



Laboratorio de Protozoos Patógenos

Instituto de Patobiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
(CICVyA), INTA

Monica Florin-Christensen* y Leonhard Schnittger*

*Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Nombres, posiciones y e-mails de los integrantes del grupo:

Nombre	Posición	E-mail
Monica (Jacobsen) Florin-Christensen	Investigadora Independiente, CONICET	mflorin@cnia.inta.gov.ar
Leonhard Schnittger	Investigador Independiente, CONICET	lschnittger@cnia.inta.gov.ar
Mariana Dominguez	Profesional Postdoctoral, INTA	mdominguez@cnia.inta.gov.ar
Anabel Rodriguez	Becaria Postdoctoral, CONICET	arodriguez@cnia.inta.gov.ar
Lucas Ferreri	Becario Doctoral, CONICET	lferreri@cnia.inta.gov.ar
Maria Mesplet	Becaria Doctoral, CONICET	mmesplet@cnia.inta.gov.ar
Florencia Torrá	Tesista de Licenciatura	flor_16v@hotmail.com
Tamara Carletti	Tesista de Licenciatura	aguape@msn.com
Mara Martin	Tesista de Licenciatura	maru_emg@hotmail.com
Daniela Flores	Tesista de Licenciatura	daniela_a_flores@hotmail.com
Yanina Minichiello	Tesista de Licenciatura	yo_yani_nina@hotmail.com
Jimena Maidana	Tesista de Licenciatura	jimena_maida@hotmail.com
Liliana Binashi	Técnica Profesional, CONICET	lilianabinaschi@hotmail.com
Alicia Piaggio	Asistente Administrativa, INTA	aliciampiaggio@hotmail.com

Datos de contacto:

Dirección Postal:

Laboratorio Protozoos Patógenos
Instituto de Patobiología
CICVyA
INTA-Castelar
Los Reseros y Nicolas Repetto, s/n
1686 Hurlingham, Provincia de Buenos Aires
ARGENTINA

Teléfonos: +54 114621-1289/1712/0443, Internos 141, 145, 146, 147

FAX: +54 114 621-1289/1712/0443, Interno 112

Áreas temáticas:

Las investigaciones de este grupo tienen un componente básico orientado a aumentar el conocimiento sobre protozoos de importancia veterinaria, en particular aquellos que afectan al ganado productivo; y un componente aplicado tendiente a desarrollar medidas mejoradas para su control utilizando herramientas de biotecnología.

Evolución histórica de las actividades del grupo y logros alcanzados:

El grupo de Protozoos Patógenos fue creado por la Dra. Monica Florin-Christensen, Investigadora Independiente de CONICET, en 2001, a su regreso al país después de una estadía de especialización en biología molecular de protozoos de la especie *Babesia sp.* en la Washington State University, Pullman, USA. Comenzó a funcionar en el Instituto de Virología, del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) del INTA de Castelar; para luego trasladarse al Instituto de Patobiología (Area Parasitología) del mismo centro, hacia fines de 2008. Desde sus inicios las actividades de este grupo estuvieron dirigidas a la aplicación de herramientas de biología molecular para el desarrollo de herramientas de control de protozoos hemoparásitos



transmitidos por garrapatas a bovinos y equinos. En el 2006, se incorporó al grupo el Dr. Leonhard Schnittger, proveniente de Alemania, en un principio como participante de un proyecto de la Unión Europea, para luego pasar a ser Investigador Independiente de CONICET. Su incorporación permitió reforzar los aspectos bioinformáticos de las investigaciones en curso, extender los estudios a otros protozoos del phylum Apicomplexa de importancia veterinaria y económica; e incorporar como línea de trabajo el control de la transcripción génica mediante mecanismos epigenéticos. Desde el 2001 hasta el presente, se han llevado a cabo en el grupo 11 tesis de licenciatura (6 de las cuales están en ejecución), una Tesis de Maestría (en ejecución), 5 Tesis Doctorales (3 ya terminadas y 2 en ejecución); así como la dirección de 3 Tesis Doctorales (en ejecución) de estudiantes que trabajan en otros laboratorios. Esta permanente formación de recursos humanos ha contribuido a la estructura actual del grupo, dado que algunos de los estudiantes dirigidos han accedido a becas o posiciones estables de investigación y permanecen en el laboratorio. El grupo de Protozoos Patógenos mantiene vínculos cooperativos con investigadores argentinos (Institutos de Patobiología, Virología y Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar; las Estaciones Experimentales de INTA en Rafaela, Santa Fé, Mercedes, Corrientes y Abrapampa, Jujuy; la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; INTECH, Chascomús), y extranjeros (de Brasil, México, USA, Australia, Portugal, Italia y Alemania).

