



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ciencias Naturales

Identificación de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (*TCTP*) en *Babesia bovis* y evaluación de su participación en el establecimiento de la infección

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

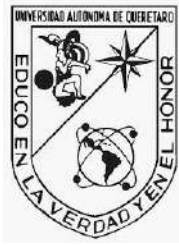
Presenta

MVZ Chyntia Quetzalli Pérez Almeida

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro., 2020



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ciencias Naturales**

**Maestría en Salud y Producción Animal sustentable**

**Identificación de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) en *Babesia bovis* y la evaluación de su participación en el establecimiento de la infección.**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Salud Animal y Producción Sustentable

**Presenta**

MVZ Chyntia Quetzalli Pérez Almeida.

**Dirigida por**

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

Presidente

Dr. Silvina E. Wilkowsky.

Secretario

Dr. Urso M. Dávila Montero.

Vocal

Dr. Carlos A. Vega y Murguía.

Vocal

Dr. Diego Josimar Hernández Silva.

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

17 de diciembre del 2020

México

## AGRADECIMIENTOS

A México, quien a través del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me otorgó una beca para realizar mi maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro junto con la Facultad de Ciencias Naturales por su apoyo, patrocinio y permitirme usar las instalaciones para la realización de este proyecto de tesis. Al campus Amazcala por las facilidades brindadas. Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER), por el apoyo brindado a partir el proyecto FOPER-2019-00675 “Caracterización molecular de la proteína tumoral traduccionalmente controlada (*TCTP*) en *B. bovis*”.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito mi más profundo agradecimiento por su valiosa guía con paciencia y rectitud en este proyecto y por compartirme sus conocimientos.

A los miembros del comité tutorial por las preciadas contribuciones, sugerencias y comentarios en este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Inmunología y Vacunas, por compartir sus conocimientos, los momentos de alegría y risas; en especial al Dr. Diego por su apoyo incondicional, compartir su conocimiento y sobre todo su paciencia para enseñar.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por creer en mí, por tanto amor. Por siempre estar ahí y hacer hasta lo imposible para apoyarme en la aventura que se me ocurra, por estar ahí para darme un empujón hacia adelante o, ayudarme a levantarme y sacudirme las rodillas, siempre estás ahí. Eres una gran inspiración, excelente mujer y madre sin igual. Te amo.

A mi papá, gracias por tanto apoyo, por nunca dejarme sola, estar al pendiente y motivarme siempre. A Dina, gracias por tu apoyo incondicional, por tus enseñanzas y cuidados. Los amo.

A Naye, mi hermanita que nunca dejaré de cuidar y encontrar. Me has enseñado a tener menos miedos y más aventuras, y así, tener más historias que contar. Me enseñaste a seguir las pasiones sin importar que tan locas sean. Te amo.

A Mario, gracias por tanto. Aunque no lo entiendas o no estés de acuerdo siempre estás ahí, gracias por apoyarme a alcanzar mis metas. Tu apoyo en esta aventura fue imprescindible y aunque tuvo muchos tropiezos siempre estuviste motivándome y ayudándome más de lo que te era posible. Te amo.

A mis amigos, a Juan Carlos Palacios, mi amigo incondicional, quien me regaña, me escucha, me emborracha, pero siempre me apoya y me motiva para seguir adelante. A mis amigos de la prepa, a pesar del tiempo y la distancia, siempre están ahí impulsándome a ser mejor. A mis amigas de la universidad Edna y Miry, me han apoyado, querido y brindado tantas risas y alegrías, no pude encontrar mejores amigas. Gracias por todo amigos, los quiero.

¿Qué significa "domesticar"? -volvió a preguntar el principito.  
-Es una cosa ya olvidada -dijo el zorro-, significa "crear vínculos... "  
-¿Crear vínculos?  
-Efectivamente, verás -dijo el zorro-. Tú no eres para mí todavía más que un  
muchachito igual a otros cien mil muchachitos y no te necesito para nada.  
Tampoco tú tienes necesidad de mí y no soy para ti más que un zorro entre  
otros cien mil zorros semejantes. Pero si tú me domesticas,  
entonces tendremos necesidad el uno del otro.

**Fragmento Le Petit Prince**  
**Antoine de Saint-Exupéry**

## RESUMEN

*Babesia bovis* es uno de los protozoarios del filo Apicomplexa que causan babesiosis bovina. Esta especie genera una enfermedad caracterizada por una alta virulencia y mortalidad. No hay vacunas recombinantes a la fecha y, se ha propuesto que parásitos como *B. bovis* producen proteínas que suprimen la respuesta inmune. La proteína tumoral traduccionalmente controlada (*TCTP*, por sus siglas en inglés) es una proteína multifuncional que tiene interacciones con muchas moléculas. La *TCTP* en organismos del filo Apicomplexa ha sido estudiada principalmente en *Plasmodium* spp. No se conocen las funciones específicas de esta proteína, pero se ha comprobado que es secretada en la sangre del huésped. En *P. falciparum* tiene funciones como estimular la liberación de histamina y citocinas en los basófilos. También se ha postulado que podría bloquear la respuesta inmunitaria y participar en la proliferación y diferenciación de los parásitos; esta proteína no ha sido caracterizada en *B. bovis*. En el presente proyecto se clonó el gen de *tctp* de los aislados de Zacatecas, EUA, Michoacán y Nayarit y se secuenció. Se diseñaron péptidos con herramientas bioinformáticas, los cuales fueron sintetizados y fueron utilizados para inmunizar conejos y bovinos, demostrando su capacidad inmunogénica al producir anticuerpos específicos en estas especies. Los bovinos inmunizados con estos péptidos fueron desafiados con una cepa virulenta de *B. bovis*, evaluando por 15 días variables como hematocrito, temperatura corporal y cantidad de glóbulos rojos parasitados en sangre periférica. Se observó una menor severidad en los signos clínicos y una menor cantidad de eritrocitos infectados en los animales inmunizados con estos péptidos. Se concluye que esta proteína es muy similar a la *TCTP* de *P. falciparum*, los péptidos diseñados fueron inmunogénicos en las especies evaluadas y se observó un uso potencial como vacuna contra *B. bovis*.

Palabras clave: Babesiosis bovina, *Babesia bovis*, Proteína tumoral traduccionalmente controlada, *TCTP*.

## ABSTRACT

*Babesia bovis* is one of the apicomplex protozoa that cause bovine babesiosis. This species generates a disease characterized by high virulence and mortality. There are no recombinant vaccines to date; and parasites like *B. bovis* have been proposed to produce proteins that suppress the immune response. Translationally controlled tumor protein (TCTP) is a multifunctional protein that interacts with many molecules. TCTP in apicomplex organisms has been studied mainly in *Plasmodium spp.* The specific functions of this protein are not known, but it has been shown that it is secreted into the host's blood. In *P. falciparum* it has functions such as stimulating the release of histamine and cytokines in basophils. It has also been postulated that it could block the immune response and participate in the proliferation and differentiation of parasites; this protein has not been characterized in *B. bovis*. In this project, the *tctp* gene was cloned from isolates from Zacatecas, USA, Michoacán and Nayarit and sequenced. Peptides were designed with bioinformatics tools, which were synthesized and used to immunize rabbits and cattle, demonstrating their immunogenic capacity by producing specific antibodies in these species. The bovines immunized with these peptides were challenged with a virulent strain of *B. bovis*, evaluating variables such as hematocrit, body temperature and amount of parasitized red blood cells in peripheral blood for 15 days. Less severe clinical signs and fewer infected erythrocytes were observed in animals immunized with these peptides. It is concluded that this protein is very similar to the TCTP of *P. falciparum*, the designed peptides were immunogenic in the evaluated species and a potential use as a vaccine against *B. bovis* was observed.

Keywords: Bovine babesiosis, *Babesia bovis*, Translationally controlled tumor protein, TCTP.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	i
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE CUADROS .....	xiii
Abreviaturas.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 PROTEÍNA TUMORAL TRADUCCIONALMENTE CONTROLADA ( <i>TCTP</i> ) .....	3
2.1.1 Estructura de <i>TCTP</i> en eucariontes.....	4
2.1.2 Funciones biológicas de la <i>TCTP</i> en mamíferos.....	6
2.1.3 <i>TCTP</i> en organismos del filo Apicomplexa. ....	9
2.1.3.1 Estructura de la <i>TCTP</i> en organismos apicomplejos .....	9
2.1.3.2 Funciones de <i>TCTP</i> en organismos del filo Apicomplexa .....	11
2.1.3.3 Uso de la <i>TCTP</i> como vacuna potencial contra organismos del filo Apicomplexa. ....	13
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>BABESIA</i> SPP. ....	14
2.2.1 Genoma .....	15
2.2.2 Ciclo biológico de <i>B. bovis</i> .....	16
2.3 BABESIOSIS POR <i>B. BOVIS</i> .....	17
2.3.1 Mecanismos de infección. ....	18
2.3.2 Respuesta inmunitaria.....	19
2.3.3 Impacto económico de la babesiosis bovina.....	22
2.3.4 Control de la babesiosis .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	28



5.1 OBJETIVO GENERAL .....	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
6.1 OBTENCIÓN DE CEPAS VIVAS DE <i>B. BOVIS</i> .....	29
6.1.1 Obtención de garrapatas .....	29
6.1.2 Lavado de garrapatas .....	30
6.1.2.1 Extracción de hemolinfa .....	30
6.1.3 Extracción de ADN.....	30
6.1.3.1 Extracción de ADN de larvas y garrapatas. ....	31
6.1.3.2 Extracción de ADN de huevo de garrapata.....	32
6.1.3.3 Extracción de ADN en papel filtro de celulosa.....	34
6.1.3.4 Extracción de ADN en sangre infectada. ....	35
6.1.4 Diagnóstico de <i>Babesia bovis</i> y <i>bigemina</i> por PCR anidado. ....	36
6.2 CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>TCTP</i> DE <i>B. BOVIS</i> .....	37
6.2.1 Identificación del gen de <i>tctp</i> de <i>B. bovis</i> por bioinformática.....	37
6.2.2 Diseño de oligonucleótidos.....	37
6.2.3 Estandarización de <i>PCR</i> . ....	37
6.2.4 Amplificación del gen de <i>tctp</i> por <i>PCR</i> . ....	38
6.2.5 Clonación del gen de <i>tctp</i> de diferentes aislados en TOPO TA cloning®.....	39
6.2.6 Secuenciación del gen de <i>tctp</i> de las diferentes cepas. ....	42
6.2.7 Análisis de la topología de la <i>TCTP</i> .....	42
6.2.7.1 Comparación de la secuencia de aminoácidos con la <i>TCTP</i> de otras especies... 43	
6.2.7.2 Predicción de la estructura terciaria de la <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i> . ....	43
6.2.8 Predicción de péptidos con alta probabilidad de ser epítipo B.....	43
6.3 EVALUACIÓN EL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA <i>TCTP</i> DE <i>B. BOVIS</i> EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.....	44
6.3.1 Inmunizaciones con péptidos de <i>B. bovis</i> a conejos.....	44
6.3.2 Inmunización de bovinos con los péptidos diseñados.....	46
6.3.3 Desafío contra <i>B. bovis</i> en bovinos. ....	47
6.3.4 Evaluación de la respuesta en los bovinos. ....	48

6.3.5 Inmunofluorescencia indirecta.....	50
6.3.6 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas ( <i>ELISA</i> ).....	52
6.3.6.1 Titulación de los péptidos TCTP II,III, IV. ....	52
6.3.6.2 Titulación de anticuerpos en suero de bovinos inmunizados y grupo control ....	53
6.3.6.3 Determinación de anticuerpos.....	54
6.5.6.4 Titulación de anticuerpos totales.....	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
7.1 OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>B. BOVIS</i> .....	57
7.1.1 Extracción de hemolinfa. ....	57
7.1.2 Extracción de ADN.....	57
7.1.3 Diagnóstico de <i>Babesia bovis</i> y <i>bigemina</i> por PCR anidado. ....	58
7.2 CARACTERIZACIÓN DEL GEN TCTP DE <i>B. BOVIS</i> .....	59
7.2.1 Identificación del gen de <i>tctp</i> de <i>B. bovis</i> por bioinformática.....	59
7.2.2 Diseño de oligonucleótidos.....	60
7.2.3 Estandarización de PCR. ....	61
7.2.4 Amplificación del gen de <i>tctp</i> por PCR. ....	62
7.2.5 Clonación del gen de <i>tctp</i> de diferentes aislados.....	63
7.2.6 Secuenciación del gen de <i>tctp</i> de las diferentes cepas. ....	64
7.2.7 Análisis de la topología de la TCTP.....	65
7.2.7.1 Comparación con la TCTP de otras especies.....	66
7.2.7.2 Predicción de la estructura terciaria de la TCTP de <i>B. bovis</i> . ....	67
7.2.8 Predicción de péptidos con alta probabilidad de ser epítipo B.....	67
7.3 EVALUACIÓN EL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TCTP DE <i>B. BOVIS</i> EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.....	70
7.3.1 Inmunofluorescencia indirecta.....	70
7.3.1.1 Inmunofluorescencia indirecta con suero de conejos .....	70
7.3.1.2 Inmunofluorescencia indirecta suero de bovinos, segunda inmunización. ....	73
7.3.1.3 Inmunofluorescencia indirecta suero de bovinos, tercera inmunización.....	75
7.3.2 Evaluación de la respuesta en los bovinos. ....	80
7.3.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas ( <i>ELISA</i> ).....	90
7.3.3.1 Titulación de los péptidos TCTP II,III, IV. ....	90

7.3.3.2 Titulación de anticuerpos en suero de bovinos inmunizados y grupo control. ...	91
7.3.3.3 Determinación de anticuerpos.....	93
7.3.3.4 Titulación de anticuerpos totales.....	94
8. DISCUSIÓN.....	97
9. CONCLUSIONES.....	102
10. REFERENCIAS.....	103

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pag.
1	Estructura tridimensional de la proteína <i>TCTP</i> de <i>S. pombe</i>	5
2	Estructura de la <i>TCTP</i> de humano, <i>P. falciparum</i> y <i>P. knowlesi</i>	5
3	Regulación y funciones de la <i>TCTP</i> en mamíferos.	6
4	Comparación de la estructura de <i>TCTP</i> entre mamíferos y organismos de filo Apicomplexa	11
5	Comparación de la estructura de <i>TCTP</i> entre <i>Plasmodium knowlesi</i> y <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11
6	Mecanismo de inmunidad innata y adquirida frente a <i>B. bovis</i> .	21
7	Oligonucleótidos usados para la detección de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> con el tamaño de amplicón esperado	36
8	Programa de termociclado para la detección de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	36
9	Programa de termociclado para la amplificación del gen de <i>tctp</i> en <i>B. bovis</i> con gradiente de la temperatura de alineamiento para la estandarización.	38
10	Programa de termociclado para la amplificación del gen de <i>tctp</i> en <i>B. bovis</i> .	38
11	Quinetos en hemolinfa de garrapatas	57
12	Gel de integridad del ADN extraído	58
13	<i>PCR</i> diagnóstico de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	59
14	Alineamiento de la proteína de <i>TCTP</i> de <i>P. falciparum</i> y <i>B. bovis</i>	60
15	Gen de <i>tctp</i> en el genoma de <i>B. bovis</i>	60
16	Fragmento del genoma de <i>B. bovis</i> con el gen de <i>tctp</i> amplificado por los oligonucleótidos diseñados	61
17	Gradiente de temperatura de temperatura de alineamiento para amplificar el gen de <i>tctp</i> con los oligonucleótidos específicos en el genoma de <i>B. bovis</i>	62
18	Amplificación del gen de <i>tctp</i> en diferentes aislados de <i>B. bovis</i>	62
19	<i>PCR</i> de las colonias clonadas del gen de <i>tctp</i> de <i>B. bovis</i> aislados de la cepa de referencia T2Bo y de Zacatecas	63
20	<i>PCR</i> de las colonias clonadas del gen de <i>tctp</i> de <i>B. bovis</i> aislados de Michoacán y Tepic	63
21	Alineamiento de nucleótidos con la herramienta BLAST del NCBI de la secuencia de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i> de Zacatecas	64
22	Secuencia consenso de gen de <i>tctp</i> de los aislados de <i>B. bovis</i> utilizados.	64
23	Predicción de la presencia del péptido señal en la secuencia de aminoácidos de <i>TCTP</i> con la herramienta bioinformática Signal P.	65
24	Predicción de la presencia de regiones transmembranales en la secuencia de aminoácidos de <i>TCTP</i> con la herramienta bioinformática TMHMM 2.0	65
25	Predicción del dominio de proteína en la secuencia de aminoácidos de <i>TCTP</i> con la herramienta bioinformática Pfam	65
26	Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la <i>TCTP</i> de <i>Bos Taurus</i> , <i>Bos indicus</i> y <i>Babesia bovis</i> .	66

