

# BABESIOSIS BOVINA: CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LA RESPUESTA INMUNE

DAVID GARCÍA TAPIA

JESUS ANTONIO ÁLVAREZ MARTÍNEZ

JULIO VICENTE FIGUEROA MILLAN

CARLOS AGUSTÍN VEGA y MURGUÍA

I. Introducción .....	105
II. Inmunología de la babesiosis bovina .....	106
III. Discusión y conclusiones .....	115
Referencias .....	116

## **I. Introducción**

La población de ganado bovino en México asciende a cerca de 25 millones de cabezas (1), de las cuales más del 50% se encuentran en el trópico mexicano. La importancia de la

producción bovina es vital, debido a que es una fuente rentable de proteína animal de alta calidad; lo cual, exige encontrar las condiciones óptimas de producción para revertir el déficit que México tiene con respecto a importación de leche y carne de origen bovino.

El ganado debe ser protegido contra enfermedades infecciosas para lograr su óptimo rendimiento. El desarrollo de vacunas efectivas y eficientes puede ser una de las estrategias más viables. La presencia de babesiosis en el trópico mexicano, suele ser un obstáculo para mejorar la producción de carne y leche.

## **II. Inmunología de la babesiosis bovina**

Durante las últimas dos décadas ha existido un gran progreso en el conocimiento del sistema inmune de los bovinos y su funcionamiento. Se sabe que los bovinos difieren del humano y de otros animales de laboratorio en la forma de transferencia de inmunidad materna, en el contenido y en la composición de inmunoglobulinas en calostro y leche. Por su estructura placentaria, no hay paso de las inmunoglobulinas. También existen diferencias en la distribución de leucocitos en sangre periférica del neonato, con respecto a otras especies animales incluyendo al hombre (2).

A partir de 1985 se ha puesto especial atención en la identificación y caracterización funcional de las poblaciones de linfocitos en bovinos; y especialmente sobre las diferentes poblaciones de células T y sus receptores. También se han realizado estudios sobre la organización del genoma; el polimorfismo y el papel inmunológico del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en linfocitos (BoLA).

La investigación relativa a citocinas, que son proteínas producidas por células propias del sistema inmune, que afectan la función de otras células asociadas también a la respuesta inmune, se inició en 1990, secuenciándose genes y proteínas de algunas de ellas. Así, se desarrollaron métodos y reactivos específicos para su identificación, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), anticuerpos monoclonales, bioensayos, etc. Los avances han logrado incluso la producción de citocinas recombinantes para uso terapéutico e inmunomodulador, en el tratamiento de enfermedades y en la aplicación simultánea con vacunas (2).

Sin embargo, a pesar de los avances existentes se desconocen aún algunos aspectos de la respuesta inmune en bovinos, los cuales ya han sido explorados en humanos o en otras especies animales. En otras especies se ha estudiado por ejemplo a una amplia familia de citocinas quimotácticas llamadas quimocinas, que actúan colaborando en la regulación de diversos procesos biológicos como la migración de leucocitos, angiogénesis, hematopoiesis y organogénesis. Se cree que tanto las quimocinas como sus receptores podrían tener una utilidad terapéutica, en procesos inflamatorios y/o en enfermedades infecciosas (3). De modo que, sería indispensable identificar el papel que desempeñan las quimocinas en las enfermedades infecciosas de los bovinos.

La babesiosis bovina es un complejo infeccioso formado por dos enfermedades producidas por microorganismos del género *Babesia*. Una es la enfermedad causada por *Babesia bovis* que se caracteriza por producir una patología hematológica y neurológica, con signos nerviosos que la hacen parecerse a la malaria cerebral en humanos; y esta forma es la más grave de la babesiosis bovina. La otra forma es la producida por *B. bigemina*

que causa una severa patología hemolítica. En condiciones naturales, ambas enfermedades se presentan como co-infección con alta frecuencia, causando una condición patológica con severo daño e incluso la muerte de los animales, particularmente en ganado susceptible a los parásitos.

Debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad, el control de la babesiosis ha utilizado la exposición a parásitos atenuados, para promover una respuesta inmune. En México el INIFAP ha desarrollado una vacuna mixta atenuada contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, utilizando una clona irradiada de *B. bovis* (4) y una cepa de *B. bigemina* (5) que ha sido atenuada por un número indefinido de pases en cultivo *in vitro*. Esta vacuna ha demostrado inducir una respuesta inmune que protege a más del 80% de animales que han sido vacunados (6, 7, 8,9, 10).

La existencia de estas vacunas facilitan el poder inducir protección y evaluar o caracterizar la respuesta inmune desarrollada por animales protegidos para diferenciarla de la respuesta desarrollada por animales no protegidos. La urgencia actual es lograr una adecuada selección de antígenos inmunoprotectores, que podrían ser utilizados en el diseño de vacunas de nueva generación como las subunitarias, o de ADN contra *B. bovis* y *B. bigemina*. Este tipo de vacunas teóricamente ofrece muchas ventajas. Sin embargo, aún existe un gran desconocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune en infecciones primarias y secundarias y la capacidad de los parásitos para evadir la respuesta inmune del hospedador bovino (46).

Se ha observado que en infecciones por hemoprotozoarios se ven involucradas tanto inmunidad innata como adquirida; observándose, por ejemplo en ratones genéticamente

modificados o "*Knockout*" que la inmunidad contra malaria es independiente de células T, pero que requiere de la activación de macrófagos, induciendo fagocitosis y la liberación de radicales libres de oxígeno, de nitrógeno y también la activación de células asesinas "Natural Killer" (NK) (11).

La inmunidad adquirida resultante de la inmunización o de la infección constante es dependiente de células T cooperadoras (Th) y de anticuerpos (Abs). Las células Th realizan un doble papel produciendo citocinas para que ayuden a la producción de diferentes isotipos o subclases de anticuerpos de alta afinidad, para promover la activación de macrófagos (12).

La óptima inmunidad protectora contra infecciones por *Babesia spp.*, requiere tanto anticuerpos fijadores de complemento como anticuerpos opsonizantes, así como de la activación de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  (12, 13). Experimentos en los que se transfirió suero inmune *anti-Babesia bovis* o anticuerpos IgG1 e IgG2 demostraron la importancia en términos de actividad inmunoprotectora de los anticuerpos, debido a que fueron capaces de proteger contra desafíos homólogos con *B. bovis* (14).

Aunque la transferencia de anticuerpos *in vivo* protege contra babesiosis bovina, los mismos anticuerpos no tienen efecto contra la invasión de *Babesia* a eritrocitos en cultivo *in vitro*, sugiriendo que los anticuerpos funcionan como opsoninas para los macrófagos activados, promoviendo la fagocitosis de los parásitos (14). A pesar de que existen reportes referentes a la capacidad protectora *in vivo* de los anticuerpos contra la babesiosis; se ha probado que la presencia de niveles elevados de anticuerpos, no necesariamente significa de que todos los anticuerpos producidos sean protectores (15).

En la inmunidad contra la *Babesia* se ha sugerido que el bazo es fundamental en el control de esta infección, gracias a la actividad fagocítica y de producción de anticuerpos que ahí se realiza (15). Bovinos esplenectomizados sufren una reducción en su capacidad para eliminar a los eritrocitos parasitados, mientras que, bovinos intactos infectados por *Babesia bovis* presentan mayores concentraciones de eritrocitos parasitados (14).

Además del papel de los anticuerpos en la respuesta inmune contra las infecciones por *Babesia*, es esencial la actividad de las células en esta respuesta. Se ha destacado la función de los macrófagos, como células fagocíticas, eliminando tanto a parásitos como a eritrocitos parasitados (15). Además de ser células presentadoras de antígeno, colaboran en la blastogénesis de linfocitos específicos contra antígenos de *Babesia* (16), y actúan como células productoras y secretoras de citocinas y reactivos intermediarios del oxígeno y nitrógeno (14, 17).