A continuación se detallan algunos de los logros recientes alcanzados por este grupo, que ejemplifican el tipo de investigaciones que se han llevado a cabo:

Identificación y caracterización de epitopes B conservados en antígenos de superficie de *Babesia bovis*. Este trabajo formó parte de la Tesis Doctoral de Mariana Dominguez, dirigida por Monica Florin-Christensen y defendida en Marzo del 2009 en la Universidad de Buenos Aires (UBA), y se encuadra dentro del objetivo general de desarrollar vacunas a subunidades para la babesiosis bovina. En particular, nos hemos centrado en la familia MSA-2 (merozoite surface antigen-2) de *B. bovis*, una familia de antígenos de superficie que constituyen candidatos vacunales y de diagnóstico para estos parásitos. Se amplificaron por PCR y clonaron alelos de los genes *msa-2* a partir de ADN de aislamientos geográficos de *B. bovis* de Argentina y México. Mediante análisis bioinformático, se identificaron regiones conservadas entre todas las secuencias que contuvieran posibles epitopes B. De estos, se seleccionaron cuatro y se obtuvieron péptidos sintéticos, conjugados a un carrier adecuado para la producción de antisueros murinos. Todos los sueros reconocieron la superficie de merozoitos de *B. bovis* de una cepa argentina y una mexicana, demostrando que los péptidos corresponden a auténticos epitopes B presentes en los parásitos. Además, dos de los sueros impidieron la invasión de eritrocitos por parte de los parásitos, indicando que esas regiones de las proteínas son esenciales en el proceso de invasión. La conservación de epitopes B expuestos en la superficie, los cuales están bajo permanente presión de selección del sistema inmunológico del huésped podría estar indicando una limitante fisiológica a la variación, poniendo de manifiesto que las regiones identificadas son críticas para la supervivencia del parásito. Este trabajo forma parte de la siguiente publicación: *Dominguez, M., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Mosqueda, J., Cetrá, B., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M. In silico predicted conserved B-cell epitopes in the Merozoite Surface Antigen-2 family of B. bovis are neutralization sensitive, Vet. Parasitol. 167: 216-226, 2010.*

Glicosilfosfatidilinositol de *Babesia bovis*: Estudios de su estructura, camino biosintético e importancia biológica. Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de Anabel Rodriguez, (UBA), dirigida por Monica Florin-Christensen, que será defendida en Junio 2010. Las moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) juegan roles importantes en la biología y patogenia de distintos protozoos parásitos. Sirven como anclas de membrana de antígenos de superficie y se encuentran también libres en la membrana celular. En este estudio se aisló un GPI libre de merozoitos de *B. bovis* y se lo sometió a análisis químicos para dilucidar su estructura (que consistió en diacilglicerol-inositol-glucosamina-manosa-manosa). Por otra parte, utilizando herramientas bioinformáticas, se identificaron en el genoma de *B. bovis* los genes codificantes para enzimas del camino biosintético de estas moléculas, de acuerdo a su similitud con los genes correspondientes identificados en *Plasmodium falciparum*. Estos resultados sugieren que *B. bovis* puede sintetizar GPI en forma independiente y no incorpora estas moléculas de su hospedador. Finalmente, se halló que la manosamina, un inhibidor de la síntesis de GPI descripto para *P. falciparum*, inhibe el crecimiento de merozoitos de *B. bovis* cultivados *in vitro*, lo cual indica la importancia de las moléculas de GPI en la biología de estos parásitos. Este trabajo fue publicado en: *Rodriguez, A.E., Couto, A., Echaide, I., Schnittger, L., Florin-Christensen, M. Babesia bovis contains an abundant parasite-specific protein-*



free glycerophosphatidylinositol and the genes predicted to be involved in its assembly, Vet. Parasitol. 167: 227-235, 2010.