27	Matriz de identidad entre la secuencia de aminoácidos de <i>TCTP</i> de <i>Bos Taurus</i> , <i>Bos indicus</i> y <i>Babesia bovis</i> .	66
28	Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	67
29	Matriz de identidad porcentual entre la secuencia de aminoácidos de la <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	67
30	Predicción bioinformática de la estructura tridimensional de la <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i> ,	68
31	Alineamiento de la estructura terciaria de <i>TCTP</i> de <i>P. falciparum</i> y de la secuencia consenso predicha de las secuencias obtenidas de <i>B. bovis</i>	68
32	Predicción de regiones con probabilidad de ser epítomos B	69
33	Características de los péptidos seleccionados para sintetizarse	69
34	IFI del suero de los conejos inmunizados con el péptido I de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i>	71
35	IFI del suero de los conejos inmunizados con el péptido II de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i>	71
36	IFI del suero de los conejos inmunizados con el péptido III de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i>	72
37	IFI del suero de los conejos inmunizados con el péptido IV de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i>	72
38	IFI del suero de la 2ª inmunización de los bovinos inmunizados con la mezcla de péptido de <i>TCTP</i> de <i>B. bovis</i>	73
39	IFIS del suero de la 2ª inmunización de los bovinos del grupo control	74
40	Controles de la IFI con suero de bovinos	74
41	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7281 del grupo control	75
42	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 9631 del grupo control	75
43	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7288 del grupo control	76
44	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7280 del grupo control	77
45	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7289 del grupo inmunizado	77
46	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7279 del grupo inmunizado	78
47	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 7294 del grupo inmunizado	78
48	IFI del suero de la 3ª inmunización del becerro 9648 del grupo inmunizado	79
49	Controles de laminillas en la prueba de IFI	79
50	Gráfico con promedio y desviación estándar de la temperatura corporal diaria por grupo	81
51	Gráfico con promedio y desviación estándar de la frecuencia cardiaca diaria por grupo	82
52	Gráfico con promedio y desviación estándar de la frecuencia respiratoria diaria por grupo	83
53	Gráfico con promedio y desviación estándar del tiempo de llenado capilar diaria por grupo	84
54	Gráfico con promedio y desviación estándar del hematocrito diario por grupo	85
55	Gráfico con promedio y desviación estándar del porcentaje de disminución del hematocrito diaria por grupo	86
56	Gráfico con promedio y desviación estándar del porcentaje de eritrocitos infectados diario por grupo	87
57	Becerro 7280 con letargia y depresión	88

58	Becerro 7281 y 9631 con letargia y depresión	89
59	Titulación de los péptidos por ELISA	90
60	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7281 y 7280	91
61	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7288 y 9631	92
62	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 9648	92
63	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7294	92
64	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7289	93
65	Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7279	93
66	Gráfica de la determinación de anticuerpos del grupo control	94
67	Gráfica de la determinación de anticuerpos del grupo inmunizado	94
68	Gráfica de la titulación de anticuerpos totales del grupo control	95
69	Gráfica de la titulación de anticuerpos totales del grupo inmunizado	96

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pag.
1	Especies de <i>Babesia</i> más comunes en bovinos	15
2	Características del Genoma de <i>Babesia. bovis</i> , <i>Theileria parva</i> y <i>Plasmodium falciparum</i>	16
3	Relación del tipo de muestra con el lugar de procedencia	31
4	Relación de los conejos inmunizados con el péptido utilizado	45
5	Calendario de inmunización y obtención de sangre en conejos	46
6	Relación de los becerros inmunizados con el inmunógeno utilizado	47
7	Calendario de inmunización, obtención de sangre, desafío con <i>B. bovis</i> y examen físico de los bovinos.	50
8	Características de los oligonucleótidos usados para amplificar el gen de <i>tctp</i> en el genoma de <i>B. bovis</i>	61
9	Nanogramos por mililitro de ADN plasmídico medido por espectrofotometría de las diferentes colonias de los aislados de <i>B. bovis</i> de Zacatecas, Michoacán y Tepic.	64
10	Promedio y desviación estándar diario por grupo de la temperatura corporal.	81
11	Promedio y desviación estándar diario por grupo de la frecuencia cardiaca.	81
12	Promedio y desviación estándar diario por grupo de la frecuencia respiratoria.	82
13	Promedio y desviación estándar diario por grupo del tiempo de llenado capilar.	83
14	Promedio y desviación estándar diario por grupo del hematocrito.	85
15	Promedio y desviación estándar diario por grupo del porcentaje de disminución del hematocrito.	86
16	Promedio y desviación estándar diario por grupo del porcentaje de eritrocitos infectados	87
17	Tabla de signos clínicos observados en cada uno de los animales para determinar la muerte clínica y dar tratamiento.	88

## Abreviaturas

% CG	Porcentaje de citosina-guanina
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
<i>B. bigemina</i>	<i>Babesia bigemina</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
<i>B. divergens</i>	<i>Babesia divergens</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas,
c.b.p.	Cuanto Baste Para
Células NK	Células Natural killer
DAPI	marcador fluorescente 4',6-diamidino-2 fenilindol
HRF	Factor liberador de histamina, Histamine-Releasing Factor
H	horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
Kb	Kilobase
Lpm	Latidos por minutos
Mbp	Mega pares de bases
Medio LB	Medio de cultivo Luria Berthani
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	Mililitros
MSA	Antígenos de superficie del merozoíto



NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, National Center of Biotechnology
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
<i>P. berguei</i>	<i>Plasmodium berguei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salina, Phosphate-buffered saline
PBS-T	Solución Tampón fosfato con detergente Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
Rpm	Respiraciones por minuto
RAP	Proteínas asociadas a roptrías
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
RON	Proteína del cuello de las roptrías, Rhoptry neck protein
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
<i>S. pombee</i>	<i>Schizosaccharomyces pombee</i>
SOC	Medio de caldo súper óptimo con represión por catabolito
<i>T. parva</i>	<i>Theileria parva</i>
TCR	Receptor de células T
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein Proteína Tumoral traduccionalmente controlada
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSAP6	Vía 6 activada por supresores de tumores, Tumor supresor-activated pathway
UNAM	Universidad Nacional autónoma de México
$\Delta G$	Energía de Gibbs, potencial termodinámico

## 1. INTRODUCCIÓN

*Babesia bovis* es uno de los parásitos del filo Apicomplexa que causan una enfermedad conocida como la babesiosis bovina. Es una enfermedad con alta virulencia y mortalidad, debido a la acumulación de eritrocitos parasitados en capilares de pulmón, riñón y cerebro, observándose parasitemia menor al 1%, problemas respiratorios y babesiosis cerebral con signos como ataxia, incoordinación y convulsiones sin respuesta al tratamiento. A pesar de que la babesiosis es una enfermedad tratable en las primeras etapas de la enfermedad, muchas veces el diagnóstico no es preciso y es tardío debido a que no presenta signos específicos, generando un fuerte impacto económico en la producción ganadera, considerando el costo por pérdidas animales, genética, tratamientos, control y la restricción de exportación de animales, principalmente en zonas tropicales. Se han utilizado diversos tipos de vacunas, principalmente vacunas vivas atenuadas, éstas mostraron resultados favorables; sin embargo, tuvieron un alto costo de producción, riesgos de contaminación y de reversión de la virulencia, un corto tiempo de anaquel y especificaciones especiales para el mantenimiento de la cadena fría. Las vacunas recombinantes son una opción sustentable para controlar la enfermedad, pero no existen a la fecha contra esta enfermedad.

La proteína tumoral traduccionalmente controlada (*TCTP*, por sus siglas en inglés) está altamente conservada en eucariontes. Es una proteína multifuncional que tiene interacciones con muchas moléculas; en los humanos, ratones y levaduras, que es donde más se ha estudiado, estimula la liberación de histamina en mastocitos y basófilos, participa en la división celular, regula la proliferación y la apoptosis, participa en el crecimiento celular y en la transformación de células malignas. En células B, la *TCTP*, estimula su crecimiento, proliferación y diferenciación, se une a la membrana e induce la producción de citocinas como IL-6 e IL-10, incrementa la expresión de MHC II y otras moléculas de superficie, induce la expresión de IgM, entre otras funciones.

En organismos del filo Apicomplexa, se ha estudiado la *TCTP* en *Plasmodium* spp, debido a que este parasito causan la malaria, una enfermedad de importancia en la salud humana. No se conocen sus funciones específicas en los organismos de este filo pero se ha destacado que es similar estructuralmente en artrópodos hematófagos y parásitos transmitidos en sangre, aunque difiere con los demás eucariontes; además de que es secretada en la sangre del huésped. En *P. falciparum*, por ejemplo, se ha descrito que tiene funciones como estimular la liberación de histamina y citocinas en los basófilos; también se ha postulado que podría bloquear la respuesta inmunitaria y participar en la regulación de la proliferación y diferenciación de los parásitos. No hay reportes de este gen en *Babesia bovis* ni de su uso como candidato vacunal contra esta especie.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 PROTEÍNA TUMORAL TRADUCCIONALMENTE CONTROLADA (*TCTP*)

La Proteína Tumoral Traduccionalmente Controlada (Translationally Controlled Tumor Protein, *TCTP*) es altamente conservada en eucariontes, pero no tiene secuencias consenso o dominios funcionales conocidos similares a otras familias de proteínas. Ha sido llamada también Factor liberador de histamina (*HRF*), p23, p21, Q23, fortilina, Mmilp (en levaduras) o Tpt1 (Gachet, et al., 1999; Hinojosa-Moya, et al., 2008; Wu, et al., 2015; Telerman & Amson, 2017). Fue aislada inicialmente en líneas celulares de tumor humano, cuando algunos equipos de investigación buscaban proteínas reguladas traduccionalmente. Fue mencionada por primera vez en 1989 cuando se publicó la secuencia de ADNc de este gen proveniente de células de carcinoma mamario humano (Gross, Gaestel, Böhm, & Bielka, 1989).

Es una proteína principalmente citoplasmática, pero se ha mencionado la distribución nuclear, sin asociación con ningún organelo (Gachet, et al., 1999), es una proteína que está involucrada en un amplio rango de interacciones moleculares con proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y otras moléculas pequeñas; pero solo algunas de estas interacciones han sido estudiadas (Telerman & Amson, 2017). La mayoría de las funciones identificadas están relacionadas con el crecimiento, división celular y con el sistema inmune estimulando la proliferación celular, en ambos casos, sugiriendo una función citoprotectora (Amzallag, et al., 2004; Boomer & Thiele, 2004; Hinojosa-Moya, et al., 2008).

### 2.1.1 Estructura de *TCTP* en eucariontes

*TCTP* tiene una estructura altamente conservada en eucariontes (Hinojosa-Moya, et al., 2008), similar a la familia Mss4/Dss4 de chaperonas libres de nucleótidos de guanina (Thaw, et al., 2001). A partir de la demostración de la estructura tridimensional de la *TCTP* de *S. pombe* por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (*NMR*), se describió la estructura de la proteína la cual consta de 4 láminas  $\beta$  y 3 hélices  $\alpha$  conectadas en una topología compleja, demostrando que la molécula de *TCTP* tiene 3 dominios distintos: el dominio de la lámina  $\beta$  central, un dominio  $\alpha$ -hélice y una estructura de asa flexible (Figura 1) (Thaw, et al., 2001). A través de la determinación de las estructuras de alta resolución de la *TCTP* de diferentes organismos por resonancia magnética nuclear (*NMR*) o por cristalografía de rayos X, se ha identificado que la región de unión a tubulina y la región de unión al calcio es la misma, siendo los dominios helicoidales para ambas; observando que la estructura principal de la proteína es altamente conservada (Figura 2) (Gachet, et al., 1999; Boomer & Thiele, 2004; Boomer U.-A., 2012; Telerman & Amson, 2017). En la secuencia de ARNm no hay alguna región codificante para péptido señal, ni se ha mencionado alguna proteína precursora (Boomer & Thiele, 2004).

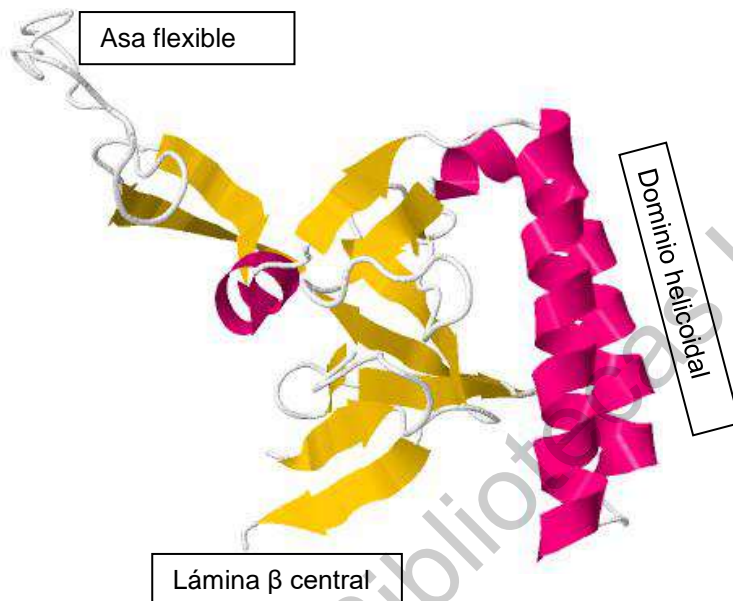


Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína *TCTP* de *S. pombe*, el dominio de la lámina- $\beta$  central está en amarillo y el dominio  $\alpha$ -hélice está en rosa, PDB: 1H6Q (Thaw, et al., 2001).

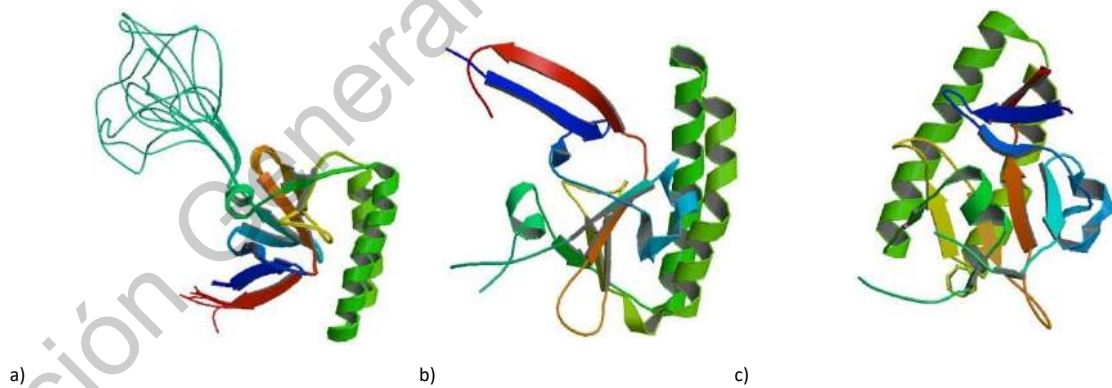


Figura 2. Estructuras de *TCTP* de a) humano, determinada con NMR b) *Plasmodium falciparum*, determinada con rayos X y c) *Plasmodium knowlesi*, determinada con rayos X. Imágenes de RCSB de PDB ID 2HR9 (Feng, Liu, Yao, & Wang, 2007), 3P3K (Eichhorn, Winter, Büchele, & al, 2013), 1TXJ (Vedadi, et al., 2007). Las regiones en espiral verde indican los dominios de hélices alfa.

### 2.1.2 Funciones biológicas de la *TCTP* en mamíferos

Esta proteína es expresada de forma general en todos los organismos eucariontes con una vida media larga. Ha sido identificada en una gran cantidad de tejidos y es expresada por muchos tipos de células, incluyendo células T, monocitos, fibroblastos y algunas células tumorales, entre otras; aunque los niveles de expresión dependen del tipo de tejido o célula y del estado de desarrollo (MacDonald, Rafnar, Landon, & Lichtenstein, 1995; Amzallag, et al., 2004; Boomer & Thiele, 2004). La expresión en mamíferos está regulada por factores de crecimiento, condiciones de estrés (choque térmico, metales pesados, inanición, citocinas o señales pro apoptóticas), activación de macrófagos, incremento de los niveles de calcio citoplasmático y variaciones circadianas en plantas, tanto a nivel traduccional como transcripcional (Figura 3) (Gachet, et al., 1999; Boomer, et al., 2002).

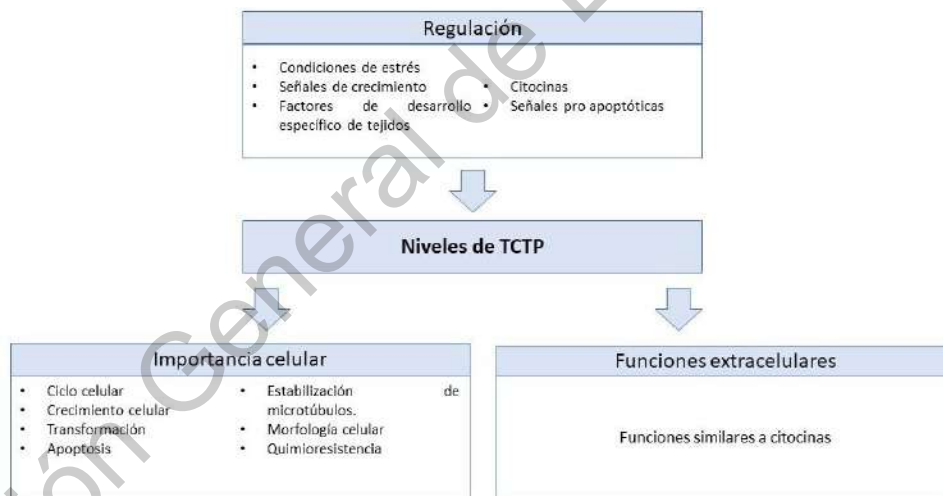


Figura 3. Regulación y funciones de *TCTP*. Resumen de las señales extracelulares y condiciones que regulan los niveles de *TCTP* y la importancia celular y extracelular de la proteína. Traducido de Boomer & Thiele, 2004 (Boomer & Thiele, 2004).

Se han descrito múltiples funciones para esta proteína en mamíferos, así como su interacción con un gran número de diversas proteínas de procesos celulares importantes (Boomer & Thiele, 2004; Wu, et al., 2009; Telerman & Amson,

2017). Inicialmente se identificó la participación de esta proteína en la unión del calcio (Boomer, et al., 2002). Posteriormente, se ha descrito su participación en muchos procesos celulares en células de mamíferos como la regulación de la proliferación y crecimiento celular, tamaño de los órganos, apoptosis y en el ciclo celular; también interfiere en procesos celulares como en la respuesta al estrés celular, choque térmico, desbalance iónico, reparación de ADN dañado, inflamación en respuesta a agentes externos y liberación de histamina en basófilos. Se ha planteado que la *TCTP* es una proteína que con frecuencia interactúa en dos formas diferentes al mismo tiempo, por lo que se requieren investigaciones meticulosas para establecer las interacciones moleculares de *TCTP* (Boomer & Thiele, 2004; Telerman & Amson, 2017).