Los estudios *in vitro* de la cinética de las actividades fagocítica y oxidativa de monocitos y neutrófilos de bovinos infectados con *Babesia bovis*, han mostrado que los monocitos derivados de sangre periférica tienen una gran actividad oxidativa y una capacidad fagocítica suprimida durante una infección primaria. En contraste, los neutrófilos exhiben una capacidad fagocítica incrementada pero, una reducida capacidad oxidativa en infección primaria. Estos signos coinciden con la mayor carga parasitaria, lo que ha sugerido que los monocitos y neutrófilos circulantes son mediadores activos de la respuesta inmune innata a infección primaria por *Babesia bovis* (42).

Los linfocitos T en sus diferentes subpoblaciones son también parte importante de la respuesta inmune *anti-Babesia*. Se ha

demostrado mediante inmunizaciones realizadas con esporozoitos irradiados, que las células T citotóxicas o células T CD4, CD8 +, confieren inmunidad protectora contra malaria en ratones y humanos. Las células T CD8 + reconocen fragmentos de antígenos derivados del parásito, expresados en conjunto con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I) clase I sobre las células infectadas. La especificidad del reconocimiento de las células T CD8 + está influenciada por las moléculas del MHC clase I, identificando a este fenómeno como restricción por moléculas del MHC. Este evento de reconocimiento induce la actividad celular efectora que elimina a las células infectadas o impide el crecimiento del patógeno que está dentro de ellas (18). Los eritrocitos a diferencia de los hepatocitos, no presentan moléculas del MHC clase I, por lo que el papel de las células CD8 + en la protección, solo es relevante en el estadio pre-eritrocítico. Este estadio o fase pre-eritrocítica no existe en la infección por *Babesia*. Pero se ha demostrado que las citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ , linfotóxina o FNT secretadas por estas células, son importantes en la resolución de enfermedades hemoparasitarias, incluyéndose a la babesiosis (19, 20, 21). Sin embargo, falta mucho por explicar sobre la función de las células CD8 + en la respuesta inmune contra infecciones por *Babesia spp.* (18,22).

Una pequeña porción de células T expresan el TcR $\beta$ , el cual reconoce antígenos en una forma restringida o no, por moléculas del MHC; sin embargo, la actividad funcional de este tipo de células se mantiene prácticamente desconocido (12). Existen algunas evidencias de su funcionalidad en la respuesta inmune a algunas enfermedades infecciosas como las producidas por micobacterias o por leishmanias (47). En la malaria, se ha estudiado el papel de las células T $\beta$ , demostrándose que cuando se resuelve la infección, existen grandes cantidades de células

gama delta. Por lo que se considera que ésta subpoblación de células T, puede coadyuvar en la eliminación de los estadios sanguíneos de malaria (23). También se ha sugerido que las células T $\delta$  se asocian a la eliminación del parásito (24). Como una función citolítica y/o inflamatoria de las células T $\delta$  en la respuesta a malaria por *P. falciparum* en individuos no expuestos, cuyas células se confrontaron *in vitro* con el parásito (23,25). También se ha demostrado que las células T $\delta$  responden mejor a parásitos vivos que muertos, por lo que se sugiere que *Plasmodium falciparum* produce sustancias que estimulan a las células en cuestión (26). A pesar de estos datos, existen realmente pocos o nulos datos acerca de la función de las células T $\delta$  en infecciones bovinas por *Babesia*. Se sabe que la población de estas células es mayor en becerros, alcanzando hasta un 70% del total de células mononucleares circulantes, a diferencia de lo que alcanzan en animales adultos con apenas un 10% (2). La elevada cantidad de células gamma/delta, ha sugerido una importante contribución contra infecciones por hemoparásitos en bovinos, lo que podría asociarse a la condición refractaria de los terneros a la babesiosis bovina.

