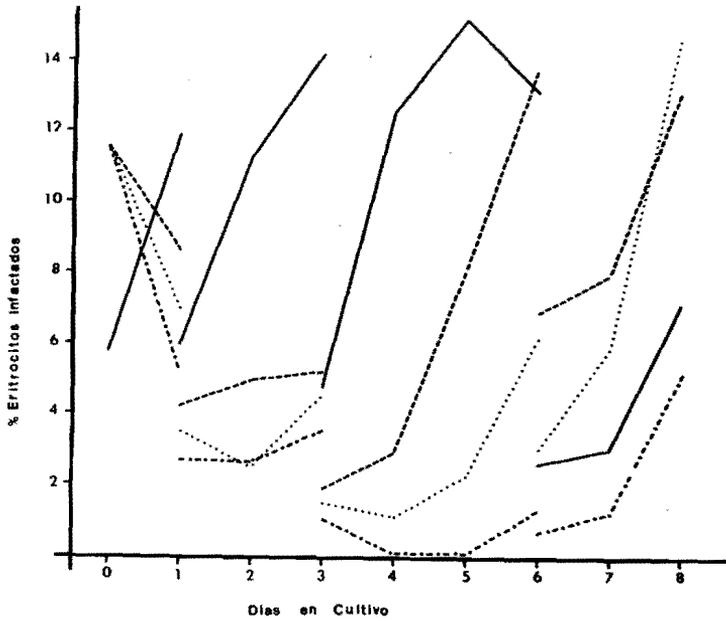


Figura 1. Crecimiento de la clona 2B-2E-5G de *Babesia bovis* post irradiación. Cultivos expuestos a 0 Gy (—), 81 Gy (---), 135 Gy (.....) o 189 Gy (-.-.-) subcultivos fueron iniciados en los días 1, 3 y 6.

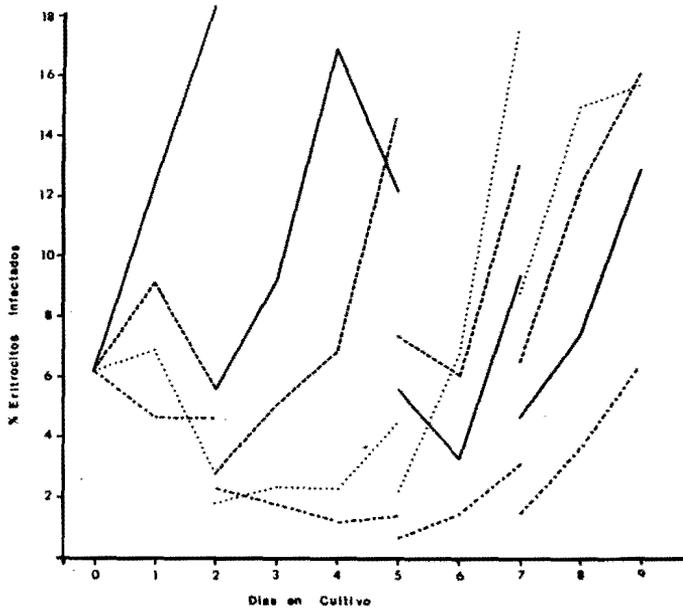


Figura 2. Crecimiento de la clona 2F-3E-3E de *Babesia bovis* post irradiación. Cultivos expuestos a 0 Gy (—), 81 Gy (---), 135 Gy (.....) o 189 Gy (-.-.-) subcultivos fueron iniciados en los días 2,5 y 7.