Se ha demostrado que, en células de mamífero, *TCTP* tiene propiedades de unión a tubulina y a los filamentos de actina, donde se asocia a microtúbulos en forma dependiente durante la mayor parte del ciclo celular, participando en el reordenamiento de los microtúbulos y la estabilidad de la célula. Sugiriendo la participación en el ciclo celular; sin embargo, al haber una sobre expresión de esta, en células de mamífero, hay un crecimiento lento, un retraso en el ciclo celular, una alteración en la red de microtúbulos y en la morfología de la célula formando células multinucleadas (MacDonald, Rafnar, Landon, & Lichtenstein, 1995; Gachet, et al., 1999; Hinojosa-Moya, et al., 2008; Boomer U.-A. , 2012). En levaduras se ha demostrado que al final del ciclo celular esta proteína tiene una regulación negativa (Bonnet, et al., 2000). En células humanas, se ha estudiado la intervención de esta proteína en la traducción de proteínas al interactuar con el factor de elongación eucariota 1B $\delta$ , la cual es responsable por el transporte del ARN de transferencia al ribosoma en la síntesis de proteínas (Wu, et al., 2015).

Una de las funciones extracelulares de esta proteína es su participación en la regulación de la respuesta inmune. Se ha demostrado que es una molécula de unión con múltiples ligandos, la cual funciona como opsonina que promueve la fagocitosis de microorganismos e induce la producción de péptidos



antimicrobianos. Además, entre estas funciones, se ha mencionado que participa en la respuesta inflamatoria promoviendo la liberación de histamina en basófilos, eosinófilos y mastocitos; dependiente e independientemente de la presencia de IgE (participando en la respuesta alérgica aguda), además, estimula la producción de IL-4 e IL-13 en basófilos, induce la producción de citocinas en células B y actúa como factor de activación de células B.

En las células B actúa en diversas formas: estimula la proliferación celular, induce la expresión de MHC clase II, induce el crecimiento y la diferenciación de las células B y, estimula *in vitro* e *in vivo* la producción de inmunoglobulinas en células B, principalmente IgM, pero también estimula la producción de IgG e IgA; utilizando un receptor específico en células B, que también se ha encontrado en basófilos, mastocitos y eosinófilos. Lo que sugiere que esta proteína participa en diferentes respuestas inmunes (MacDonald, Rafnar, Landon, & Lichtenstein, 1995; Gachet, et al., 1999; Kang, et al., 2001; Amzallag, et al., 2004; Hinojosa-Moya, et al., 2008; Wang, Hu, Hua, Song, & Xia, 2013).

Se ha mencionado que *TCTP* es expresada durante el desarrollo y la activación de las células T, participando en el desarrollo de los timocitos e induciendo la activación mediada por TCR y la co-estimulación de CD28 de éstas células; también es muy importante para el mantenimiento de las células T periféricas, a través de distintas redes de señalización (Wu, et al., 2009).

Muchos de los procesos donde se ha identificado la participación de la *TCTP* sólo ocurre en algunas especies y, aunque la *TCTP* tiene un alto grado de conservación en eucariontes, indicando que es una proteína celular importante, las proteínas a las que se unen no son conservadas en organismos eucariontes; por lo que es necesario estudiar la participación de la proteína en diferentes especies (Gachet, et al., 1999; Wu, et al., 2015).

Se ha propuesto que esta proteína es secretada por una vía independiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, a través de exosomas en una vía

no clásica con ayuda de la molécula transmembranal *TSAP6* (tumor suppressor-activated pathway 6), un gen diana transcripcional que regula la secreción de proteínas, la cual está involucrada en el tráfico vesicular. Estos exosomas son pequeñas vesículas que se forman por gemación los cuales posteriormente se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido fuera de la célula. Además, se ha sugerido que la *TCTP* es constitutivamente expresada, pero solo una parte de esta es secretada, mientras que un porcentaje es mantenido dentro del citoplasma efectuando sus funciones intracelulares (Amzallag, et al., 2004; Lespagnol, et al., 2008).

### 2.1.3 *TCTP* en organismos del filo Apicomplexa.

Esta proteína ha sido identificada en el citoplasma de diversos organismos del filo Apicomplexa, como *Plasmodium* spp, donde se ha estudiado ampliamente. En *P. falciparum* se ha reportado su localización en las membranas de las vacuolas y en las membranas externas del parásito, principalmente en los trofozoítos (Bhisutthibhan, Philibert, Fujioka, Aikawa, & Meshnick, 1999; Mathieu, et al., 2015). Es secretada por el parásito en altas cantidades en la sangre del huésped, induciendo la liberación de histamina, participando en la fase pre-eritrocítica del parásito y, se une al calcio de huésped, siendo posible que esta proteína afecte la respuesta inmune del hospedador (Bhisutthibhan, Philibert, Fujioka, Aikawa, & Meshnick, 1999; MacDonald, et al., 2001; Mathieu, et al., 2015).

#### 2.1.3.1 Estructura de la *TCTP* en organismos apicomplejos

Se ha identificado que esta proteína es similar estructuralmente dentro del *phylum*, pero muy diferente con otras especies (Figura 4 y 5). La *TCTP* de *P. falciparum* es 33% idéntica y 54% similar en la secuencia de aminoácidos a la *TCTP* humana (MacDonald, et al., 2001), mientras que la *TCTP* de *P. falciparum* y *TCTP*

de *P. yoelii* son 88% idénticas y 97% similares en la secuencia de aminoácidos (Walker, et al., 2000).

Esta proteína es muy similar entre los organismos del filo Apicomplexa, principalmente en el dominio potencial de unión con la proteína G donde estos organismos tienen un segmento helicoidal adicional, en comparación con la estructura en mamíferos, el cual está compuesto por 22 a 30 aminoácidos, muy cerca de la bolsa de unión a GTPasa; conformando una hélice alfa en lugar de la hoja beta que está presente en la estructura de la *TCTP* de los eucariontes (Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017; Hinojosa-Moya, et al., 2008). Esta alteración en el dominio putativa de unión a la proteína G genera una conformación con mayor afinidad a la proteína G en comparación con la proteína humana y de *S. pombe*, estas variaciones también se han predicho en otros miembros del género *Plasmodium* (Calderón-Pérez, et al., 2014). Además, se ha mencionado que la *TCTP*, de los organismo del filo Apicomplexa, contiene un dominio de transducción de proteínas localizado en el extremo terminal NH<sub>2</sub> formando parte del potencial sitio de unión a proteína G (Calderón-Pérez, et al., 2014).

Se ha sugerido que estas diferencias estructurales podrían permitir una internalización más eficiente de la proteína a la célula, siendo esta más efectiva para internalizarse que la *TCTP* de mamíferos. Además estas diferencias estructurales, causan que la *TCTP* de los parásitos del filo Apicomplexa inhiba la respuesta inmunitaria actuando como mutante negativo. Bloqueando la interacción de la *TCTP* del huésped con la proteína G en la membrana de los linfocitos B y, por lo tanto, evitando la activación y la proliferación de células B y, la activación de la respuesta inmune; probablemente relacionado a la disminución de células B de memoria mencionada en malaria (Hinojosa-Moya, et al., 2008; Calderón-Pérez, et al., 2014; Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017).

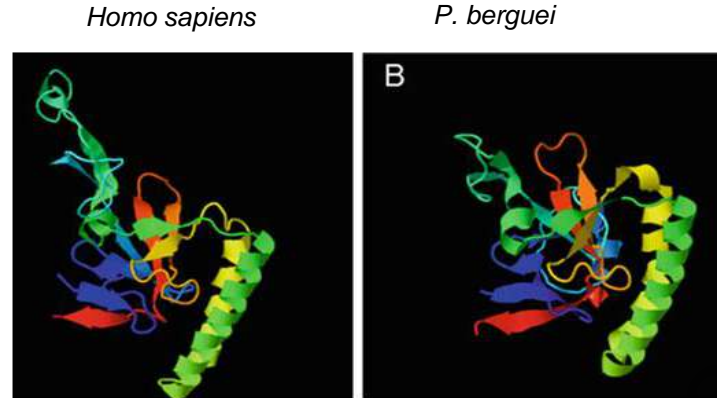


Figura 4. Comparación de la estructura de *TCTP* entre mamíferos (*Homo sapiens*) y organismos del filo Apicomplexa (*Plasmodium berguei*) (Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017).

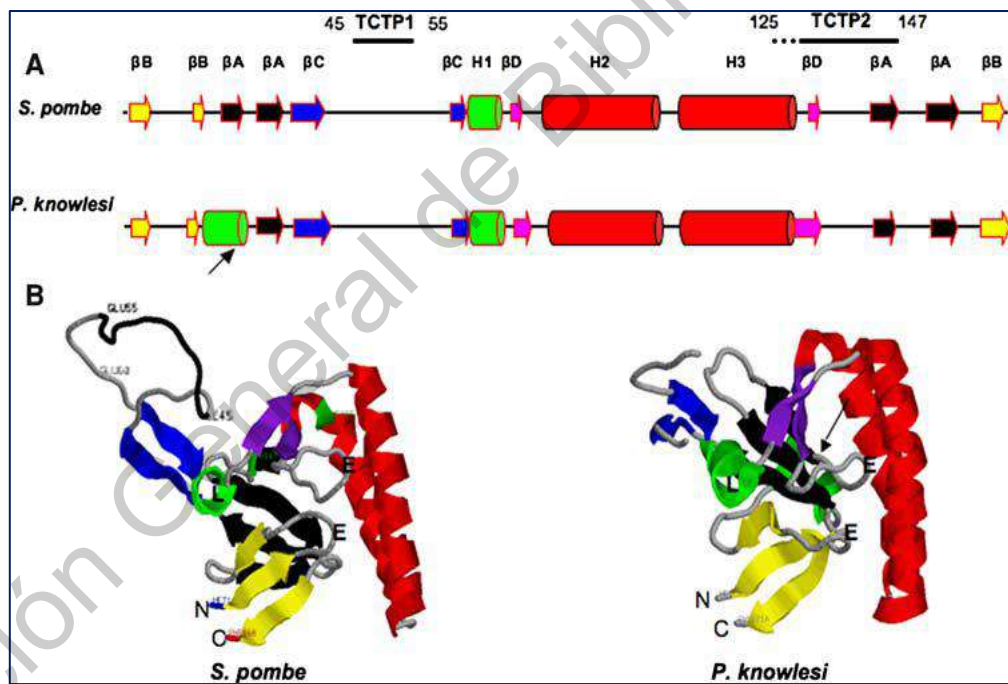


Figura 5. Comparación de la estructura de *TCTP* entre *Plasmodium knowlesi* y *Schizosaccharomyces pombe*, la flecha indica la  $\alpha$  hélice en *P. knowlesi* (Hinojosa-Moya, et al., 2008).

### 2.1.3.2 Funciones de *TCTP* en organismos del filo Apicomplexa

Se han documentado pocas funciones de esta proteína en organismos del filo Apicomplexa. Se sabe que es menos potente que el homólogo en humanos

(MacDonald, et al., 2001), se ha reportado una similitud el 54% de *TCTP* de *P. falciparum* y *P. berguei* con la *TCTP* de mamíferos, sin embargo sólo se ha reportado que la *TCTP* de *Plasmodium* sólo interactúa con células B, mientras que la *TCTP* de mamíferos interactúa con diferentes tipos de células (Mathieu, et al., 2015). En *Plasmodium* se ha mencionado que es producido en las fases eritrocíticas del parásito por lo que podría participar en la patogénesis de la malaria (Mathieu, et al., 2015). En *P. berguei*, se informó que *TCTP* interfiere con la producción de IL-6 (citocina pro inflamatoria que participa en la respuesta contra parásitos), desconociéndose aún la forma en que lo controla, la cual regula la fase aguda de la respuesta inmune y funciones de las células B y T, contribuyendo a la eliminación de los parásitos (Dermata-Gatsi, et al., 2016; Mathieu, et al., 2015). Se ha reportado que estimula la producción de diferentes interleucinas como IL-4 e IL-13 (MacDonald, Rafnar, Landon, & Lichtenstein, 1995).

También se ha señalado que *TCTP* en *Plasmodium* es sobre expresada por parásitos resistentes a artemisina y que esta se une a este medicamento anti malaria, lo que incrementa la resistencia a esta droga; por lo que esta proteína podría estar involucrada en la patología del parásito y la resistencia a fármacos (Walker, et al., 2000; Boomer & Thiele, 2004). Y, esta proteína, se ha detectado en altos niveles en el suero de animales infectados con *Plasmodium* en concentraciones correlacionadas directamente con el porcentaje de parasitemia (Mathieu, et al., 2015; Pelleau, et al., 2012).

Se ha planteado que la *TCTP* en *P. falciparum* estimula la activación de basófilos, asociados a la incapacidad de controlar la activación modulada por la *TCTP* del parásito (MacDonald, et al., 2001; Pelleau, et al., 2012). Esta activación está relacionada con la liberación de histamina por parte de los basófilos; la histamina incrementa la expresión de trombomodulina, la cual activa a las células endoteliales mediante la unión de las cadenas de Von Willebrand y la unión de plaquetas, adquiriendo estas un estado pro adhesivo que permite el secuestro de eritrocitos infectados. Se ha relacionado directamente los niveles de la histamina

con la presencia de malaria severa o cerebral; además, el efecto vasodilatador de la histamina, podría permitir que los parásitos circulen fácilmente a través de los capilares (MacDonald, et al., 2001; Bridges, et al., 2009; Pelleau, et al., 2012). También se ha afirmado que induce la secreción de IL-8 de eosinófilos humanos (MacDonald, et al., 2001). Se cree que esta proteína podría ser secretada por parásitos del filo Apicomplexa por exosomas, al igual que en mamíferos (Mathieu, et al., 2015).

#### 2.1.3.3 Uso de la *TCTP* como vacuna potencial contra organismos del filo Apicomplexa.

Se han realizado diferentes estudios con la *TCTP* en *Plasmodium* spp, debido a su importancia en medicina humana. Smooker y colaboradores inmunizaron ratones con *TCTP* de *Plasmodium falciparum* en 3 ocasiones (cada 8 semanas), desafiándolos 6 semanas después con diferentes especies de *Plasmodium*; observaron una disminución de la parasitemia y un retraso en la aparición de eritrocitos infectados en los ratones inmunizados, en comparación con los ratones del grupo control inmunizados con *PBS* (Taylor, et al., 2015).

También se realizó un experimento usando cepas *knock out* para el gen de *tctp* de con *P. berguei*, estas cepas se utilizaron para inmunizar ratones; los cuales posteriormente fueron desafiados en repetidas ocasiones con *P. berguei* o *P. yoelii* en un periodo de un año. Los ratones inmunizados estuvieron protegidos en todos los desafíos, sobreviviendo todo el tiempo del estudio. No se detectaron eritrocitos infectados, ni esporozoítos en sangre; el parásito tampoco pudo ser detectado en sangre por PCR. En este estudio también se analizaron los anticuerpos específicos generados siendo en su mayoría IgG subclase IgG2c e IgG3 los cuales reconocieron estadios sanguíneos de cepas salvajes de *P. berguei*. Estos anticuerpos fueron purificados y transferidos a ratones sin exposición previa al parásito, los cuales fueron desafiados. Los ratones tuvieron una parasitemia baja, con relación al grupo control (Dermata-Gatsi, et al., 2016).

En otro estudio, usando también esporozoítos de cepas *knock out* del gen en *P. berguei* (nombrado HRF $\Delta$ 1), se señaló una infección del 40-50% de los ratones inoculados con la cepa *knock out*, de los cuales solo el 10% desarrolló signos neurológicos, en comparación con una infección del 100% de los ratones inoculados con cepas silvestres, de los cuales todos presentaron signos neurológicos. Además de una carga parasitaria 2.5 veces menor en los animales infectados con *P. berguei* HRF $\Delta$ 1 y, una diferencia en la concentración de IL-6 y el número de células B, siendo mayor en los animales infectados con *P. berguei* HRF $\Delta$ 1 (Mathieu, et al., 2015).

Calderón-Pérez y colaboradores (2014) incubaron *TCTP* humana (nombrada *HsTCTP*) y de *P. falciparum* (nombrada *PfTCTP*) con células B de ratones. En las células B incubadas con *PfTCTP* se reportó una menor proliferación de estas células en comparación con las células incubadas con *HsTCTP*, pero al medir la incorporación de *TCTP* dentro de las células, fue mayor en las incubadas con *PfTCT*, siendo estas principalmente células apoptóticas a diferencia de las incubadas con *HsTCTP* que eran células principalmente en la fase G1 del ciclo celular (Calderón-Pérez, et al., 2014).

## 2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE *BABESIA* SPP.

*Babesia* es un género de parásitos protozoarios del *phylum* Apicomplexa. Estos parásitos son transmitidos por garrapatas y tienen un impacto mundial tanto económico como veterinario. Las especies *B. bovis* y *B. ovis* fueron descritas por V. Babeş en 1888 y 1892, respectivamente, mientras que *B. bigemina* fue descrita por primera vez por Smith y Kilborne en 1893 (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen, & Morrison, 2012). *Babesia* spp es un protozoario se encuentra dentro de los eritrocitos de los vertebrados hospederos y en el intestino de las garrapatas que lo transmiten (Ahmed, 2002).

Existen diferentes especies de *Babesia* con diferentes tamaños, vectores y distribución, que afectan a diferentes hospederos (cuadro 1). Sin embargo, el cambio climático y el calentamiento mundial han modificado y extendido las áreas de distribución de los vectores y de las garrapatas (de Waal & Combrink, 2006). Las especies más comunes y relevantes económicamente que infectan a los bovinos son *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen, & Morrison, 2012; Gohil, Herrmann, Günther, & Cooke, 2013).