Identificación y caracterización molecular de proteasas de *Babesia bovis*. Este trabajo es parte de la Tesis Doctoral de María Mesplet (UBA), dirigida por Monica Florin-Christensen, y que se pronostica será concluida en Marzo del 2011. Las cisteín y serin proteasas participan en la invasión de eritrocitos, la ruptura de membranas y el metabolismo de la hemoglobina en parásitos apicomplexos de otras especies. Dado que no existen estudios sobre estas enzimas o los genes que las codifican en *Babesia bovis*, hemos buscado en el genoma de este organismo e identificado dos genes que podrían ser homologos a los que codifican para una cisteína proteasa y una serin proteasa de otros apicomplexa. Estos genes fueron amplificados por PCR de una serie de aislamientos de Argentina, Mexico, Brasil y Uruguay, clonados y secuenciados, hallandose un alto grado de similitud entre secuencias y la presencia de epitopes B predichos en regiones conservadas. Ambos genes son transcritos en el estadio de merozoitos y carecen de intrones. En el caso de la cisteín proteasa, a la cual hemos denominado bovipain-2, se produjo una forma recombinante en *E. coli*, que fue purificada por electroforesis en geles de poliacrilamida, seguida de electroelución. Se obtuvieron antisueros murinos contra esta proteína, los cuales reaccionaron con lisados de merozoitos de *B. bovis*, demostrando que la bovipain-2 es expresada en este estadio. Mediante inmunofluorescencia se observó que se localiza posiblemente en la vacuola alimenticia. Estos resultados forman parte del trabajo: Mesplet, M., Echaide, I., Dominguez, M., Mosqueda, J., Suarez, C., Schnittger, L., Florin-Christensen, M. *Characterization of Bovipain-2: an orthologue of Falcipain-2 in the tick-transmitted hemoparasite Babesia bovis (2010, en preparación)*. Similares estudios serán llevados a cabo con la serin proteasa. La conservación de secuencias observada entre aislamientos geográficos, sumado a la predicción de epitopes B, y a la importancia funcional descrita para las proteasas en otros parásitos, hace que estas proteínas sean candidatos de interés para el desarrollo de vacunas a subunidades.

Desarrollo de un sistema de marcadores moleculares para caracterizar aislamientos geográficos de *B. bovis*. Este trabajo fue desarrollado por las tesis de Licenciatura Marina Caballero y Agustina Perez Llana (Universidad de Morón), dirigidas por Leonhard Schnittger, que defendieron sus tesis en Diciembre del 2008 y Marzo del 2009, respectivamente. Se considera que los micro y minisatélites son herramientas muy útiles para la diferenciación de cepas y poblaciones en diversos protozoos parásitos. En este trabajo, se identificaron *in silico* 14 secuencias satélites polimórficas en el genoma de *B. bovis* que sirvieron para tipificar cinco aislamientos de este parásito provenientes de Texas, Mexico y Argentina. Estos satélites se encuentran distribuidos en los cuatro cromosomas de *B. bovis*, permitiendo de esta manera un análisis del genoma completo. Las secuencias se amplificaron por PCR utilizando primers específicos y los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se visualizaron por tinción argéntica y se registraron las diferencias de tamaño. Se evaluó el genotipo multilocus de los cinco aislamientos de *B. bovis* y se encontró que a una mayor distancia geográfica correspondía una menor similitud genética. Este trabajo fue publicado en: Perez-Llaneza, A., Caballero, M., Baravalle, E., Mesplet, M., Mosqueda, J., Echaide, I., Suarez, C., Katzer, F., Pacheco, G., Florin-Christensen, M., Schnittger, L. *Development of a tandem repeat-based multilocus typing system distinguishing Babesia bovis geographic isolates. Veterinary Parasitology 167: 196-204, 2010.*

Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnostico serologico de piroplasmosis equina. Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de Gustavo Asenzo, Universidad Nacional de San Martin, dirigida por la Dra. Monica Florin-Christensen, defendida en Junio del 2009. El diagnóstico de la piroplasmosis equina es un requisito necesario para la exportación de caballos de carrera, una actividad de importancia económica para la Argentina. Dado que hay muy pocos datos sobre esta enfermedad en nuestro país, y que los reactivos disponibles son importados y de alto costo, se desarrolló un test de ELISA indirecto, que permite la obtención de datos epidemiológicos. Para este test, se utilizó como antígeno una forma recombinante de una porción de la proteína EMA-1 de *Theileria equi*, producida en *E. coli*. Se optimizó el ensayo en cuanto a agentes bloqueantes, temperaturas y tiempos de incubación, conjugado y sustrato. Para el cálculo del cut-off se utilizaron 63 sueros negativos y 117 sueros positivos, determinados con un test comercial, y se compararon los resultados en una curva de ROC. La concordancia entre ambos ensayos fue aceptable. Se aplicó este ensayo para investigar 159 muestras de suero de la localidad Mision Laishi en Formosa, y 84 muestras de la provincia de Entre Rios, obteniendose un porcentaje de positividad de 88 y 18%, respectivamente. El porcentaje obtenido en Entre Rios es particularmente alto, especialmente si se considera que Entre Rios esta en una zona supuestamente libre de garrapatas. Este trabajo fue



publicado en: Asenzo, G., Wilkowsky, S., Barrandeguy, M., Benitez, D., Florin-Christensen, M. *Theileria equi: Development of an indirect ELISA for epidemiological studies in Argentine horses*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1149, 235-238, 2008.

ELISA competitivo para Babesia bovis: En trabajos previos, hemos desarrollado un ELISA competitivo basado en el antígeno inmunodominante de *B. bovis* MSA-2c y un anticuerpo monoclonal que produjimos contra este. En un número reducido de sueros bovinos, provenientes de infecciones experimentales y naturales, este test resultó efectivo para detectar anticuerpos anti-*B. bovis*. Domínguez, M., Zabal, O., Wilkowsky, S., Echaide, I., T. de Echaide, S., Asenzo, G., Rodríguez, A., Zamorano, P., Farber, M., Suarez, C.E., Florin-Christensen, M. *A monoclonal antibody against Babesia bovis merozoite surface antigen-2c, suitable for a competitive ELISA test*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026: 165-170, 2004. Asimismo, fue empleado para detectar anticuerpos contra estos parásitos en búfalos de agua (ver más adelante). Recientemente se aplicó este test para evaluar 338 sueros de bovinos positivos o negativos para *B. bovis* diagnosticados por inmunofluorescencia. Los datos fueron sometidos al análisis de ROC y se obtuvo un 86,6% de sensibilidad y un 95,3% de especificidad. Estos resultados indican que el cELISA desarrollado podría ser una prueba eficaz para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en Argentina, y forman parte del siguiente trabajo: Domínguez, M., Echaide, I., T. de Echaide, S., Wilkowsky, S., Zabal, O., Schnittger, L., Florin-Christensen, M. *Optimization of a competitive ELISA for bovine babesiosis*. (2010, manuscrito en preparación).

El búfalo de agua como reservorio de Babesia sp. Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral (Universidad Nacional del Nordeste) de Daniel Benitez de la EEA-Mercedes, INTA, dirigida por la Dra. Mónica Florin-Christensen, y que se considera será terminada hacia Abril del 2011. Mediante PCR anidada se demostró que los búfalos son portadores de ADN de *B. bovis*, indicando infección con estos parásitos. Asimismo, la infección se confirmó por presencia de anticuerpos contra la proteína inmunodominante de *B. bovis* MSA-2c, mediante un ELISA competitivo. Esto indica que los búfalos de agua, los cuales son criados en zonas infestadas con garrapatas de los bovinos deben ser tenidos en cuenta en estudios epidemiológicos y campañas de prevención. Estos estudios fueron publicados en: Ferreri, L., Benitez, D., Domínguez, M., Rodríguez, A., Asenzo, G., Mesplet, M., Florin-Christensen, M., Schnittger, L. *Water buffalos as carriers of Babesia bovis in Argentina*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1149, 149-151, 2008. Más recientemente estos estudios fueron completados con inoculaciones experimentales de búfalos con cepas patogénicas de *B. bovis* y se comprobó que estos animales no desarrollan síntomas clínicos frente a estas infecciones (Benitez, D., Florin-Christensen, M., Mesplet, M., Bevans, W. *Experimental evaluation of the pathogenicity of two B. bovis strains in water buffalos*, World Congress of Buffalos, Buenos Aires, Abril 2010, y Benitez et al, 2010, trabajo en preparación).