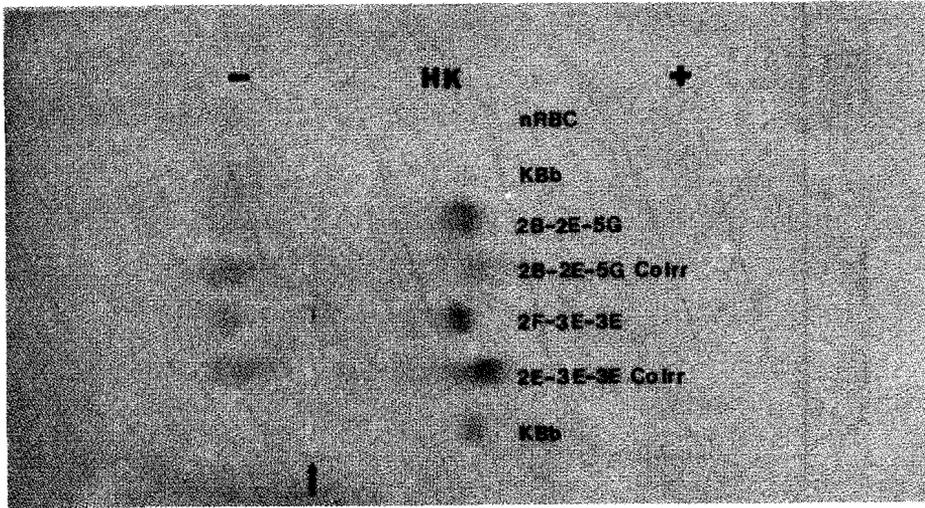


Figura 3. Patrón electroforético de la enzima hexoquinasa en gel de agarosa en eritrocitos normales (nRBC); merozoitos purificados de la cepa original (KBb mz); eritrocitos infectados con la clona 2B-2E-5G; la clona irradiada 2B-2E-5G (Co Irr); la clona 2F-3E-3E y la clona irradiada 2F-3E-3E Co Irr, la flecha indica el origen.

(~34, 32.5, 29 Kda) y muchas otras que, para propósitos prácticos simplemente se señalan con pequeñas flechas. También se observa la desaparición o la disminución en intensidad de un número de proteínas como i21, i22, i23, i24, i25, i26 (25, 24.8, 24.6, 24.5, 21.8 y 18.4 KDa).

DISCUSION

La irradiación por emisiones γ afectó seriamente el crecimiento *in vitro* de los parásitos expuestos; los efectos de la radiación se observaron primeramente en el tiempo requerido para la regularización del crecimiento de los parásitos irradiados, que se mostró como una relación dosis-efecto, es decir a mayor dosis de irradiación mayor tiempo de recuperación del patrón normal de crecimiento. Estos resultados son similares a los reportados para *B. bovis*¹ y *B. rodhaini*⁸, en los que se observó una prolongación del tiempo de incubación de los parásitos irradiados en animales suscepti-

bles, así como cuando se usó la incorporación de ³H-Timidina¹² y se determinó el porcentaje de incorporación de la marca de acuerdo a un control no irradiado; mostrando que a mayor irradiación menor incorporación y por lo tanto menor actividad metabólica de los parásitos expuestos.

La infectividad en el hospedero, o la incorporación de ³H-Timidina *in vitro* son métodos que se han usado para verificar la sobrevivencia de los parásitos; de éstos dos, el primero es de confiar, pero costoso, prolongado e inexacto con respecto a la cuantificación de los parásitos sobrevivientes; mientras que el segundo se lleva a cabo en cultivos de 48 h teniendo el inconveniente de utilizar el cultivo mismo para la determinación de la incorporación del isótopo. El cultivo *in vitro* continuo permite una revisión de la morfología, la evaluación del decremento o incremento en los números de parásitos, y puede ser acoplado a la incorporación de ³H-Timidina; esta última no se consideró necesaria en el presente trabajo