Cuadro 1. Especies de *Babesia* más comunes en bovinos (adaptado de Kuttler, 2018)

Especies de <i>Babesia</i>	Tamaño largo/ancho ( $\mu\text{m}$ )	Principales vectores	Distribución
<i>B. bigemina</i>	4.5 x 2 $\mu\text{m}$	<i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>R. microplus</i> , <i>B. geigy</i>	América, Europa del sur, África, Asia, Australia
<i>B. bovis</i>	2 x 1.5 $\mu\text{m}$	<i>R. annulatus</i> , <i>R. microplus</i> , <i>B. geigy</i> , <i>Ixodes ricinus</i>	América, Europa del sur, África, Asia, Australia
<i>B. major</i>	2.6-3.7 x 1.5 $\mu\text{m}$	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Europa y norte de África
<i>B. divergens</i>	1.5-2 x .4 $\mu\text{m}$	<i>Ixodes ricinus</i>	Norte de Europa
<i>B. jakimovi</i>	4.5 x 2 $\mu\text{m}$	<i>Ixodes ricinus</i>	Siberia y norte de Rusia
<i>B. ovata</i>	3.2 x 1.7 $\mu\text{m}$	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Japón
<i>B. occultans</i>	2.9 x 1.2 $\mu\text{m}$	<i>Hyalomma m. rufipes</i>	Sur de África

*B. bovis* causa una enfermedad con mayor virulencia y mortalidad, causando la acumulación de eritrocitos parasitados en capilares, principalmente de riñón, pulmón y cerebro generando babesiosis cerebral y problemas respiratorios los cuales no responden al tratamiento, al igual que una parasitemia baja, lo cual dificulta el diagnóstico (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004).

### 2.2.1 Genoma

El tamaño del genoma de *Babesia bovis* es de 8.2 Mbp con 4 cromosomas (Jones, Lew, Jorgensen, & Barker, 1997; Brayton, et al., 2007; Barbet, 2009); de similar tamaño a *Theileria* spp y características estructurales muy similares a *Theileria parva*. El genoma fue secuenciado en 2007 por un grupo de investigadores de EE. UU y Reino Unido con el objetivo de facilitar el



descubrimiento de un antígeno vacunal y permitir compararlo con otros parásitos del filo Apicomplexa (Cuadro 2) (Brayton, et al., 2007).

Cuadro 2. Características del Genoma de *B. bovis*, *T. parva* y *P. falciparum* (traducido de Brayton, et al., 2007).

Características	Especies		
	<i>P. falciparum</i>	<i>T. parva</i>	<i>B. bovis</i>
Tamaño (Mbp)	22.8	8.3	8.2
Número de cromosomas	14	4	4
Composición total G+C (%)	19.3	34.1	41.8
Tamaño del genoma del apicoplasto (kpb)	35	39.5	33
Tamaño del genoma mitocondrial (kbp)	6 linear	6 linear	6 linear
Número de genes de codificación de proteínas nucleares	5 268	4 035	3 671
Longitud media del gen de codificación de proteínas (bp) <sup>a</sup>	2 283	1 407	1 514
Porcentaje de genes con intrones	53.9	73.6	61.5
Longitud media de la región intergénica (bp)	1 694	405	589
Composición G+C en región intergénica	13.8	26.2	37
Composición G+C en exones (%)	23.7	37.6	44
Composición G+C en intrones (%)	13.6	25.4	35.9
Porcentaje de codificación	52.6	68.4	70.2
Densidad de genes <sup>b</sup>	4 338	2 057	2 228
<sup>a</sup> No incluye intrones			
<sup>b</sup> Tamaño del genoma/ número de genes codificantes a proteínas			

El conocimiento del genoma de estas y otras especies, en conjunto con nuevas herramientas de investigación genómica, transcriptómica y proteómica han permitido comprender mejor el parásito y proporciona nuevas líneas de investigación para desarrollar nuevas vacunas contra este parásito (Suarez & Noh, 2011).

### 2.2.2 Ciclo biológico de *B. bovis*

*B. bovis*, como el resto de las especies de *Babesia* es transmitido por diferentes géneros de garrapatas, dependiendo de la zona geográfica y las condiciones climáticas de la zona. En México, *B. bovis* es transmitida por

garrapatas *Rhipicephalus microplus* las cuales se encuentran en zonas tropicales y subtropicales del país, presentes en el 65.96% del territorio nacional (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004; Gohil, Herrmann, Günther, & Cooke, 2013; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).

El ciclo de vida de *B. bovis* se caracteriza por tener una fase sexual, dentro de la garrapata y una asexual dentro del huésped vertebrado; siendo la célula blanco los eritrocitos de bovinos (Chauvin, Moreu, Bonnet, Plantard, & Malandrin, 2009). Los esporozoítos de *B. bovis* entran al huésped en la saliva de la larva de la garrapata *R. microplus* infectada al alimentarse (Suarez & Noh, 2011), invaden a los eritrocitos con la participación de antígenos de superficie del merozoíto 1 y 2 (MSA-1, MSA-2) y proteínas asociadas a roptrias 1 (RAP 1) (Mosqueda, McElwain, & Palmer, 2002; Mosqueda J., McElwain, Stiller, & Palmer, 2002); donde se dividen asexualmente formando trofozoítos y después merozoítos, rompiendo los eritrocitos para liberarse. La fase sexual de la *Babesia* spp. inicia cuando los merozoítos son ingeridos por una garrapata cuando esta se alimenta de sangre infectada, los merozoítos se desarrollan en gametocitos (femenino y masculino) los cuales se fusionan para generar cigotos que invaden las células del intestino de las garrapatas; los cigotos se transforman en quinetos los cuales migran por hemolinfa hacia los ovarios e invaden los huevos (transmisión transovárica). Cuando la larva nace, los quinetos migran e invaden la glándula salival de las larvas donde se convierten en esporontes de los cuales salen cientos de esporozoítos que son liberados en la saliva de la larva (Suarez & Noh, 2011).

### 2.3 BABESIOSIS POR *B. BOVIS*

Es una enfermedad causada por *Babesia bovis* infectan a un gran número de animales domésticos, salvajes y al hombre, de distribución mundial; es parásito es transmitido por garrapatas. La infección por *B. bovis* desarrolla una enfermedad en bovinos con alta mortalidad, es la especie más virulenta que afecta al ganado (Brown & Palmer, 1999).

Tiene un periodo de incubación entre 6 y 12 días, presentándose el pico de la parasitemia y los signos clínicos entre 3 a 5 días después de la infección (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004). Los principales signos clínicos son anemia hemolítica progresiva, la cual contribuye a prolongar la enfermedad en casos crónicos (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004), fiebre, anorexia, caquexia, hemoglobinuria, letargia, taquicardia e ictericia. Los signos severos se manifiestan cuando los eritrocitos parasitados se adhieren en los capilares de cerebro, pulmones y riñones resultando en una baja parasitemia periférica, babesiosis cerebral, problemas renales e infiltración de neutrófilos en los capilares pulmonares, edema, convulsiones, hiperestesia, parálisis y muerte (Brown & Palmer, 1999; Suarez & Noh, 2011). Entre las lesiones se han descrito la presencia de esplenomegalia, hepatomegalia, vesícula biliar distendida, riñones congestionados, anemia generalizada, ictericia y edema pulmonar, ocasionalmente (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004). La Babesiosis causada por *B. bovis* causa alta mortalidad en adultos, pero los becerros menores a un año son más resistentes (Suarez & Noh, 2011).

### 2.3.1 Mecanismos de infección.

Algunos patógenos como *Babesia bovis* y *Plasmodium falciparum* tienen la habilidad para evadir el sistema inmune del hospedador, asegurando la supervivencia del parásito y causando una enfermedad persistente (Suarez & Noh, 2011; Mathieu, et al., 2015). Esto se debe a que, *B. bovis*, expresa el antígeno de superficie VESA (antígenos variante de superficie de eritrocito) causando cambios antigénicos y morfológicos en la superficie de los eritrocitos parasitados con una rápida variación (O'Connor R. , Lane, Stroup, & Allred, 1997; Curnow, 1968), permitiendo mecanismos de persistencia como la cito adhesión, la rápida variación del ligando adhesivo en *B. bovis* y una diversidad genética en diversas proteínas en la etapa de merozoíto que permite el secuestro de los eritrocitos parasitados en los capilares, cerebrales y pulmonares principalmente, evitando el paso por el bazo

y por lo tanto su fagocitosis por los macrófagos en bazo, y evadiendo el sistema inmune (Barbet, 2009; Suarez & Noh, 2011; O'Connor R. , Lane, Stroup, & Allred, 1997).

### 2.3.2 Respuesta inmunitaria

La respuesta inmunitaria en los bovinos a la infección de parásitos intra eritrocíticos como *B. bovis* involucra mecanismos humorales y celulares (James, 1988; Ahmed, 2002).

Los monocitos activados, macrófagos, neutrófilos y células NK proveen la primera línea de defensa durante una infección por *B. bovis*. Los monocitos derivados de macrófagos activados por *B. bovis* tienen una mayor actividad fagocítica, expresan más receptores de anticuerpos, tienen una mayor producción de mediadores citotóxicos y expresan niveles elevados de citocinas inflamatorias, los cuales son importantes para estimular la inmunidad innata y adquirida contra patógenos protozoarios; además activan las células NK (Brown & Palmer, 1999; Shoda, et al., 2000; Ahmed, 2002).

Los macrófagos activados por el parásito producen citocinas pro inflamatorias como intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y oxígeno (ROI), IFN- $\alpha$ , IL-12, IL-8, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) y radicales de oxígeno y nitrógeno (RNI y RNO); los cuales promueven la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD4+. El INF- $\gamma$  es requerido para la activación de macrófagos y para potenciar la respuesta de anticuerpos IgG2 opsonizantes; el NO puede reducir la viabilidad de *B. bovis*. Las células T CD4+ también producen IL-4 que estimula la producción de IgG1, los cuales son importantes en la respuesta inmune (Brown & Palmer, 1999; Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004). Sin embargo, la sobreproducción de citocinas pro inflamatorias como TNF- $\alpha$  puede causar patologías severas como la babesiosis cerebral y los problemas respiratorios seguidas de la muerte (Brown & Palmer, 1999).

Las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos, fagocitan a los eritrocitos infectados y presentan los péptidos del parásito a las células T CD4+, estas producen IFN- $\gamma$  que participa en la activación de monocitos y macrófagos para aumentar la fagocitosis y la producción de NO (Ahmed, 2002). También se ha reportado que los eritrocitos infectados por *B. bovis* inducen la producción de TNF- $\alpha$ , potenciado por IFN- $\gamma$ , e induce regulación positiva transcripcional de IL-12 p40 e IL-12 p35, sin importar la presencia o ausencia de IFN- $\gamma$ . El tiempo y nivel de producción de estas moléculas determinará el resultado de la infección; pero la resolución de una infección aguda dependerá de la muerte de los parásitos por macrófagos activados, lo que conduce a la recuperación de la enfermedad aguda y una infección persistente (Shoda, et al., 2000; Brown & Palmer, 1999; Ahmed, 2002). Cuando los bovinos se recuperan de una infección aguda, ya sea naturalmente o con tratamiento, los bovinos permanecen como portadores, persistentemente infectados de manera prolongada, siendo resistentes a futuras infecciones de la misma cepa (Brown & Palmer, 1999).

La inmunidad adquirida, ya sea por infección o inmunización, depende de las células Th y de los anticuerpos. Las células Th proporcionan las citocinas necesarias para la producción de isotipos de inmunoglobulinas de alta afinidad y para la activación de macrófagos. La proliferación de las células mononucleares en sangre periférica, en respuesta a una nueva infección, son más altas en comparación a la de un bovino sin exposición previa al parásito; esto provocará una respuesta inflamatoria, con una respuesta con IgG opsonizante y fijación del complemento (Brown & Palmer, 1999). La actividad citotóxica mediada por anticuerpos de las células mononucleares es importante para la resolución de la infección, ya que estos actúan como opsoninas para los macrófagos activados (Goff, Warner, & Craig, 1984; Brown & Palmer, 1999). Es por esto que las vacunas se deben dirigir a epítopos específicos para estimular a las células T CD4+ de memoria, productoras de IFN- $\gamma$  y, a los macrófagos para producir IFN I (Brown & Palmer, 1999) (Figura 6).

Se han reportado diferencias importantes en la respuesta que producen los becerros y adultos. Los becerros poseen una fuerte inmunidad innata contra la infección de *B. bovis*, la respuesta es Th1 con una producción temprana de interleucina 12 (IL-12) e interferón gama (IFN- $\gamma$ ), con una expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS); también hay una recuperación del número de linfocitos circulantes, siendo la inmunidad innata suficiente para controlar la infección en los becerros. Los bovinos adultos expresan IL-10 (que estimula la producción de inmunoglobulinas); pero mientras en los becerros los niveles de leucocitos retorna a niveles normales, en los adultos estos niveles continúan disminuyendo hasta que el animal muere. (Goff, et al., 2001).

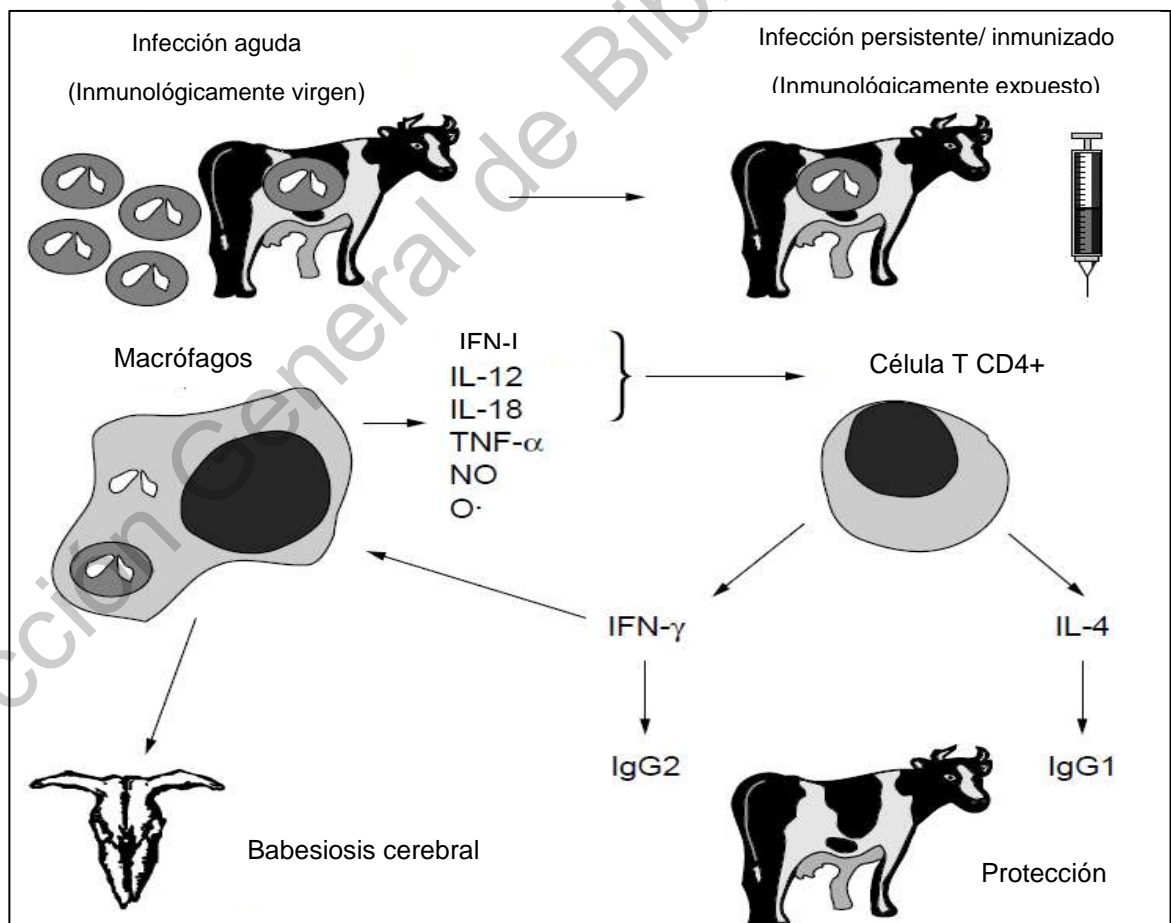


Figura 6. Mecanismos de inmunidad innata y adquirida frente a *B. bovis*. Traducida de Brown, 1999.

### 2.3.3 Impacto económico de la babesiosis bovina

La importancia del impacto económico de la babesiosis bovina depende de las circunstancias, condiciones climáticas y principalmente a la susceptibilidad a la infección por garrapatas en el ganado de la región (Jongejan & Uilenberg, 2004). Se debe de considerar el costo por pérdidas animales, pérdidas de genética, abortos, tratamientos, control, disminución en la producción cárnica y láctea y, la restricción de exportación de animales; además se debe considerar que el daño causado por la mordedura de la garrapata deprecia el valor de las pieles para la manufactura de cuero (Jongejan & Uilenberg, 2004).

En México, la babesiosis es una de las enfermedades que causan mayores problemas económicos a los productores de ganado en las regiones tropicales; se estima que el 66% del territorio nacional está infestado con *R. microplus*, por lo que todos los bovinos de esta zona están expuestos a sufrir babesiosis por *B. bovis* y/o *B. bigemina* (Alvarez, et al., 2004; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020). Rodríguez Vivas y colaboradores analizaron el potencial impacto económico causada por la garrapata *R. microplus* considerando el número total de animales en riesgo, posibles efectos dañinos del parasitismo sobre la producción de leche y ganancia de peso, basándose en el rendimiento de animales no tratados; estimó una pérdida de 68,878,694.00 dólares en el ganado lechero y una pérdida potencial total de 573'608,076 dólares, sin embargo este estudio no incluyó el costo de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Rodríguez-Vivas, et al., 2017).