La transferencia de células T CD4 + ha probado que puede conferir inmunidad protectora contra estadios asexuales sanguíneos de malaria murina. Algunos datos demuestran el papel de las células T cooperadoras (Th) en la inmunidad protectora contra malaria y babesiosis. Se han observado mayores respuestas proliferativas en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de bovinos protegidos contra *B. bovis* que en células procedentes de animales que nunca han sido expuestos a *Babesia* (16, 27). En infecciones agudas por *Plasmodium chabaudi* se ha observado *in vivo* un tipo de respuesta Th-1 en la fase aguda de la infección y posteriormente un tipo Th-2 en la fase de control de la parasitemia, haciendo

evidente la importancia de las células CD4 en la respuesta inmune contra hemoparásitos (28).

La estimulación *in vitro* de las células T de memoria, procedentes de bovinos inmunizados con extracto crudo de *Babesia* o con proteína recombinante, asociada a roptría-1 (RAP-1); han inducido preferentemente un tipo de respuesta Th-1 caracterizada por niveles mayores de IFN- $\gamma$  que de interleucina4 (IL-4) (29,30). Este tipo de respuesta (Th-1) fue detectada en células T procedentes de ganglio linfático y de sangre periférica de bovinos inmunizados con proteína RAP-1 nativa de *B. bigemina* en adyuvante de RIBI<sup>®</sup> y fue asociada con protección contra un desafío homólogo de cepa (14,30).

Clonas de células T CD4<sup>+</sup> específicas contra RAP-I de *B. bigemina* que expresaron altos niveles de IFN- $\gamma$  y menores niveles de IL-4, indujeron la secreción de IgG 1 e IgG2 por células B autólogas, después de una interacción de células B y T (13). Sobrenadantes procedentes de cultivos de células T cooperadoras específicas a *B. bovis* en presencia de IFN- $\gamma$  y FNT estimularon la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos (17). Estos dos últimos estudios demuestran el efecto de las células T CD4<sup>+</sup> sobre la producción de IgG 1 e IgG2 y sobre la función efectora de los macrófagos.

Por otra parte, se ha evidenciado que los anticuerpos producidos en animales en la fase temprana de la infección con *Babesia bovis*, no poseen los atributos característicos de neutralización y opsonización (43).

Siempre que se han estudiado células T CD4<sup>+</sup>, estas han producido Interferón gamma, de tal manera que estas células han sido clasificada como Th-1, con poca o nula producción de

IL-4, 0 C0m0 Th-O (29). En distintos trabajos se ha demostrado la función clave del interferón gamma, en la inmunidad c0ntra infecciones p0r hem0parásit0s (22, 31, 32, 33).

La IL-10 se ha demostrado que posee actividades inmunorregulatorias; mediante el ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-peR) *in vitro*, notándose que la expresión a nivel de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de sintetasa de óxido nitr0 (iN OS) fue disminuída; similarmente ocurri0 con las citocinas involucradas en la seńal de iniciaci0n de la transducci0n de óxido nitr0so, IFN y TNF. Tambi0n se demostr0 la importancia de iNOS en la respuesta exitosa contra la infecci0n con *Babesia bovis*, denotando la elevada y persistente expresi0n de IL-10 a nivel de mRNA, cuando la respuesta inmune era no satisfactoria (43).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los macr0fagos activados por *B. bovis* se asocian al incremento en la expresi0n de citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF-a). Los que se han considerado importantes para estimular la inmunidad innata y adquirida contra protozoarios pat0genos. En estos estudios se mostr0 tambi0n que una fracci0n lipídica de eritrocitos infectados con *B. bovis* es capaz de estimular la expresi0n de sintetasa de óxido nitr0so (iNOS) y la producci0n de óxido nitr0so (NO). En base a este tipo de observaciones se cree que *B. bovis* induce una respuesta inmune que permite controlar la replicaci0n de los parásitos, lo cual puede resultar en la sobrevivencia del hospedador bovino y la persistencia del parásito (41).