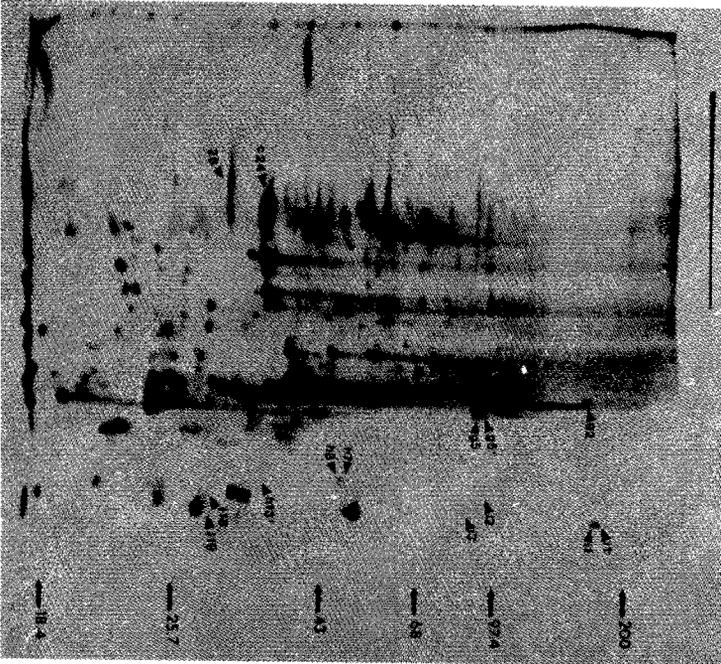
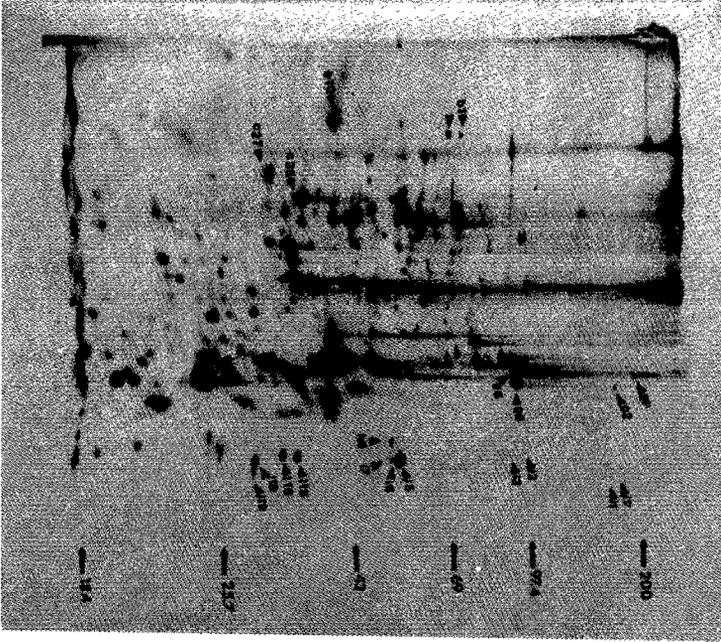


Figura 4. Autorradiografías de los patrones de migración electroforética de doble dimensión de proteínas marcadas metabólicamente con ^{35}S -metionina en gels de poliacrilamida de las clonas (A) 2F y (B) 2FCoi. Los números del lado derecho junto con las flechas indican los marcadores de peso molecular (descritos en el texto). El ánodo del enfoque isoelectrico también se encuentra del lado derecho.

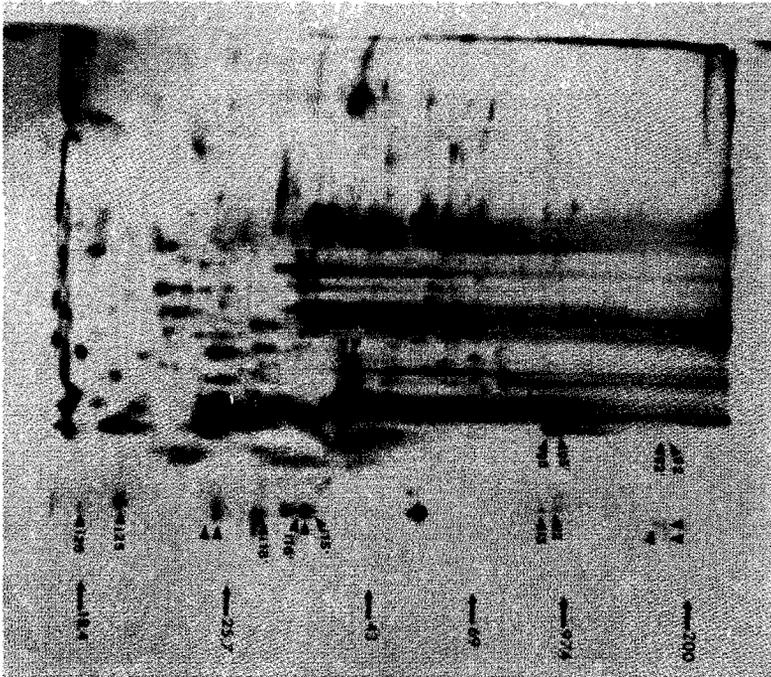
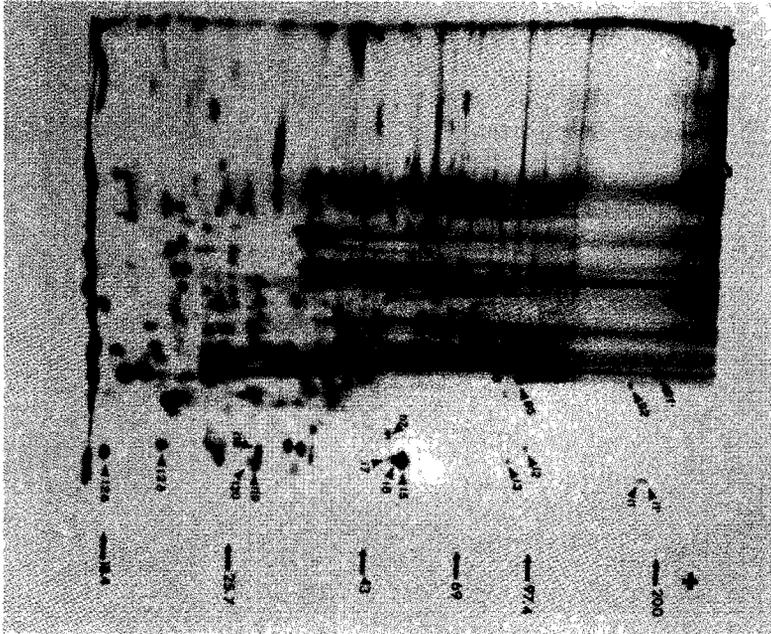