Se han calculado importantes pérdidas económicas generadas por la babesiosis y anaplasmosis en áreas tropicales y subtropicales del mundo; en 1999 se calculó que los costos en pérdidas y en medidas de control de babesiosis y anaplasmosis bovinas eran aproximadamente 16.9 millones de dólares estadounidenses en Australia; además estimaron pérdidas entre los 0.6 y 57.2 millones de dólares estadounidense en diversos países de África y Asia. Sin embargo, en México no es posible hacer un cálculo estimado debido a la falta de

datos epidemiológicos, como número de casos, número de abortos por babesiosis, mortalidad, etc. (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004; Rodríguez-Vivas, et al., 2017).

#### 2.3.4 Control de la babesiosis

Se ha considerado que el protocolo más eficiente en relación costo-beneficio debe incluir el uso de vacunas, manejo de garrapatas, quimioprofilaxis y la rotación de praderas en pastoreo (Suarez & Noh, 2011; de Waal & Combrink, 2006). Incluso se ha planteado la posibilidad de complementarlo con el uso de hongos entomopatógenos (Fernández-Salas, Rodríguez-Vivas, & Alonso-Díaz, 2012).

Para el control de estos parásitos, se han utilizado principalmente vacunas basadas en parásitos vivos atenuados, de las cuales se han sugerido grados variables de protección (Suarez & Noh, 2011) y el control de la garrapata usando acaricidas (de Waal & Combrink, 2006). Sin embargo, los acaricidas son tóxicos, dejan residuos en leche y carne, causan contaminación ambiental; además del incremento de la resistencia a los acaricidas de las garrapatas (Jongejan & Uilenberg, 2004), el alto costo y el arduo trabajo (Jongejan & Uilenberg, 2004; de Waal & Combrink, 2006).

Se han desarrollado diversos tipos de vacunas contra *Babesia* spp, las vacunas vivas tienen diversos inconvenientes como el mantenimiento de la cadena fría, una vida útil corta, la potencial contaminación y reversión de la virulencia (Fish, Leibovich, Krigel, McElwain, & Shkap, 2008). Se intentó producir una vacuna utilizando sangre de animales recuperados tratando de simular la estabilidad endémica, sin embargo estas presentaron una infectividad variable y alta virulencia (de Waal & Combrink, 2006). En Irlanda se probó una vacuna viva contra *B. bigemina* de sangre completa de jerbos, pero fue cesada su producción en 2002 porque se consideró insegura (Bock, Jackson, Vos, & Jorgesen, 2004).



Se ha realizado estudios con cepas atenuadas de *Babesia* spp por pasajes rápidos y en serie de cepas virulentas (Suarez & Noh, 2011). En Sudáfrica se desarrolló una vacuna viva bivalente (con cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina*) congelada para bovinos de 9 meses de edad, con bajo costo de producción y larga vida útil; generando, después de una aplicación, una inmunidad protectora de 16 meses contra *B. bigemina* y 3 años para *B. bovis*, sin embargo al ser una vacuna atenuada existe el riesgo de reversión de la virulencia en animales susceptibles o mayores (de Waal & Combrink, 2006). También se desarrolló en Austria, en el Instituto Federal Austriaco para el Control de Enfermedades Infecciosas en Animales, una vacuna inactivada con parásitos intraeritrocíticos, inactivados por formalina, reportando altos títulos de anticuerpos, con una disminución de los signos clínicos y parasitemia, evitando así el tratamiento. A pesar de esto la vacuna fue descontinuada por considerarse peligrosa (Edelhofer, Kanout, Schuh, & Kutzer, 1998).

En México se ha usado un inmunógeno mixto compuesto por antígenos parasitarios solubles, usado dos cepas atenuadas de *B. bovis* (cepa BOR) y *B. bigemina* (cepa BIS) derivadas de cultivo *in vitro* como inmunógeno obteniendo del 100 al 70% de protección contra estas dos especies de *Babesia*, variando según el lugar de desafío sin importar si el inmunógeno se usa congelado o fresco (Cantó Alarcón, et al., 2003; Cantó A., et al., 2003; Alvarez, et al., 2004).

La quimioprofilaxis se ha usado como protección de corta duración usando Dipropionato de Imidocarb en diferentes dosis, principalmente frente a brotes (de Waal & Combrink, 2006) o dentro de un protocolo junto con vacunación (Taylor & Mc-herdy, 1979). Pero, se ha reportado la resistencia experimental inducida de *B. bovis* (Rodriguez & Tress, 1996) además se ha asociado a problemas de residuos en alimentos (Mdachi, Murilla, Omukuba, & Cagnolati, 1995).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad presente en todo el mundo, ocasionada por parásitos del género *Babesia*. En México, es causada por *Babesia bovis* y *B. bigemina*, sin embargo *B. bovis* presenta una mayor virulencia y tasa de mortalidad en comparación con otras especies de *Babesia*, lo que ocasiona la pérdida de animales con alto valor genético. Es importante buscar medidas para reducir los signos en animales infectados.

A pesar de que la babesiosis es una enfermedad tratable, muchas veces el diagnóstico no es preciso debido a que no presenta signos específicos, generando un fuerte impacto económico en zonas endémicas considerando los costos del tratamiento, atención médica veterinaria, los productos garrapaticidas, el deterioro de las pieles y las barreras para la exportación de los bovinos; sumándole la posibilidad de resistencia de los garrapaticidas y los tratamientos anti *Babesia*. Debido a esto se ha impulsado en desarrollo de nuevos métodos para la prevención. Se han trabajado con diversos tipos de vacunas, principalmente vacunas vivas atenuadas, éstas han mostrado resultados favorables. Sin embargo, éstas tienen un alto costo de producción, con riesgos de contaminación y reversión de la virulencia, un corto tiempo de anaquel y especificaciones especiales para el mantenimiento de la cadena fría. Las vacunas recombinantes son una opción sustentable para controlar la enfermedad.

La secuenciación de los genomas de diferentes organismos junto con el desarrollo de nuevas técnicas de genómica, bioinformática y biología celular han permitido nuevas investigaciones que generen un mejor entendimiento de la biología, la respuesta inmune y el ciclo de vida de diversos organismos, que han permitido investigaciones en nuevas vacunas; pero es necesario seguir investigando a nivel molecular para identificar los diferentes mecanismos moleculares, funciones de las proteínas y señalizaciones involucradas en los estadios del parásito. La *TCTP* es una proteína que ha sido estudiada en diferentes

especies de *Plasmodium* (organismos del filo Apicomplexa), postulado la participación de esta proteína en el establecimiento de la parasitemia bloqueando el sistema inmune del hospedador. En *B. bovis* esta proteína no había sido caracterizada, sin embargo debido a que también pertenece al filo Apicomplexa, es probable que también exprese la TCTP; por lo que es necesario investigar y evaluar su participación en el establecimiento de la infección; además del uso de las herramientas de genómica comparativa, como las búsquedas Blast, que facilitan la identificación de genes que codifican a proteínas de interés que ya han sido identificados en otros Apicomplexa y por lo tanto, la identificación de candidatos de antígenos vacunales.

#### 4. HIPÓTESIS

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (*TCTP*) se expresa en *Babesia bovis* y participa en el establecimiento y mantenimiento de la infección.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la TCTP y su participación en la infección de *Babesia bovis*.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar el gen que codifica a la TCTP de *B. bovis*.
- II. Comprobar la expresión y transcripción del gen de *tctp* de *B. bovis*.
- III. Evaluar el efecto de los anticuerpos contra la TCTP de *B. bovis* en el establecimiento de la infección.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas y en el campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### 6.1 OBTENCIÓN DE CEPAS VIVAS DE *B. BOVIS*

#### 6.1.1 Obtención de garrapatas

Se obtuvieron garrapatas repletas de unidades de producción bovinas de diferentes estados de la república mexicana, positivas a la infección por *B. bovis*.

- Nayarit
  - Sitio experimental El Verdineño, INIFAP, Municipio de Compostela.
- Veracruz
  - Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, municipio de Tlapacoyan.
- Puebla
  - Santa Cruz, Hueltamalco
  - Buena vista, Ayotaxco de Guerrero
  - El Paraíso, Ayotaxco de Guerrero
- Jalisco
  - Municipio de Puerto Vallarta
- Querétaro
  - Municipio de Arroyo Seco

### 6.1.2 Lavado de garrapatas

1. Se colocaron las garrapatas en una coladera de plástico bajo el chorro de agua hasta que no hubiera tierra o algún otro contaminante.
2. Se desinfectaron con cloruro de benzalconio al 10% por 10 minutos.
3. Se colocaron en toallas de papel para secarlas y, una vez que estuvieron secas, se pusieron en cajas Petri con 20 garrapatas cada una, etiquetadas con el lugar de origen y la fecha de recolección.
4. Se colocaron en incubadora a 25°C con 70% de humedad.

#### 6.1.2.1 Extracción de hemolinfa

Se registró como día 0 cuando las garrapatas en incubación comenzaron a depositar los huevos y se obtuvieron muestras de hemolinfa los días 5 y 7 post ovoposición. Para ello:

1. Se prepararon portaobjetos con 8 círculos cada uno marcados con un lápiz de punta diamante.
2. Se tomó cada garrapata se limpió con etanol al 70% y toallas de papel, usando una tijera fina se cortó entre el tarso y metatarso de una pata y se colocó la gota de hemolinfa en el círculo correspondiente de la laminilla.
3. Una vez completada la laminilla se fijó en etanol sumergiéndola en una Caja Coplin por 30 segundos.
4. Se tiñeron las laminillas usando colorantes para tinción policroma rápida de frotis (Hemocrom®), para la observación de quinetos.

#### 6.1.3 Extracción de ADN.

Se extrajo ADN genómico de huevos, larvas, garrapatas adultas, sangre infectada y papel filtro de celulosa, de diferentes procedencias (cuadro 3), siguiendo los protocolos adecuados para cada caso.

Cuadro 3. Relación del tipo de muestras con el lugar de procedencia.

Precedencia/ Muestra	Huevos, larvas y garrapatas <i>R. microplus</i>	Sangre de bovinos	ADN
Nayarit	X	X	
Veracruz	X	X	
Puebla	X		X
Jalisco	X		
Querétaro	X		
Michoacán		X	
Colima		X	
Zacatecas		X	
Chiapas		X	
Tamaulipas	X		
Trinidad y Tobago			X
EUA (cepa T2Bo)			X

#### 6.1.3.1 Extracción de ADN de larvas y garrapatas.

Se extrajo ADN genómico de larvas y garrapatas usando el Kit de extracción DNeasy Blood & Tissue® No.69506, Qiagen® con rendimiento declarado por el fabricante de 6 µg/30 µg, siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se limpió todo el material con etanol, además el personal involucrado utilizó guantes y cubre bocas.
2. Las larvas y garrapatas se separaron en un tubo y se pusieron en congelación (-20 °C).
3. Los morteros de porcelana con pistilo se refrigeraron por 5 minutos a -20°C, previo a su utilización.
4. Fuera del refrigerador, se colocaron las larvas o garrapatas en los morteros, con nitrógeno líquido y se maceraron con el pistilo.
5. Se les agregó 180 µl de Buffer ATL, 20 µl de proteinasa K incluida en el kit y, 200 µl de RBC, se maceró y después se mezcló en agitador vórtex a temperatura ambiente.
6. Se dejó incubar a 55°C 3 horas con agitación a 400 rpm o toda la noche



7. Se homogenizó por inversión 4 veces y se centrifugó a 2500 rpm/2 min.
8. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo.
9. Se le agregó 200 µl de Buffer ALT, se puso en un agitador vórtex a temperatura ambiente por 10 segundos y se dejó incubar a 70°C por 10 minutos.
10. Se le agregaron 200 µl de etanol grado biología molecular y, se mezcló por inversión.
11. Esta solución se pasó a las columnas de filtración, provistas por el fabricante, y se centrifugó a 8 000 rpm por 2 minutos o hasta que el líquido pasara totalmente.
12. Se desechó el tubo de colecta, se puso uno nuevo agregándose 500 µl de buffer AW y se centrifugó a 8 000 rpm por 2 min.
13. Se desechó el líquido que quedó en el tubo, se agregó a la columna 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó a 8 000 rpm por 2 minutos.
14. Se descartó el líquido de la columna y se centrifugó a 12 000 rpm por 2 min para secar la columna.
15. Se puso la columna en un tubo nuevo, se le agregó 100 µl de Buffer AE (buffer de elución), se incubó a 38°C/ 5 min y se centrifugó a 800 rpm/2 min.
16. Se incubó a 65°C/ 10 min para inactivar las ADNasas.
17. El eluido se guardó debidamente identificado a -20°C.
18. Se cuantificó por espectrofotómetro (NanoDrop)
19. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar la integridad del ADN extraído.

#### 6.1.3.2 Extracción de ADN de huevo de garrapata.

Se extrajo ADN de huevo ovopositados por garrapatas provenientes de Veracruz y Nayarit, usando el kit de extracción Dneasy Blood & Tissue kit (No. 69506, Qiagen):

1. Se limpiaron los morteros de porcelana con pistilo con etanol y se colocaron los huevos de las garrapatas que se lograron tomar con la punta de una espátula de madera, se le añadieron 180µl de buffer ALT, 20 µl de proteína K y 200µl de buffer de lisis; se pasó a un tubo cónico de 1.5 ml y se mezclaron en agitador vórtex por 1 minuto a temperatura ambiente. Se dejó incubar a 55°C por toda la noche.
2. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm/ 30 segundos y se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico de 1.5 ml estéril, se le agregó 200µl de buffer AL y se mezcla en agitador vórtex a temperatura ambiente por 1 minuto.
3. Los tubos se incubaron a 70°C por 10 minutos y, se agregó 200µl de etanol (96-100% biología molecular), se mezcló en agitador vórtex a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. El contenido se pasó a una columna con tubo colector, se centrifugó a 8 000 rpm/ 1 minuto, repitiendo la centrifugación en caso de que el sobrenadante no pasara la columna.
5. Se pasó la columna a un nuevo tubo colector, se agregó 500µl de buffer AW1 y centrifugó a 8 000 rpm/1 minuto.
6. Se pasó la columna a un nuevo tubo colector (desechando el anterior), se le agregó 500µl de buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm/1 min. Se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 12 000 rpm/ 2 min, para secar la columna.
7. Se transfirió la columna a un nuevo tubo cónico de 1.5 ml estéril se agregó 50µl de buffer AE (buffer de elución) en el centro de la columna, se dejó incubar a 37°C por 5 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm. Se agregaron otros 50µl de buffer AE, se dejó incubar a 37°C por 5 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm.
8. Se cuantificó por espectrofotómetro (NanoDrop)
9. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar la integridad del ADN extraído.
10. Se almacenó a -20°C.

### 6.1.3.3 Extracción de ADN en papel filtro de celulosa.

Se recibió, en colaboración con la Universidad de las Indias Occidentales de Trinidad y Tobago, una muestra de ADN de un aislado de *B. bovis* de este país en papel filtro de celulosa. Se extrajo del papel filtro de celulosa usando dos protocolos similares, buscando una mayor concentración de ADN.

#### Protocolo A

1. Se cortaron piezas de 0.5 x 0.5 cm del papel filtro con el ADN.
2. Cada pieza se colocó en un tubo cónico de 1.5 ml con 20 µl de agua libre de nucleasas y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se centrifugaron a 12 000 rpm/ 1 minuto.
4. Se realizó una electroforesis con gel de agarosa 1% para comprobar la extracción.
5. Se cuantificó la concentración de DNA por espectrofotómetro (Nanodrop).

#### Protocolo B

Para aumentar la concentración se ajustó el protocolo.

1. Se cortaron piezas de 0.5 x 0.5 cm de papel filtro con el ADN.
2. Cada pieza se colocó en un tubo cónico de 1.5 ml con 50 µl de agua libre de nucleasas y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Se retiró la pieza de papel filtro y se incubó en Termoblock© a 65°C por 10 minutos, para eliminar DNAsas.
4. Se repitió el paso 2 y 3 cuatro veces.
5. Se realizó una electroforesis con gel de agarosa 1% para comprobar la extracción.
6. Se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotómetro (Nanodrop).

#### 6.1.3.4 Extracción de ADN en sangre infectada.

Se extrajo ADN de sangre de bovinos congelada, proveniente de Zacatecas y Michoacán previamente identificados como positivos a *B. bovis*, se extrajo según las indicaciones del fabricante con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue kit (No. 69504), Quiagen:

1. Se colocaron de 50-100 µl de sangre infectada con anticoagulante en tubo cónico de 1.5 ml, se agregaron 20µl de proteinasa K y se ajustó el volumen a 220µl con *PBS*.
2. Se agregaron 200 µl de buffer AL, se mezcló en agitador vórtex, a temperatura ambiente por 15 segundos y se incubó a 56°C/10 min.
3. Se añadieron 200 µl de etanol grado biología molecular y se mezcló en un agitador vórtex por 15 segundos a temperatura ambiente.
4. La solución se transfirió a la columna incluida en el kit, se añadieron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó a 8 000 rpm/ 1 min. Se descartó el sobrenadante.
5. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección, se añadieron 500 µl de buffer AW2, se centrifugó a 14 000 rpm/ 3 min y se descartó el sobrenadante con el tubo de colección.
6. Se colocó la columna en un tubo cónico de 1.5 ml estéril, se añadieron 100 µl de buffer AE (buffer de elución) en el centro de la columna, se incubó a 37°C/5 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm/ 1 minuto. Se añadieron otros 100 µl de buffer AE en el centro de la columna y se repitieron los pasos.
7. Se cuantificó por espectrofotómetro (NanoDrop)
8. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar la integridad del ADN extraído.
9. Almacenar a -20°C.