Identificación de Babesia vogeli en perros. En este trabajo, realizado como una colaboración entre el grupo de Protozoos Patógenos con los Med. Vet. Diego Eiras y Julia Basabe, se extrajo ADN a partir de sangre de dos perros de la zona Sur del Gran Buenos Aires, en los cuales se había detectado la presencia de piroplasmas grandes intraeritrocíticos, por observación microscópica. Se amplificó y secuenció la región hipervariable del gen 18S. Se realizaron alineamientos con otras secuencias disponibles en el GenBank y se construyeron árboles filogenéticos. Las secuencias del gen 18S ribosomal claramente segregaron en tres clados distinguibles que correspondieron a *Babesia canis*, *B. vogeli* y *B. rossi*. Ambas secuencias de los aislamientos de Argentina segregaron en la rama de *B. vogeli*. Este trabajo representa la primera evidencia molecular de la existencia de *B. vogeli* en Argentina y fue publicado en: Eiras, D.F., Basabe, J., Mesplet, M., Schnittger, L. *First molecular characterization of Babesia vogeli in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina*. Vet Parasitol. 157: 294-8, 2008.

Otros trabajos recientes:

- Wilkowsky, S., Farber, M., Gil G., Echaide, I., Mosqueda, J., Alcaraz, E., Suarez, C., Florin-Christensen, M. *Molecular characterization of Babesia bovis strains using PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the msa2-a/b genes*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1149, 9-18, 2008.
- Florin-Christensen, M., Schnittger, L. *Piroplasmids and Ticks: a long-lasting intimate relationship*. Frontiers in Biosciences 14: 3064-73, 2009.
- Wilkowsky, S.E., Moretta, R., Mosqueda, J., Gil, G., Echaide, I., Lía, V., Falcón, A., Florin-Christensen, M., Farber, M. *A new set of molecular markers for the genotyping of Babesia bovis isolates*. Vet Parasitol. 161: 9-18, 2009.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Asenzo, G., Benitez, D., Florin-Christensen, M., Gonzalez-Oliva, A., Henriques, G., Silva, M., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., Madruga, C.R. *Development of fluorogenic*



probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.* 162: 200-6, 2009.

- Silva, M., Ueti, M.W., Norimine, J., Florin-Christensen, M., Bastos, R.G., Goff, W.L., Brown, W.C., Oliva, A. Suarez, C.E. *Babesia bovis* Expresses a Neutralization-Sensitive Antigen that Contains a Microneme Adhesive Repeat (MAR) Domain. *Parasitology International*, 2010, en prensa

- Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D., Fontanarrosa, M., Schnittger, L. PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. 2010, enviado a publicación.

Líneas actuales de investigación, objetivos, responsables, participantes y colaboradores:

Tipificación molecular de aislamientos de *B. bovis* y *B. ovis*

Objetivos: (i) Optimizar el sistema de tipificación de cepas de *B. bovis* basado en micro y mini-satelites y aplicarlo al estudio de aislamientos geográficos de distintas partes del mundo. (ii) Desarrollar un sistema de marcadores moleculares para el piroplasmido *B. ovis*, un protozoo transmitido por garrapatas, cercanamente relacionado con *B. bovis* y que afecta a ovinos y caprinos.

Responsable: Leonhard Schnittger

Participantes: Daniela Flores, Yanina Minichiello, Monica Florin-Christensen

Colaboradores: Flabio Araujo, EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, Brasil, Abel Gonzalez Oliva IBET, Portugal, Peter Rolls, Tick Fever Center, Queensland, Australia; Alessandra Torina, Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Italia.