Figura 5. Autorradiografías de los patrones de migración electroforética de doble dimensión de proteínas marcadas metabólicamente con ³⁵S-metionina en gels de poliacrilamida de las clonas (A) 2B y (B) 2BCoi. Las indicaciones son como las descritas para la leyenda en la figura 4D.

ya que, la observación directa de los parásitos al microscopio óptico fue indicación confiable del estado de ellos.

La irradiación y produjo cambios moleculares que se reflejaron en la variación de perfiles electroforéticos. La migración de Hk en geles de agarosa se alteró y apareció más anódica en los parásitos irradiados que en los controles normales; este patrón alterado fue el mismo para las dos clonas. Este hallazgo aunque inesperado podría indicar que la alteración ocurrió al mismo nivel en el ADN de las clonas irradiadas sin alterar la actividad de la enzima. Dado que parásitos irradiados están siendo usados actualmente como inmunógenos vivos^{6,20}, la diferencia de la migración de HK podría usarse como marcador en la determinación del tipo de infección (natural o vacunal) que sufra un animal o un hato.

Se observaron muchos más cambios en los perfiles electroforéticos de doble dimensión de las clonas irradiadas, comparadas con las clonas normales; el número de diferencias observadas en el perfil de la clona 2BCoi fue inesperado, ya que fue notablemente mayor que el presentado por la clona 2FCoi. La razón para la aparición de proteínas de mayor o menor peso molecular pero de semejante punto isoeléctrico no se conoce, como tampoco por qué aparentemente la irradiación afectó más a una población (clona 2BCoi) que a la otra.

En el presente trabajo también se intentó la subclonación de los parásitos irradiados para determinar si estos permanecieron como poblaciones homogéneas, pero desafortunadamente esto no se consiguió, de tal manera que, no se pudo corroborar si las poblaciones irradiadas están compuestas de una o más subpoblaciones; todo esto sin embargo, garantiza continuar con la caracterización de las clonas irradiadas a nivel molecular. Futuros trabajos deberán incluir también la caracterización biológica e inmunológica de estas clonas.

SUMMARY

In order to characterize the changes induced by exposure to gamma irradiation, two *Babesia bovis* clones were exposed to 81, 135 and 189 Greys (Gy), doses

of irradiation from a ⁶⁰Co source. *In vitro* growth was monitored and the kinetics of recovery were recorded. Parasites receiving the highest dose of irradiation were later expanded in *in vitro*, and their metabolic enzyme profile analyzed in agarose gel electrophoresis. Glutamate dehydrogenase, lactic dehydrogenase and glucose phosphate isomerase mobilities were not affected. In contrast, hexokinase was ultimately located closer to the anode in irradiated clones. Two-dimensional gel electrophoresis was also used to compare molecular changes induced by irradiation. Many more changes were observed in the profiles of the irradiated clones when compared to their non irradiated counterparts.