#### 6.1.4 Diagnóstico de *Babesia bovis* y *bigemina* por PCR anidado.

El ADN extraído de las diferentes muestras fue analizado por PCR anidado para confirmar la presencia de ADN de *B. bovis* y/o *B. bigemina*. Se utilizaron los oligonucleótidos y el programa de termociclado planteado por Romero Salas y colaboradores. Las condiciones de termociclado de las amplificaciones de PCR punto final inicial incluyen con una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, un alineamiento de acuerdo a los oligonucleótidos de 52°C por 30 segundos y una extensión de 72 °C por 30 s; al final tuvo una extensión final de 72°C por 7 minutos. El programa de termociclado para el PCR anidado fue igual con la única diferencia en la temperatura de extensión de 54°C. (Romero-Salas, et al., 2016) (Figura 7 y 8).

Hemoparasite	Assay	Primer name	Primer sequence	Amplicon size (bp)
<i>B. bovis</i>	PCR	oBb.mit_F oBb.mit_R	TGAACAAAGCAGGTATCATAGG CCAAGGAGATTGTGATAATTCA	260
	nPCR	iBb.mit_F iBb.mit_R	TCCACGATCTGTGATACGTCA CAATCCTTTGCAACTCCAA	195
<i>B. bigemina</i>	PCR	oBbig.mit_F oBbig.mit_R	TCCAACACCAAATCCTCCTA CGTGGGTTTCGTTTTGTAT	394
	nPCR	iBbig.mit_F iBbig.mit_R	AAGAGATACCATATCAGGGAACCA TTGGGCACTTCGTTATTCC	250

Figura 7. Oligonucleótidos usados para la detección de DNA de *B. bovis* y *B. bigemina* con el tamaño de amplicón esperado (Romero-Salas, et al., 2016).

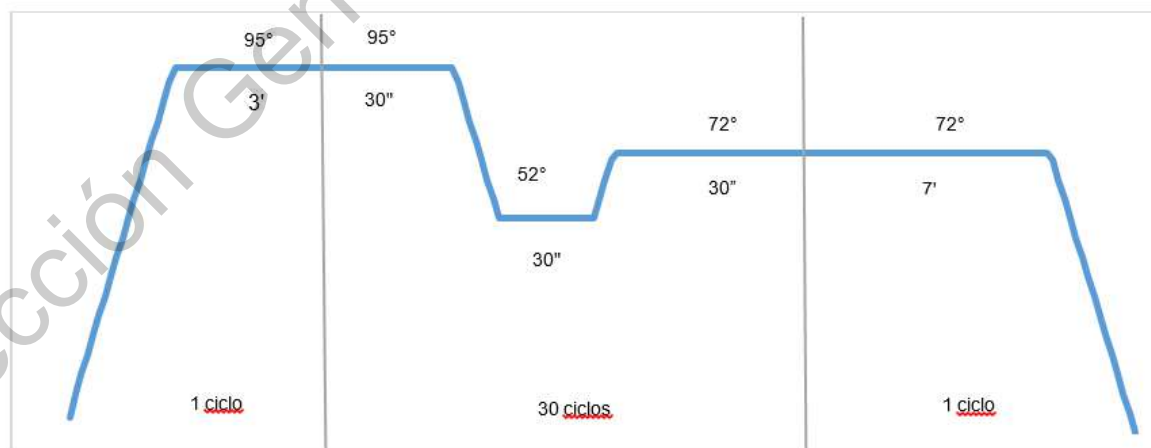


Figura 8. Programa de termociclado para la amplificación de *B. bovis* y *B. bigemina*.

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DEL GEN *TCTP* DE *B. BOVIS*

### 6.2.1 Identificación del gen de *tctp* de *B. bovis* por bioinformática.

Se identificó el gen de *tctp* en el genoma de *B. bovis* buscando genes ortólogos a través de homología en la secuencia de aminoácidos utilizando la base de datos del Centro Nacional Información Biotecnológica (*NCBI*, por sus siglas en inglés).

1. Se obtuvo la secuencia previamente reportada de *TCTP* de *Plasmodium falciparum* (No. de acceso GenBank 3P3K\_A).
2. Se realizó un alineamiento de la secuencia de nucleótidos de *TCTP* de *Plasmodium falciparum* y el genoma de *B. bovis*, utilizando BLAST.

### 6.2.2 Diseño de oligonucleótidos.

En la región identificada por BLAST del gen de *TCTP* en el genoma de *B. bovis* se diseñaron oligonucleótidos de acuerdo a los lineamientos específicos: tamaño (20 y 25 nucleótidos), temperatura de alineamiento (entre 50 y 65°C) considerando una temperatura similar de alineamiento entre ambos oligonucleótidos, contenido de guanina y citosina (40% guanina-60% citocinas), sin regiones repetidas de más de 3 bases iguales continuas, evitando auto complementariedad y estructuras secundarios, siendo necesarios que los oligonucleótidos sean idénticos y específicos a la secuencia de nucleótidos. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar el gen completo con intrones, estos oligonucleótidos se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 6.2.3 Estandarización de *PCR*.

Se amplificó el gen completo de *tctp* usando los oligonucleótidos previamente diseñados usando *PCR*. Se hizo programa para gradiente de temperatura en el alineamiento de 64°C a 55°C en reacciones de 12.5 µl con el ADN extraído de Sta. Cruz, Puebla y de Zacatecas y un control negativo (figura 9).

Se realizó un gel de agarosa al 1% para electroforesis, para visualizar el amplicón esperado.



Figura 9. Programa de termociclado para la amplificación del gen de *tctp* en *B. bovis* con gradiente en la temperatura de alineamiento para estandarización.

#### 6.2.4 Amplificación del gen de *tctp* por PCR.

Con base en los resultados de la sección 6.2.3, se amplificó el gen de *tctp* en los ADN extraídos de Michoacán, la cepa de referencia T2Bo, Zacatecas, Trinidad & Tobago, Tepic y Santa cruz (Puebla), con el siguiente programa de termociclado: inicia con una desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, a continuación 35 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 30 s, un alineamiento a 56°C por 30 s y una extensión a 72°C por 1 min; al final se dejó una extensión

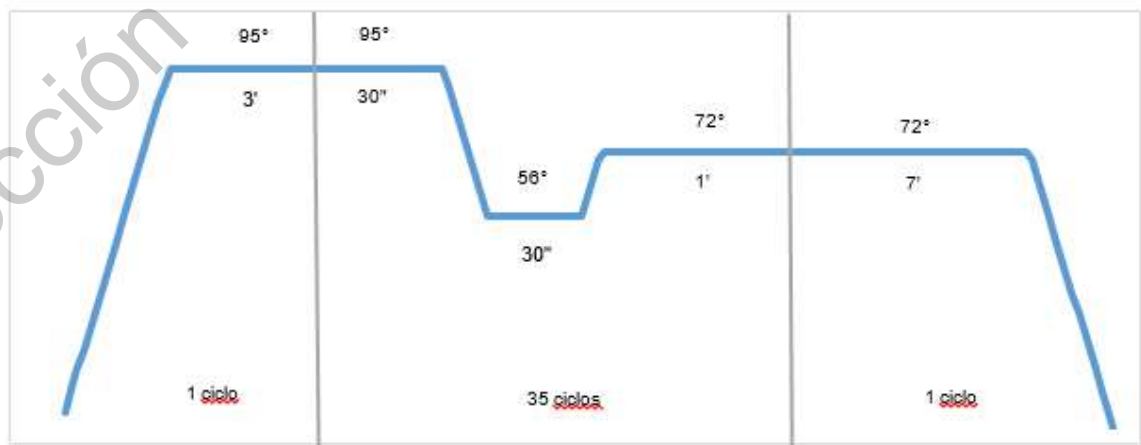


Figura 10. Programa de termociclado para la amplificación del gen de *tctp* en *B. bovis*

final de 72°C por 7 minutos (figura 10). Se realizó un gel de agarosa al 1% para electroforesis, para visualizar el amplicón esperado.

#### 6.2.5 Clonación del gen de *tctp* de diferentes aislados en TOPO TA cloning®

Se clonó el gen de *tctp* del ADN de *B. bovis* de Zacatecas, Tepic, la cepa de referencia T2Bo y Michoacán, según este protocolo:

1. Se realizó un PCR previo de la secuencia a clonar del DNA específico, para asegurarse que la secuencia está en la muestra
2. Se hicieron dos reacciones de PCR con los oligonucleótidos de la secuencia de interés de 50 µl cada una, con un control negativo de 10 µl
3. Se hizo un gel de agarosa al 1% en electroforesis, para confirmar que la secuencia esperada se amplificó.
4. Si el gel de PCR mostró que se amplificó el gen esperado, se hace un gel grueso de agarosa al 1% para electroforesis poniendo todo el producto del PCR (50 µl) con buffer de carga. Se ubicó la banda en el lugar esperado y se cortó la banda para purificar.
5. Se purificó la banda del gel con kit "*Molecular biology kit ez-10 spin column DNA gel extraction miniprep kit®, BioBasic*", siguiendo las instrucciones del fabricante:
  - a. Cortar la banda deseada con una navaja de bisturí, usando la placa y poniendo foto protector solar las manos y guantes. Poner en un tubo de 1.5 ml estéril.
  - b. Pesar el gel y agregar 400 µl de buffer de unión (*buffer binding*), proporcionado por el fabricante, por cada 100 mg del peso del gel, se incubó de 50 a 60°C por 10 minutos en agitación lenta por 10 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
  - c. Si después de la adición del buffer la mezcla es observa amarilla, indica que se obtuvo un pH óptimo y se puede continuar con el resto de los pasos. Si la mezcla se torna azul o morada es necesario ajustar



- el pH usando 3 M de acetato de sodio (pH 5) hasta obtener la coloración amarilla (obtener el pH óptimo)
- d. Poner la mezcla en la columna a base geles de sílice EZ-10 las cuales retienen el ADN sin contaminantes, provistas por el fabricante y dejar por 2 minutos, centrifugar a 10 000 rpm/2 minutos y descartar el sobrenadante.
  - e. Añadir 750 µl de la solución de lavado y centrifugar a 10 000 rpm/ 1 min, descartar la solución en el tubo.
  - f. Repetir el paso y centrifugar una vez más a 10 000 rpm/1 min para remover residuos del buffer de carga
  - g. Poner la columna en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml y añadir de 30-50 µl de buffer de elución en el centro de la columna e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos para eluir el ADN. Se puede incubar de 37° a 55° para incrementar la concentración).
6. Una fracción del ADN eluido se analizó en gel de agarosa al 1% para comprobar la correcta purificación.
  7. Se calculó la relación molar del inserto-vector (3:1), utilizando la herramienta bioinformática *Biomath Calculator*® (Promega corporation, 2020), para calcular la cantidad de inserto necesaria y así obtener un inserto adecuado.
  8. Se clonó el gen de tctp de *B. bovis* purificado, por medio de la tecnología TOPO TA Cloning® de Invitrogen®, el cual utiliza una con topoisomerasa I la cual permite una clonación rápida y eficiente para la inserción directa de productos de PCR amplificados con polimerasa Taq (Life Technologies, 2014):
    - a. Se puso en un tubo de 0.2 ml estéril:
      - i. Cantidad del purificado calculado en la relación inserto-vector
      - ii. 1 µl de sales
      - iii. 1 µl de vector/topoisomerasa mix
      - iv. Cbp de agua libre de nucleasas

- b. Se agitó suavemente e incubó en termociclador a 23°C por 30 min, cuando fue necesario se dejó a -20°C hasta que se continuó el protocolo (no más de una semana).
9. Para la transformación bacteriana se colocaron dos alícuotas de células *E. coli* competentes, previamente preparadas por el personal del laboratorio, en hielo por 30 min. Se agregó el producto de la clonación en campana de flujo laminar y se puso 30 s a 42°C, seguido por 5 minutos aproximadamente en hielo por 5 min. Después se agregaron, en campana de bioseguridad, 250 µl de SOC (medio enriquecido para bacterias calcio-competentes) y, se incubó a 37°C/ 1 hora sin agitación.
  10. El producto se puso en cajas de Petri con medio LB (Luria Berthani) con ampicilina (100 µg/ml) dentro de una campana de flujo laminar, con puntas estériles cerca de una lámpara de alcohol, dividido en 3 cajas Petri: 50 µl, 150 µl y el resto. Se esparcieron con asa de cristal en L hasta que el producto inoculado se secó y se incubaron por 12 horas a 37°C.
  11. A las colonias que crecieron en cada una de las cajas de Petri con medio LB se les realizó un PCR de colonia, utilizando el mismo programa que se utilizó para amplificar el gen de *TCTP* en *B. bovis*, añadiendo 2 minutos más en el tiempo de desnaturalización inicial. Además, cada una de las colonias analizadas se sembraron en una caja de Petri con medio LB.
  12. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el producto de los PCR de cada colonia, observándose que el tamaño del inserto tuviera el tamaño de banda esperado, según el amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para amplificar del gen de *tctp* de *B. bovis* (1199 pb). Se descartaron las clonas que presentan bandas diferentes a las esperadas.
  13. De las clonas donde se observó una banda del tamaño esperado se escogieron 4, se pusieron en tubos cónicos de 50 ml con caldo LB, que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de las colonias y un antibiótico (ampicilina a 100 µg/ml) y, se dejó en incubación con agitación

a 250 rpm 37°C/ 16 h de incubación junto con la placa de Petri con medio LB donde se sembraron las colonias.

14. Los tubos que se quedaron en incubación se observaron y los turbios se consideraron como positivos. Se extrajo ADN plasmídico con kit “*Illustra™ plasmidPred Mini Spin Kit 28-9042-69®*” de GE Healthcare®, para extraer y purificar el ADN plasmídico de las células competentes, según las instrucciones del fabricante.

15. Se hizo una electroforesis en gel agarosa para verificar el inserto.

16. Se mantuvo a -20°C hasta utilizarlo.

#### 6.2.6 Secuenciación del gen de *tctp* de las diferentes cepas.

El DNA plasmídico resultado de la clonación de los aislados de unidad de producción bovinas ubicadas en el estado de Zacatecas, Michoacán y en la ciudad de Tepic se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, se envió a codificar usando los oligonucleótidos específicos del gen de *tctp* en sentido delante y reversa y, los oligonucleótidos M13/pUC REVERSE (5´-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3´) y T7 PRIMER (5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3´).

#### 6.2.7 Análisis de la topología de la *TCTP*.

Para predecir y poder comparar la estructura y funciones de esta proteína, las secuencias obtenidas se compararon usando herramientas bioinformáticas. Se obtuvo una secuencia consenso y se analizó la topología de la proteína mediante diferentes herramientas bioinformáticas. Se analizó la secuencia para predecir la presencia de una región posible como péptido señal con SignalP-5.0 (Almagro Armenteros, et al., 2019), regiones transmembranales con TMHMM server 2.0 (Möller, Croning, & Apweiler, 2001) y dominios de proteínas con Pfam (El-Gebali, et al., 2019).

#### 6.2.7.1 Comparación de la secuencia de aminoácidos con la *TCTP* de otras especies.

Para identificar la similitud de la *TCTP* de *B. bovis* con *TCTP* de otras especies, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos con la herramienta bioinformática Clustal Omega (Madeira, et al., 2019) de la *TCTP* de *B. bovis* con la *TCTP* de *Bos Taurus* (NCBI, NP\_001014410.1) y la *TCTP* de *Bos indicus* (NCBI, XP\_019826794.1). También se hizo un alineamiento usando la misma múltiple con la herramienta bioinformática Clustal Omega (Madeira, et al., 2019) de la *TCTP* de *B. bovis* con la *TCTP* de *B. bigemina* (NCBI, XP\_012768057.1), para ver la similitud entre estos.

#### 6.2.7.2 Predicción de la estructura terciaria de la *TCTP* de *B. bovis*.

Se usó la herramienta bioinformática de modelado de homología de estructuras de proteínas Swiss Model Repository (Bienert, et al., 2017) para predecir la estructura tridimensional de *TCTP*. Partiendo de la secuencia obtenida de las cepas secuenciadas y, comparándose con la estructura tridimensional descrita en la *TCTP* de *P. falciparum* (Eichhorn, Winter, Büchele, & al, 2013).

#### 6.2.8 Predicción de péptidos con alta probabilidad de ser epítipo B.

Para predecir regiones con alta probabilidad de ser epítipos B se usaron programas de bioinformática. Estos programas predicen, a partir de bases de datos preexistentes, la posición de epítipos según las características de los aminoácidos; permitiendo identificar probables regiones hidrofílicas, flexibles, accesibles, giros, superficies expuestas, polares y con propensión antigénica. Se usó BCEpred (Saha & Raghava, BcdPred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physicochemical properties, 2004), Bepipred 2.0 (Jespersen, Peters, Nielsen, & Marcatili, 2017) e IEDB (Vita, et al., 2018). Las predicciones se

acomodaron en una hoja de datos Excel Microsoft Office® para identificar fácilmente las regiones con mayores predicciones de cada algoritmo.

A partir de las predicciones, se diseñaron en las regiones seleccionadas 4 péptidos entre 18 y 24 aminoácidos, nombrándolos Péptido *TCTP* I a IV. Se sintetizaron químicamente, 6 mg de cada péptido con la empresa Peptide 2.0 (Peptide 2.0, 2020), usando un formato *MAPS* 8 (péptidos antigénicos iguales lineales), donde se unen 8 péptidos unidos a un núcleo de lisina dándole a la molécula un mayor tamaño teniendo mayor probabilidad de producir altos títulos de anticuerpos (Ganesharo Joshi, Dighe, Thakuria, Malik, & Kumar, 2013).

### 6.3 EVALUACIÓN EL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TCTP DE *B. BOVIS* EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.