Mecanismos epigenéticos de control de la transcripción génica en *B. bovis*

Objetivos: Investigar si existen en *B. bovis* mecanismos de control epigenético de la transcripción mediados por histonas. En particular, este trabajo se centra en estudiar asociaciones entre histonas y variantes de histonas, y entre variantes y modificaciones de histonas con regiones del genoma con distintos niveles de transcripción.

Responsable: Leonhard Schnittger

Participantes: Lucas Ferreri, Mariana Dominguez, Monica Florin-Christensen

Colaboradores: Ignacio Echaide, EEA-Rafaela, INTA, Carlos Suarez, ARS-USDA, USA, Minerva Camacho, UACM, Mexico.

Caracterización de candidatos vacunales de *B. bovis* y piroplasmidos de pequeños rumiantes

Objetivos: Identificar y caracterizar proteasas y proteínas ancladas por puentes de GPI tanto de *B. bovis* como de *B. ovis* y otros piroplásmidos, como posibles inmunógenos para ser utilizados en vacunas a subunidades contra estos organismos. Asimismo, en esta línea se investiga el papel de las moléculas de GPI en la patogénesis causada por distintos piroplásmidos.

Responsable: Monica Florin-Christensen

Participantes: Maria Mesplet, Anabel Rodriguez, Leonhard Schnittger, Florencia Torrá, Mariana Dominguez.

Colaboradores: Ignacio Echaide (EEA-Rafaela), Daniel Benitez (EEA-Mercedes), Silvina Wilkowsky, Instituto de Biotecnología, CICVyA, Carlos Suarez, Animal Disease Research Unit, USDA, Pullman, USA; Alessandra Torina, IZS, Italia; Abel Gonzalez Oliva, IBET, Portugal; Minerva Camacho, UACM, Mexico; Juan Mosqueda, Universidad de Queretaro, Mexico; Ulrike Seitzer, Borstel Research Institute, Alemania.

Sarcocistiosis en camélidos sudamericanos

Objetivo: Caracterización molecular de protozoos de la especie *Sarcocystis* sp. formadores de quistes en músculo de llama y puesta a punto de métodos para la detección de infecciones por estos organismos.

Responsable: Monica Florin-Christensen

Participantes: Tamara Carletti, Mara Martin, Mariana Dominguez

Colaboradores: Sandra Romero, EEA-Abrapampa, Jujuy

Criptosporidiosis en bovinos y aves:

Objetivo: Detección de ADN de criptosporidiosis en materia fecal de bovinos y aves y tipificación de aislamientos utilizando marcadores moleculares.

Responsable: Leonhard Schnittger

Participantes: Jimena Maidana, Mariana Dominguez

Colaboradores: Agustin Venzano, Instituto de Patobiología, CICVyA.

Financiamiento reciente para investigación:

- ANPCyT: PICTR2002-00054: Identificación de epitopes B conservados en antígenos de superficie



del hemoparásito bovino *Babesia bovis*, 2004-2008.

- Comisión Europea: FP6, INCO 003691: "Molecular characterization of Latin American and Mediterranean *Babesia bovis* and *B. bigemina* strains and its application for improved control strategies (MEDLABAB)". 2005-2009.
- Wellcome Trust, UK: Project No. 075800/Z/04/Z: "Development of new vaccines for bovine babesiosis and anaplasmosis", 2009-2010.
- MINCyT: Programa de Cooperación Bilateral Argentina-México, con el INIFAP, Morelos, 2005-2007 ME/PA03-BVIII/030.
- CONICET: PIP 114 20080100653 Estudios sobre la biología y patogénesis de *Sarcocystis spp.* de importancia para el ganado productivo, 2009-2011.
- Comisión Europea: FP7, INCO 245145 "Improvement of current and development of new vaccines for theileriosis and babesiosis", 2010-2012.
- MINCyT: Programa de Cooperación Bilateral Argentina-Portugal, con el IBET, Oeiras, 2010-2011, PO/09/19.