LITERATURA CITADA

1. BISHOP, J.P. and ADAMS, L.G. 1974. *Babesia bigemina*: Immune responses of cattle inoculated with irradiated parasites. *Exp. Parasitol.* 35:35.
2. BISHOP, J.P. and KUTTLER, K.L. 1974. Infectivity and immunogenicity of irradiated *Babesia rodhaini*. *J. Protozool.* 21: 758.
3. BONNER, W.M. and LASKEY, R.A. 1974. A film detection method for Tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46:83.
4. BROKLESBY, D.W. PURNELL, R.E. and SELLWOOD, S.A. 1972. The effect of irradiation on intraerythrocytic *Babesia major*. *Br. Vet. J.* 128: iii-v.
5. GIL, L.A. HIGUERA, B. y ORREGO, J. 1986. Vacuna experimental contra *Babesia bovis* y *bigemina*, producida con atenuación de los parásitos por irradiación. *Rev. Med. Zoot.* (Colombia) 39:49.
6. IRVING, A.D. YOUNG, E.R. and ADAMS, P.J.V. 1979. The effects of irradiation on *Babesia* maintained *in vitro*. *Res. Vet. Sci.* 27:200.
7. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227:680.
8. MAHONEY, D.F. WRIGHT, I.G. and KETTERER, P.J. 1973. *Babesia argentina*: The infectivity and immunogenicity of irradiated blood parasites for splenectomized calves. *Int. J. Parasitol.* 3:209.
9. O'FARRELL P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007.
10. PHILLIPS, R.S. 1970. Resistance of mice and rats to challenge by *Babesia rodhaini* after inoculation with

irradiated cells infected with *B. rodhaini*. *Nature* (London) 227:1255.

11. PHILLIPS, R.S. 1971. Immunity of rats and mice following injection with ⁶⁰Co irradiated *Babesia rodhaini* infected cells. *Parasitology*. 62:221.

12. PUCK, T.T. CIECIURA, S.J. ROBINSON, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells* III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 108:945.

13. PURNELL, R.E. BROKLESBY, D.W. and ATARK, A.J. 1978. Protection of cattle against *Babesia major* by the inoculation of irradiated piroplasms. *Res. Vet. Sci.* 25:288.

14. PURNELL, R.E. LEWIS, D. and BROKLESBY, D.W. 1979. *Babesia major*: protection of intact calves against the homologous challenge by the injection of irradiated parasites. *Int. J. Parasitol.* 9:69.

15. RODRIGUEZ, S.D. 1985. *Babesia bovis* clones: Biochemical characterization. PhD. thesis, University of Missouri.

16. RODRIGUEZ, S.D. BUENING, G.M. GREEN, T.J. and CARSON, C.A. 1983. Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Inf. Immun.* 42:15.

17. RODRIGUEZ S.D. BUENING, G.M. VEGA, C.A. and CARSON, C.A., 1986. *Babesia bovis*: Purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 61:236.

18. RODRIGUEZ, S.D. BUENING, G.M. VEGA, C.A. and CARSON, C.A. 1986. Enzymatic characterization of *Babesia bovis*. *J. Protozool.* 33:507.

19. TAYLOR, S.M. KENNY, J. and MALLON, T. 1983. The effect of multiple rapid passage on strains of *Babesia divergens*. A comparison of the clinical effects on juvenile and adult cattle of passaged and irradiated parasites. *J. Comp. Path.* 93:391.

20. WEILGAMA, D.J. JORGENSEN, W.K. DALGLIESH, R.J. NAVARATNE, M. and WEERASINGHE C. 1989. Comparison between Sri Lankan and Australian strains of *Babesia bovis* in the vaccination of imported cattle in Sri Lanka. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 21:141.

21. WRIGHT, I.G. GOODGER, B.V. and MAHONEY, D.F. 1980. The irradiation of *Babesia bovis*. *Z. Parasitenkd.* 63:47.

22. WRIGHT, I.G. MAHONEY, D.F. MIRRE, G.B. GOODGER, B.V. and KERR, J.D. 1982. The irradiation of *Babesia bovis*. II. The immunogenicity of irradiated parasites for intact cattle and splenectomized calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3:591.