El manejo de los animales se hizo después de que el comité de bioética de la FCN, UAQ aprobó el protocolo (15FCN2019).

#### 6.3.1 Inmunizaciones con péptidos de *B. bovis* a conejos.

Para comprobar que los cuatro péptidos sintetizados generaran anticuerpos se inmunizaron conejos; para esto se solubilizaron cada uno de los péptidos en 100 µg/ml en *PBS* a una concentración final de 100 µg/ml. Cada péptido se preparó en una suspensión con 30% del péptido diluido en *PBS* y 70% del adyuvante Montanide ISA 71 VG® (Deville, Ben Arous, Bertrand, & Dupuis); emulsionando con un sonicador hasta observar micelas homogéneas en el microscopio (100x). Se prepararon 5 inmunógenos, uno por cada péptido más un control con *PBS* y adyuvante Montanide ISA 71 VG® y, se conservaron a 4°C hasta su uso.

1. Se utilizaron conejos raza Nueva Zelanda de 6 semanas de edad. Previo a cada inmunización se obtuvo 6 ml de sangre por punción en la arteria auricular de una oreja. La sangre se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, se separó el suero y se congeló a -20°C identificado con número de conejo y fecha de muestreo para posteriores pruebas.
2. Se inmunizaron 2 conejos por cada péptido con 1ml del inmunógeno preparado (100 µg/ml) dividido en dos inyecciones subcutáneas de 0.5 ml cada una, una alrededor de los linfonodos preescapulares y la otra alrededor de los linfonodos inguinales y dos conejos control inmunizados con Montanide ISA 71 VG al 70% con PBS al 30%, siguiendo la relación mostrada (cuadro 4).

Cuadro 4. Relación de los conejos inmunizados con el péptido utilizado.

No. Conejo	Péptido
2	Control negativo
6	Control negativo
7	TCTP IV
8	TCTP I
10	TCTP I
12	TCTP II
14	TCTP II
19	TCTP IV
20	TCTP III
22	TCTP III

3. Los conejos se inmunizaron cada 21 días por 5 ocasiones (Cuadro 5), al final se realizó una eutanasia a los conejos para la obtención final de sangre.

Cuadro 5. Calendario de inmunización y obtención de sangre de conejos.

Actividad	Fecha
Obtención sangre pre-inmunización	4 y 15/febrero/2020
Obtención de sangre pre-inmunización/ 1 <sup>a</sup> inmunización	28/ febrero/2020
Obtención de sangre 1 <sup>a</sup> inmunización/ 2 <sup>a</sup> inmunización	20/marzo/2020
Obtención de sangre 2 <sup>a</sup> inmunización/ 3 <sup>a</sup> inmunización	10/abril/2020
Obtención de sangre 3 <sup>a</sup> inmunización/ 4 <sup>a</sup> inmunización	1/mayo/2020
Obtención de sangre 3 <sup>a</sup> inmunización/ 4 <sup>a</sup> inmunización	22/mayo/2020
Obtención de sangre final/ eutanasia conejo	1/junio/2020

### 6.3.2 Inmunización de bovinos con los péptidos diseñados.

Se solubilizaron los péptidos II, III y IV en *PBS* (pH 7.4) en una concentración final de 60 µg/ml, de cada uno de los péptidos, en la misma suspensión. Los péptidos se prepararon en una suspensión con 30% de los péptidos diluidos en *PBS* y 70% del adyuvante Montanide ISA 71 VG® (Deville, Ben Arous, Bertrand, & Dupuis) emulsionando con sonicador cada uno hasta observar micelas homogéneas en el microscopio (100x). Se conservó a 4°C hasta su uso.

1. Se utilizaron 8 bovinos machos de alrededor 10 meses de edad, con diagnósticos previos negativos de *B. bovis*, *B. bigemina*, *Brucella* y tuberculosis. Se dividieron en 2 grupos; el grupo control, inmunizado con el *PBS* con adyuvante y, el grupo inmunizado con la mezcla de péptidos. Se obtuvo sangre antes de cada inmunización por punción en la yugular, obteniendo alrededor de 30 ml de sangre en tubos Vacutainer®, la cual se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, se separó el suero y se congeló a -20°C identificado con fecha y número del bovino para su uso en pruebas posteriores.

2. Se inmunizaron 4 bovinos en cada grupo. El grupo inmunizado se inmunizó con 1 ml de la mezcla de los péptidos II, III, y IV (180 µg/ml) dividido en dos inyecciones intramusculares de 0.5 ml cada una, alrededor de los linfonodos preescapulares e inguinales y, el grupo control se inmunizó con Montanide ISA 71 VG al 70% con PBS al 30%, siguiendo la relación mostrada (cuadro 6).

Cuadro 6. Relación de los becerros inmunizados con el inmunógeno utilizado

No. bovino	Péptido
7288	Control negativo
7280	
9631	
7281	
7294	TCTP
7289	
7279	
9648	

3. Ambos grupos de bovinos se inmunizaron cada 21 días en 3 ocasiones (Cuadro 7), tomando una muestra final de sangre previa al desafío

### 6.3.3 Desafío contra *B. bovis* en bovinos.

Para el desafío se activó una cepa de campo (procedente de Puebla) de *B. bovis* en eritrocitos lavados, crio preservada en nitrógeno líquido y transportada en nitrógeno líquido. Se limpió la zona con cloruro de benzalconio y se inoculó 1 ml intravenoso y 1 ml intramuscular a una becerro de 8 meses de edad esplenectomizada, proveniente del campus Amazcala de la FCN de la UAQ. Se le hizo un seguimiento por 9 días midiendo temperatura corporal, se obtuvo sangre de yugular con el que se midió el volumen celular aglomerado, por medio del



hematocrito y, se realizaron frotis sanguíneos de capilares hasta observar una parasitemia cuantificable.

Una vez que se obtuvo una parasitemia cuantificable se extrajeron 400 ml aproximadamente de sangre de esta becerria utilizando matraces con perlas de vidrio, agitando para separar la fibrina; previa limpieza y desinfección de la zona de punción. La sangre obtenida se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos a 4°C y se retiró el suero. Los eritrocitos obtenidos se lavaron con VYM (Vega, Buening, Green, & Carson, 1985), centrifugando a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C para quitar suero y la capa leucocitaria, suspendiendo al final en VYM a una proporción 50:50. Después se calculó el porcentaje de células infectadas contando el número de eritrocitos por microlitros usando una cámara de Neubauer y, contando el porcentaje de células infectadas en un frotis de los eritrocitos lavados teñidos con Giemsa. Se prepararon dosis infectivas con  $1 \times 10^8$  con eritrocitos lavados infectados con *B. bovis*.

Ambos grupos de bovinos se desafiaron 24 días después de la 3ª inmunización (Cuadro 6) con las dosis infectivas preparadas de eritrocitos lavados infectados y se aplicaron de forma intramuscular.

#### 6.3.4 Evaluación de la respuesta en los bovinos.

Una vez desafiados se realizó un examen físico diario a los bovinos midieron y registraron diariamente por 15 días los siguientes parámetros (Cuadro 7):

- Temperatura corporal: se midió la temperatura de forma rectal usando un termómetro clínico de mercurio marca Predent®, colocándolo en el ano de los bovinos en contacto con la mucosa por 1 minuto.
- Frecuencia cardiaca: Se usó un estetoscopio marca Checkatek E1-6S®, auscultando entre la 3ª y 6ª costilla del lado izquierdo del bovino, por un minuto.

- Frecuencia respiratoria: Se usó un estetoscopio marca Checkatek E1-6S®, auscultando en la zona entre el borde superior posterior caudal de la escápula, por debajo de las apófisis transversas de las vértebras torácicas y lumbares hasta el penúltimo espacio intercostal hasta el olecranon, por un minuto.
- Tiempo de llenado capilar: Se midió en la mucosa oral, presionando por 5 segundos y midiendo el tiempo que tarda en la coloración inicial con cronómetro digital.
- Color de mucosas: se observó en la mucosa oral tomando como colores posibles: rojo, rojo-rosa, rosa, rosa-blanco y blanco.
- Volumen globular aglomerado (VCA): Se obtuvo 6 ml sangre, aproximadamente, de la vena coxígea con BD Vacutainer® 6, se llenaron dos tercios de tubos capilares con heparina KimbleChase® sellando un extremo con calor y centrifugándolos por 10 minutos en una centrifuga de microhematocrito modelo KHT-400® serie 914263 marca Gemmy®. Se determinó el VCA usando el método de microhematocrito.
- Porcentaje de eritrocitos infectados: Se obtuvo aproximadamente 6 ml sangre de la vena coxígea con BD Vacutainer® 6, con los que se realizaron frotis sanguíneos, los cuales se tiñeron con un hemocolorante rápido marca Hycel®, se observaron en un microscopio 100x contando la cantidad de eritrocitos infectados en 200 eritrocitos.
- Movimientos ruminales: se auscultó con un estetoscopio marca Checkatek E1-6S® sobre el hueso del ijar izquierdo, durante 2 minutos.

Para determinar la muerte clínica se consideró: la presencia de parásitos en frotis sanguíneo, más de tres días con una temperatura corporal  $>40.5$  °C, descenso el volumen celular aglomerado ( $>40\%$ ) y signos como anorexia, depresión y letargia (Cantó Alarcón, et al., 2003). Al determinarse la muerte clínica los animales fueron tratados con Dipropionato de Imidorcab de Sanfer® a una dosis

de 1ml/100 kg y Napzin® de PiSa Agropecuaria® (Meglubina de flunixin) a una dosis de 1.1mg/kg cada 24 h hasta que la temperatura corporal disminuyó. Se verificó la diferencia estadística significativa entre los dos grupos, en cada variable, con una prueba de T de Student para muestras independientes suponiendo varianzas iguales.

Cuadro 7. Calendario de inmunización, obtención de sangre, desafío con *B. bovis* y examen físico de los bovinos.

Actividad	Día	Fecha
Obtención de sangre pre-inmunización/ 1ª inmunización	0	14/ abril /2020
Obtención de sangre 1ª inmunización/ 2ª inmunización	21	5/mayo/2020
Obtención de sangre 2ª inmunización/ 3ª inmunización	42	26/mayo/2020
Obtención de sangre 3ª inmunización	65	18/junio/2020
Desafío con <i>B. bovis</i>	66	19/junio/2020
Examen físico de bovinos	67-81	20/junio-4/julio/2020

### 6.3.5 Inmunofluorescencia indirecta.

Para observar la especificidad de los anticuerpos generados contra la proteína en *B. bovis*, una vez obtenidos los sueros de los conejos y los bovinos inmunizados con los péptidos se hicieron pruebas de inmunofluorescencia indirecta, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se utilizaron como antígeno láminas con frotis grueso de eritrocitos lavados infectados con *B. bovis* con una parasitemia de 1.8% previamente preparados congelados a -20°C.
2. Se sacaron las láminas congeladas y se dejaron secar las laminillas por 30 minutos con ventilador.
3. Se fijaron las laminillas en acetona puro (para suero de conejo) o acetona 90% + metanol 10% (para suero bovino) a -20°C por 30 minutos.

4. Se dejaron secar en ventilador y se dibujaron 6 círculos por laminilla con esmalte de uñas color negro.
5. Las laminillas, utilizadas con suero bovino, se bloquearon con suero de conejo sin inmunizar a una dilución 1:100 filtrado con filtros de jeringa estériles Corning®.
6. Se usaron como anticuerpo primario los sueros de los animales, diluyendo los sueros de conejo en 1:50 (sueros pre inmunización y 3ª inmunización), de los bovinos en 1:60 (sueros re inmunización y 2da inmunización) y 1:80 (sueros pre inmunización y 3ª inmunización); incluyendo un control positivo (suero de bovino infectado con *B. bovis*, en ambos casos) y un control negativo (*PBS* pH 7.4 en las láminas para suero de conejo y suero de bovino no infectado para las láminas para suero bovino).
7. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se dejaron incubar por 30 minutos a 37°C.
8. Al finalizar se realizaron 3 lavados a las laminillas con movimientos suaves por 5 minutos cada lavado, en una cubeta de tinción de vidrio con *PBS-Tween 1%* (pH 7.4) y un lavado más con agua destilada. Se dejaron secar las laminillas con ventilador.
9. Se colocó en cada uno de los círculos en la laminilla el anticuerpo secundario a una dilución 1:200: anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Alexa fluor® 488-conjugated affiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L), Código 711-545-142, Lote 116141, Jackson ImmunoResearch®) o anti IgG de bovino conjugado con Alexa 488 (Alexa fluor® 488-conjugated affiniPure rabbit anti-bovine IgG (H+L) Código 301-545-003, lote 99654, respectivamente, y se dejaron incubar en cámara húmeda protegida de la luz por 30 minutos a 37°C. En las IFI donde se usó el suero de la 3ª inmunización se hizo un duplicado usando como además el marcador fluorescente DAPI para observar el núcleo del parásito.

10. Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados a las laminillas con movimientos suaves por 5 minutos cada lavado, en una cubeta de tinción de vidrio protegida de la luz con *PBS-Tween 1%* (pH 7.4) y un lavado más con agua destilada. Se dejaron secar las laminillas con ventilador.
11. Se observaron las laminillas en el microscopio de fluorescencia a 100x con glicerina fosfatada.

#### 6.3.6 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*ELISA*).

##### 6.3.6.1 Titulación de los péptidos TCTP II, III, IV.

Se titularon los péptidos II, III y IV utilizados en la vacunación de bovinos por medio de *ELISA*.

1. Se sensibilizaron placas de *ELISA* de 96 pozos Costar® (ref 3590) con una concentración inicial de 8 µg/ ml de cada uno de los péptidos, diluidos en solución tampón de carbonatos y, se hizo una dilución seriada hasta 1 µg/ ml. Se cubrió la placa con plástico para envoltura de alimentos y se dejó incubar toda la noche a 4°C.
2. Las placas se lavaron con 200µl de *PBS-T* 0.05% (pH 7.4) en cada pozo 3 veces, secando entre cada lavado.
3. Se bloquearon todos los pozos de las placas con 200µl de leche descremada diluida en *PBS-T* 0.05% (pH 7.4), se dejó incubar a 37°C/1 hora con agitación leve.
4. Las placas se lavaron 3 veces de la misma forma explicada anteriormente y se adicionaron 100 µl de cada uno de los sueros de los 8 becerros por triplicado previamente diluido en 1:500, con control de *PBS* y control de conjugado.
5. Se incubaron a 37°C/1 hora y se lavó de la misma forma.

6. Se colocaron en cada pozo 100µl del anticuerpo secundario anti IgG de bovino (Peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-bovine++ IgG (H+L), Código 101-035-165, lote 132133, Jackson Immunoresearch®) a una dilución 1:6000, en leche descremada 2% diluida en *PBS-T* 0.05% y se incubó a 37°C/1 hora. Se lavaron las placas de la misma forma descrita anteriormente más un lavado adicional con *PBS* (pH 7.4).
7. Se puso 100µl de la solución de revelado en cada pozo.
8. Se detectó la densidad óptica a 450 nm en un lector de absorbancia de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad®) a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

#### 6.3.6.2 Titulación de anticuerpos en suero de bovinos inmunizados y grupo control

1. Se sensibilizaron placas de *ELISA* de 96 pozos Costar® (ref 3590) con 100µl de 4 µg/ ml de cada uno de los péptidos diluidos en buffer de carbonatos. Se cubrió la placa con plástico para envoltura de alimentos y se dejó incubar toda la noche a 4°C.
2. Las placas se lavaron con 200 µl de *PBS-T* 0.05% (pH 7.4) en cada pozo 3 veces, secando entre cada lavado.
3. Se bloquearon todos los pozos con 200µl de leche descremada diluida en *PBS-T* 0.05% (pH 7.4), se dejó incubar a 37°C/1 hora con agitación leve. Las placas se lavaron 3 veces de la misma forma explicada anteriormente.
4. Se adicionó 100 µl de los sueros de cada animal pre inmunización y de la 3ª inmunización por triplicado previamente diluido en 1:500 y se realizaron 11 diluciones seriadas hasta 1:1 240 000, con control de *PBS* y control de conjugado.
5. Las placas se incubaron a 37°C/1 hora y se lavaron de la misma forma.

6. Se colocó en cada pozo 100µl del anticuerpo secundario anti IgG de bovino (Peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-bovine++ IgG (H+L), Código 101-035-165, lote 132133, Jackson Immunoresearch®) a una dilución 1:6000, en leche descremada 2% diluida en *PBS-T* 0.05% y se incubó a 37°C/1 hora. Las placas se lavaron de la misma forma más un lavado adicional con *PBS* (pH 7.4).
7. Se pusieron 100µl de la solución de revelado en cada pozo.
8. Se detectó la densidad óptica a 450 nm en un lector de absorbancia de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad®) a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.
9. Se calculó la diferencia estadística significativa entre el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización en la misma dilución, usando el análisis estadístico de T de Student para muestras pareadas ( $P \leq 0.05$ ).

#### 6.3.6.3 Determinación de anticuerpos

1. Se sensibilizaron placas de *ELISA* de 96 pozos Costar® (ref 3590) con 100µl de 4 µg/ ml de cada uno de los péptidos diluidos en solución tampón de carbonatos. Se cubrió la placa con plástico para envoltura de alimentos y se dejó incubar toda la noche a 4°C.
2. Las placas se lavaron con 200µl en cada pozo de *PBS-T* 0.05% (pH 7.4) 3 veces, secando entre cada lavado.
3. Se bloquearon todos los pozos con 200µl de leche descremada al 5% diluida en *PBS-T* 0.05% (pH 7.4), se dejó incubar a 37°C/1 hora con agitación leve. Las palcas se lavaron 3 veces de la misma forma explicada anteriormente.
4. Se adicionaron 100 µl de cada uno de los sueros de cada animal pre inmunización, primera, segunda y tercera inmunización por triplicado previamente diluido en 1:4000, con control de *PBS* y control de conjugado.