En becerros infectados con *Babesia bovis*, durante la fase temprana, se ha observado una breve actividad de óxido nitr0so debido a una inducci0n tambi0n breve de iNOS en el bazo de los

becerros; esto no ocurre en el bazo de animales adultos. Se ha determinado que el mensaje de iNOS es seguido de una temprana inducción de IL-12 y de IFN -  $\gamma$ . Estas observaciones han sugerido que la influencia de citocinas sobre la actividad celular, es de tipo-I (Th-1) y que en el control inicial de la infección se requiere de un excelente mecanismo de regulación para prevenir procesos patológicos asociados a la sobreproducción de óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias (45).

### **III. Discusión y conclusiones**

La inmunidad en babesiosis bovina sugiere que la respuesta inmune protectora, involucra tanto a una respuesta de células T cooperadoras tipo Th-1 como la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento, así como también a la función efectora de los macrófagos. El control de la infección aguda y el mantenimiento de la inmunidad clínica parecen determinadas por la interrelación de las respuestas de inmunidad innata y adquirida (44).

La mayoría de las observaciones citadas anteriormente han sido realizadas en condiciones *in vitro* y regularmente en células procedentes de bovinos machos. Son escasos ó inexistentes las observaciones en diferentes estados reproductivos de lo que ocurre *in vivo* contra babesiosis bovina. Se desconoce qué sucede en hembras gestantes o en bovinos inmunocomprometidos.

El conocimiento de los mecanismos utilizados por los parásitos para sobrevivir dentro del hospedador bovino de la forma aguda a la crónica, que involucran la respuesta inmune adquirida e innata, deben ser bien definidos para aplicarlos en el diseño de vacunas efectivas contra la babesiosis bovina.

## Referencias

1. **Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI):** Población de Ganado Bovino en México en: Anuario estadístico INEGI 1997, Aguascalientes, México, 1997.
2. **Pastoret, P.P.:** Immunology of Cattle in: Handbook of Vertebrate Immunology. *Academic Press*. pp. 438-484,1998.
3. **Locati, M. and Murphy, P.M.:** Chemokines and Chemokine Receptors: Biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu. Rev. Med.* 50: 425-40,1999.
4. **Rodríguez, S.D.:** Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. Ph. D. Dissertation. *University of MissouriColumbia*, U.S.A, 1985.
5. **Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. and Carson, C.A.:** *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am.J. Vet. Res.* 46: 416-420, 1985.
6. **Cantó, G.J., Figueroa, J. V., Álvarez, J .A., Ramos, J .A. y Vega C.A.:** Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pec. en Méx.* 34 (3): 127-135, 1996.
7. **García, T.D., Rojas, R.E., Estarada, A.A., Ramos, A.J.A., Figueroa, J.V., Canto, G.J. y Vega, C.A.:** Evaluación de un inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en vacas gestantes. Inocuidad y desafío controlado. XX Congreso Nal. de Buiatría. 14,15 y 16 de Agosto. Acapulco, Gro. Pp: 121-125, 1996.

8. **Figuroa, J. V., Ramos, J .A., Álvarez, J .A., Canto, G.J. y Vega, C.A.:** Desarrollo de una vacuna atenuada contra la babesiosis bovina. *Proceedings XIV Panamerican congress on Veterinary Sciences*. Acapulco, Mexico. Oct. 9-15. pp. 389-391, 1994.
9. **Hernández, R.:** Estudio sobre el efecto de cuatro aislamientos de *Babesia bigemina* en bovinos y garrapatas. M. C. *Tesis*. UAEM, 1990.
10. **Ramos, J.A., Figuroa, J.V., Rojas, R.E., Santiago, V.c., Canto, G.J. y Vega C.A.:** Desafío de campo de bovinos inoculados con un inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Resúmenes de las memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Cuernavaca, Mor. Dic. pp 61, 1996.
11. **Fell, A.H. and Smith, N.C.:** Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol. Today*. 14: 364-369,1998.
12. **Taylor-Robinson, A.W.:** Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol. Today*. 11: 334-342, 1995.
13. **Brown, W.C., McElwain, T., Palmer, G.H., Chatler, S.E. and Estes, M.:** Bovine CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G 1 (IgG 1) and IgG2 synthesis. *Infect. Immun.* 67 (1): 155-164, 1999.
14. **Brown, W.C. and Palmer, G.H.:** Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today*. 15 (7): 275-281,1999.

15. **Jacobson, R.H., Parrodi, F., Wright, I.G., Fitzgerald, C.J. and Dobsin C.:** *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens. *Parasitol. Res.* 79: 221-226, 1993.
16. **Brown, C.W., Logan, K.S., Wagner, G.G. and Tetzlaff, L.:** Cell mediated immune response to *Babesia bovis* merozoite antigens in carrel following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect. Immun.* 59 (7): 2418-2426, 1991.
17. **Stich, R. W., Shoda, L.K.M., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T. and Brown, W.:** Stimulation of Nitric ~Oxide Production in Macrophages by *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 66 (9): 4130-4136, 1998.
18. **Aidoo, M. and Udhayakumar, V.:** Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections; Implication for malaria vaccine development. *Parasitol. Today.* 16 (2): 50-56,2000.
19. **Cavacini, L.A., Parke, L.A. and Weidanz, W.P.:** Resolution of acute malarial infections by Tcell dependent non-antibody-mediated mechanisms of immunity. *Infect. Immun.* 58: 2946-2959, 1990.
20. **Schofield, L.A., Vilaquiran, J., Ferreira, R., Schellekens, H., Nussenzweig, T.S. and Nussenzweig, V.:**  $\gamma$ -Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature (London)* 330: 664-666, 1987.
21. **Stevenson, M.M. and Ghadirian.:** Human recombinant tumor necrosis factor alpha protects susceptible A/j mice against lethal *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect. Immun.* 57: 39363939, 1989.

22. **Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Schmid, D., Aichelburg, A., Graninger, W. and Kremsner, P.:** Reciprocal regulation of Th-1 and Th-2-Cyrokine- Producing T Cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect. Immun.* 66 (12): 6040-6044, 1998.
23. **Heyde van der, H.C., Manning, D.D. and Weidanz, W.P.:** Role of CD4+ CD8+ aB T cell subset in the spleens of mice during blood-stage malaria. *J. Immunol.* 151: 6311-6317,1993.
24. **Langhorne, J., Moimbaerts, P. and Tonegawa, S.:** aB and ?d T cells in the immune response to the erythrocytic stages of malaria in mice. *Int. Immunol.* 7 (6): 1005-1011, 1995.
25. **Goodier, M.R., Lundqvist C., Hammarstrom, M.L., Troye-Blomberg, M. and Langhorne, J.:** Cytokine profiles for human V?9<sup>+</sup> T cells stimulated by *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.* 17: 413-423, 1995.
26. **Waterfall, M., Black, A. and Riley, E.:** ?d<sup>+</sup>T cell preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infect. Immun.* 66 (5): 2393-2398, 1998.
27. **Brown, W.C., Estes, D.M., Chantler, S.E; Kegerreis, K.A. and Suarez, C.E:** DNA and CpO oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. *Infect. Immun.* 66 (11): 5423-5432, 1998.
28. **García-Tapia, D.:** Determinación de citocinas y subisotipos de anticuerpos en ratones infectados con *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Tesis de Maestría.* E.N.C.B.-I.P.N. México, 1998.

29. **Brown, W.C., Woods, V.M., Dobbelaere, D.A.E. and Logan, K.S.:** Heterogeneity in cytokine profiles of *Babesia bovis*-specific bovine CD4+ T cell clones activated in vitro. *Infect. Immun.* 61: 3273-3281, 1993.
30. **Rodríguez, S.D., Palmer, G.H., Mc Elwain, T.F., McGuire, T.C., Ruef, B.J., Chitko.Mckown, C.G. and Brown, W.C. :** CD4 + T helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhopty-associated protein 1. *Infect. Immun.* 64: 2079-2087, 1996.
31. **Kumaratilake, L.M., Ferrante, A. and Rzepczyk, C:** The role of the T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotaxin and IFN- $\gamma$  comparisons with tumor necrosis factor effects. *J. Immunol.* 146 (2): 762-767, 1991.
32. **Brown, W.C., Zhao, S., Woods, V.M., Dobbelaere, D.A.E. and Rice-Ficht, A.C.:** (*Babesia bovis* specific CD4+T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. *Revue Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 46 (1-2): 65-69,1993.
33. **Ruef, B.J., Tuo, W., Rodríguez, S.D., Roussel, A.J., Chitko-Mckown, C.G., Palmer, G.H., Mc Elwain, T.F., Canals, A., Zarlenga, D.S., Gasbare, L.c. and Brown, W.c.:** Immunization with *Babesia bigemina* rhopty-associated protein 1 induces a type 1 cytokine response. *J. Interferon and Cytokine Res.* 17: 4554, 1997.
34. **Figueroa, J.V., Canto G.J., Álvarez J.A., Lona, R., Ramos, J.A. y Vega, C.A.:** Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Téc. Pecu. Méx.* 36 (2): 95-107, 1998.

35. **Palmer, D.A., Buening, G.M and Carson, C.A.:** Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. *Parasitology*. 84: 657,1982.
36. **Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D. e Inwood, M.J.H.:** Técnicas hematológicas en: Métodos de laboratorio. *Interamericana*, México D.F. pp. 695-910, 1985.
37. **Hermosilla, C., Burger, H.J. and Zaher, H.:** Tcell responses in calves to primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* 84: 46-64, 1999.
38. **Goldaman, M., Pipano, E.and Rosemberg, A.S.:** Fluorescent antibody test for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. *Res. Vet. Sci.* 13: 77-81, 1972.
39. **Mwangi, D.M., Mahan, S.M., Nyanjui, J.K., Taracha, E.L.N. and McKeever, D.J.:** Immunization of cattle by infection with *Cowdria ruminantium* Elicits T lymphocytes that recognize autologous, infected endothelial cells and monocytes. *Infect. Immun.*66: 1855-1860, 1988.
40. **Reyes, C.P.:** Pruebas de concordancia en: Bioestadística Aplicada. Agronomía,Biología,Química.*Ed Trillas,México.pp:* 181-185, 1987.
41. **Shoda, L.K., Palmer G.H., Florin Ch.J., Florin Ch.M., Godson D.L., Brown W.C.:** *Babesia bovis*-stimulated macrophages express Interleukin-1B, Interleukin-12, Tumor necrosis factor alpha, and Nitric Oxide and inhibit parasite replication *in vitro*. *Infect. Immun.* 68 (9): 5139-5145,2000.
42. **Court R.A., Jackson L.A., Lee R.P.:** Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle

infected with *Babesia bovis*. *Int. Jour. for Parasitol.* 19: 2937, 2001.

43. **Goff W.L., Johnson W.c., Cluff C.W.:** *Babesia bovis* Immunity: *In vitro* and *in vivo* evidence for IL-10 regulation of IFN and iNOS. *Ann. of the New York Acad. of Scien.* 849: 161-180, 1998.
44. **Brown W.C.:** Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 22 (101): 233-248, 2001.
45. **Goff W.L., Johnson W.C., Parish S.M., Barrington G.M., Tuo W., Valdez R.A.:** The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 23 (9): 463-471, 2001.
46. **Jenkins M.C.:** Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101 (3-4): 291-310, 2001.
47. **Smith R.A., Kreeger H.M., Alvarez J.A., Goin J.C., Davis W.C., Whipple D.L., Estes D.M.:** Role of CD8+ and WC-1 y/B cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bo mouse. *Jour of Leuk. Biol.* 65: 28-34, 1999.