5. Las placas se incubaron a 37°C/1 hora y se lavaron de la misma forma.
6. Se colocaron en cada pozo 100µl del anticuerpo secundario anti IgG de bovino (Peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-bovine++ IgG (H+L), Código 101-035-165, lote 132133, Jackson Immunoresearch®) a una dilución 1:6000, en leche descremada 2% diluida en *PBS-T* 0.05% y se incubó a 37°C/1 hora. Se lavaron de la misma forma más un lavado adicional con *PBS* (pH 7.4).
7. Se pusieron 100µl de la solución de revelado en cada pozo.
8. Se detectó la densidad óptica a 450 nm en un lector de absorbancia de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad®) a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

#### 6.5.6.4 Titulación de anticuerpos totales

Para analizar si existía una diferencia en la cantidad de anticuerpos totales entre los animales del grupo control y vacunado, se hizo una titulación de los anticuerpos totales en el suero de los bovinos. Considerando que, la actividad de los anticuerpos estimulados por la inmunización con los péptidos, podrían interferir en la unión de la *TCTP* de *B. bovis* en las células B de los bovinos; permitiendo así, que la *TCTP* de los bovinos se una al receptor específico de las células B del bovino y las active, aumentando la cantidad de anticuerpos totales.

La titulación de los anticuerpos totales se realizó con el suero de los bovinos pre inmunización, el suero de la 3ª inmunización (pre desafío) y el suero tomado 20 días después del desafío, según el siguiente protocolo:

1. Se sensibilizaron placas de *ELISA* de 96 pozos Costar® (ref 3590) con 100 µl de los sueros de cada inmunización de animal, a una dilución 1:100 en buffer de carbonatos por triplicado y, se hizo una dilución seriada e base 10



hasta 1: 1:100 000 000 000. Las placas se cubrieron con plástico para envoltura de alimentos y, se dejaron incubar toda la noche a 4°C.

2. Las placas se lavaron con 200µl en cada pozo de *PBS-T* 0.05% (pH 7.4), 3 veces, secando entre cada lavado.
3. Se bloquearon todos los pozos con 200µl de leche descremada al 5% diluida en *PBS-T* 0.05% (pH 7.4), se dejó incubar a 37°C/1 hora con agitación leve. Se lavaron 3 veces de la misma forma explicada anteriormente.
4. Se colocaron en cada pozo 100µl del anticuerpo secundario anti IgG de bovino (Peroxidase-conjugated affiniPure goat anti-bovine++ IgG (H+L), Código 101-035-165, lote 132133, Jackson ImmunoResearch®) a una dilución 1:6000, en leche descremada 2% diluida en *PBS-T* 0.05% y se incubó a 37°C/1 hora. Se lavó de la misma forma más un lavado adicional con *PBS* (pH 7.4).
5. Se puso 100µl de la solución de revelado en cada pozo.
6. Se detectó la densidad óptica a 450 nm en un lector de absorbancia de placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad®) a los 20, 25, 30 y 35 minutos.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 OBTENCIÓN DE CEPAS DE *B. BOVIS*.

#### 7.1.1 Extracción de hemolinfa.

Se extrajo hemolinfa de garrapatas provenientes de los estados de Veracruz, Puebla y Nayarit. Al observarlos al microscopio, en los frotis de hemolinfa de garrapatas provenientes de Tepic, Nayarit y de Hueltamalco, Puebla se encontraron quinetos (Figura 11).

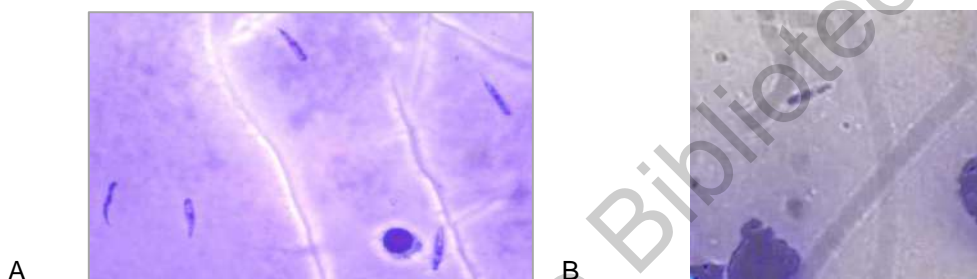


Figura 11. Quinetos en hemolinfa de garrapatas provenientes de A: “El verdireño”, Nayarit y de B: “Santa Cruz”, Puebla.

#### 7.1.2 Extracción de ADN

El ADN extraído de las diferentes muestras se analizó en un gel agarosa observando su integridad. En el ADN extraído de Chiapas y de la unidad de producción “Buena vista”, Ayotaxco de Guerrero, Puebla se observó degradado. Mientras el ADN extraído de las unidades de producción “Sta. Cruz” y “El paraíso” en Puebla y de las muestras procedentes de Veracruz, Tamaulipas y Colima, estaba integro (figura 12).

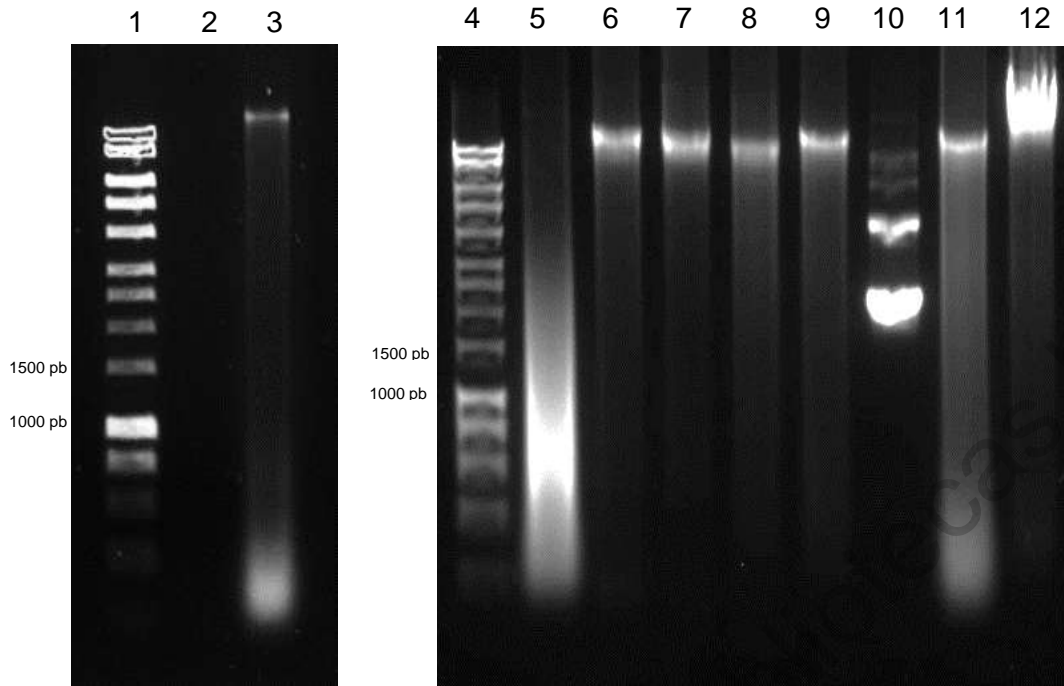


Figura 12. Gel de integridad del ADN extraído. 1: Marcador de talla molecular 1 KB, 2: ADN extraído de larvas de Nayarit, 3: ADN extraído de garrapatas de Tamaulipas, 4: Marcador de tamaño molecular 5: ADN extraído de garrapatas de “Buena vista”, 6: ADN extraído de garrapatas de “Sta. Cruz”, 7: ADN extraído de garrapatas de “Sta. Cruz”, 8: ADN extraído de garrapatas de “El paraíso”, 9: ADN extraído de garrapatas de “El paraíso”, 10: ADN extraído de sangre de bovinos de Chiapas, 11: ADN extraído de sangre de bovinos de Veracruz, 12: ADN extraído de sangre de bovinos de Colima.

### 7.1.3 Diagnóstico de *Babesia bovis* y *bigemina* por PCR anidado.

Las muestras extraídas de ADN se analizaron con PCR anidado. Se observaron las bandas del tamaño esperado a *B. bovis* (196 pb) en las larvas y garrapatas de Puebla y en 2 muestras del papel de celulosa de Trinidad y Tobago. Y, se observaron bandas del tamaño esperado para a *B. bigemina* (250 pb) en las larvas y garrapatas de Puebla y un aislado de Trinidad y Tobago (Figura 13).

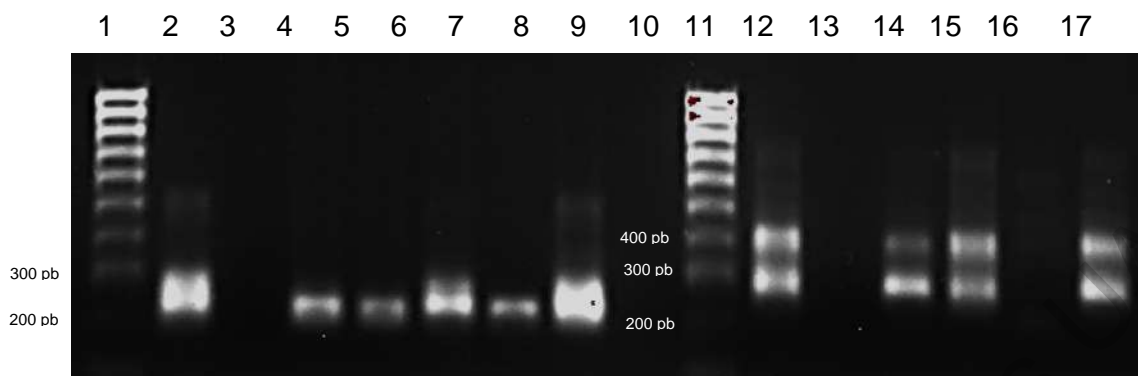


Figura 13. PCR diagnóstico de *B. bovis* y *B. bigemina*. 1: marcador de talla molecular 1 kb, 2: control positivo, 3: control negativo, 4: larvas "Sta. Cruz", Puebla, 5: Garrapatas, "Sta. Cruz", Puebla, 6: Garrapatas "Sta. Cruz", Puebla, 7: R91 Trinidad y Tobago, 8: R85 trinidad y Tobago, 9: Vacío, 10: Marcador de talla molecular 1kb, 11: control positivo, 12: control negativo, 13: larvas "Sta. Cruz", Puebla, 14: Garrapata "Sta. Cruz", Puebla, 15: Garrapatas "Sta. Cruz, Puebla", 16: R91 T&T, 17: R85 T&T.

## 7.2 CARACTERIZACIÓN DEL GEN TCTP DE *B. BOVIS*.

### 7.2.1 Identificación del gen de *tctp* de *B. bovis* por bioinformática.

Al alinear la secuencia de aminoácido de *TCTP* de *B. bovis* y de *P. falciparum*, se observó un porcentaje de cobertura en la proteína del 93% y una identidad del 58% (Figura 14). Mediante las herramientas bioinformáticas se identificó la secuencia de nucleótidos dentro del genoma de *B. bovis*, éste se encuentra en el cromosoma 4, conformado por 889 pb con 3 exones y 2 intrones (Figura 15). Se encuentra en la base de datos del NCBI con el Gene Id: 5478636 (U.S. National Library of Medicine, 2020).



Figura 14. Alineamiento de la proteína de *TCTP* de *P. falciparum* y *B. bovis*.

### Babesia bovis T2Bo chromosome 4 gcontig\_1104837696308, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NW\_001820857.1  
[GenBank](#) [FASTA](#)

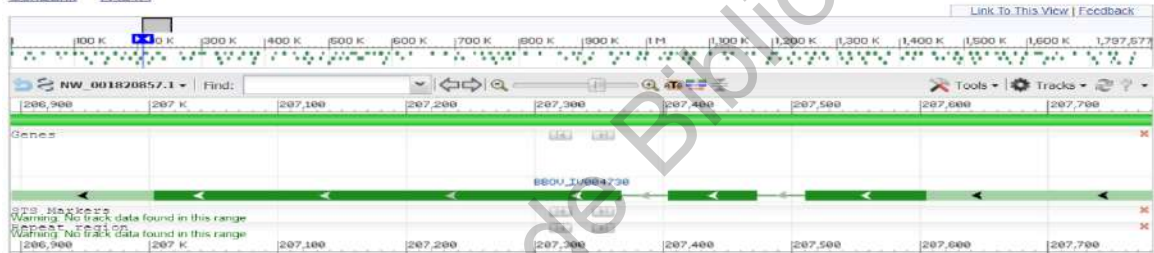


Figura 15. Gen de *tctp* en el genoma de *B. bovis*, con 3 exones y dos intrones.

#### 7.2.2 Diseño de oligonucleótidos

Una vez identificado el gen de *tctp* dentro del genoma de *B. bovis*, se diseñaron oligonucleótidos en sentido y anti sentido para amplificar el gen completo incluyendo sus intrones siguiendo los lineamientos necesarios para su diseño (cuadro 8) y se mandaron a sintetizar en el IBT, UNAM. Estos amplificaron un fragmento de 1119 pb del genoma de *B. bovis*, amplificado el gen de *tctp* completo con intrones (figura 16).

Cuadro 8. Características de los oligonucleótidos usados para amplificar el gen de *tctp* en el genoma de *B. bovis*.

Oligonucleótidos	Largo	% CG	Temperatura de alineamiento	Horquillas ΔG	Auto complementariedad ΔG	Heterodímero ΔG
TGA TGT CAC AAG GGA TGT GC	20	50%	55.3°C	-2.41	-5.25	-4.64
ATA CCG TAG TCC TCG TTT CC	21	42.9%	52.6°C	-0.04	-4.64	

TTTCTCAAATCCATGCTTCTCATCTGCTAGTAGCTTATCTTTTCGCAAATTGATTTCGTCAAAATGCTTGGGG  
AAGCTGTCTTCCGAGCCTTTGAATTTTAACTTCTATTGGACTGTGATGTCACAAGGGAATGTCACAT  
ATGAAAATTTCTTTATGCAAAATGGATCCTAGTGTGCCATATTTATTTTACAAAATATATATGTGTAAT  
TTGCATTTTACATCTGTATGTAGTGCCGTTGTTGGCCTATATAGACATATTCACCAATAGCGCCCTGTAC  
CAAGACAGCTGCCACTAATATGAACAAATAGACCGACTATGTTGTTATACCAAGATTAATCCACGAA  
GGTTATGTTATTTAACATCTCGTAACCATGTGTATGCAAAACGGGGGAATAGTTGTGTTTAAATATCTAG  
CAATGCAAGTATCTTAGTACCTTTCTTCAGTAAGAGCCTCCTTAAATGTAGACCAATCTAGGAGCAAGTTC  
TTCTCCGTTGTAGTAGGCGTAAATTAACCCGGCTTCTAGGTCGAGTGAAGTACCCGATGTAGAATTCGAAA  
TCACTGAAGTTACCAATACATGCTTGACGAACCTTTGGATATCACTCCTTGAAACTTGTACTTTATCGG  
GAGCGTTTCTTCCAAATGTGCAGTCACACGCTTGTATGACTTTTGTATGTAGCCGGTGTATTCTGCCTT  
GGTGAAGGGTGTTCCTGAAGCCTGAAGGCGTCAACGATGTGGATGACCATTCGACGGTAGGGTTCAGCT  
GCCACGGACGAACCACCACCTTCTCACTGCATCATCGTTATGACTCTATAGTAAAAACGTACTCATCAT  
TGCAGGCAATACCGTAGTCTCGTTTCCCTTAGCTACCTTGGATGATTTAACTTCAAAGGCAACTGATTA  
TCGATTAACCGCGTGAGAACGTTACTTACCGCTTGGCAATTCGGGTGTGCGAATGGGTTAAGGTGGGT  
GTATGCGTCAAGACACACTTCGTGCGCCGGTGAATAGATCTTTGTAGACGAGCATCTTGATATATTTAGAA  
GTAATAACTAAGCTTTGTTAAATAAGTTGCTGTATAATTTTTTTGTGTTTTCACTCAAATACGGTTAGTA  
ACGCCGTTTTAATTGACTTGATGTGTGCGAGTATATGAACCTGTTTCGCCCTATAAAGACACAACGATTGA  
CTCGTAATACGATTGCCGTGCTATGAAAATGTGGAATAATCCAGTTATCGGTTTAAATTTAGCGTCTTTA  
TCCTAATTAGTATGGGGATCGCCGCACGTTTAAAGGGGGTTGATTTGAAGGGGTTGATTTGA  
CTAGATTGGGGCTTATTAACCCGCAATATGTGAGTCGTTCCCTAGTATAACTTATTCGTGTCATATTTCA

Figura 16. Fragmento del genoma de *B. bovis* con el gen de *tctp* amplificado por los oligonucleótidos diseñados. El resaltado morado indica la localización del oligonucleótido en sentido, el resaltado verde indica la localización del oligonucleótido en anti sentido, el resaltado azul indica el gen de *tctp* y las letras azules indican el fragmento amplificado de 1199 pb por los oligonucleótidos.

### 7.2.3 Estandarización de PCR.

Una vez recibidos los nucleótidos se estandarizaron usando dos muestras de *B. bovis*: Sta. Cruz, Puebla y de Zacatecas. Se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento de 55 a 64°C, decidiendo que la mejor temperatura para la mejor amplificación del gen es de 56°C (figura 17).

#### 7.2.4 Amplificación del gen de *tctp* por PCR.

Siguiendo el programa de PCR estandarizado, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado (1119 pb) en los aislados de *B. bovis* de Michoacán, T2Bo, Zacatecas, Trinidad & Tobago, Tepic y Santa cruz (Puebla), usando el marcador de talla molecular de 1 kb HyperLadder™ de Bioline® (figura 18).

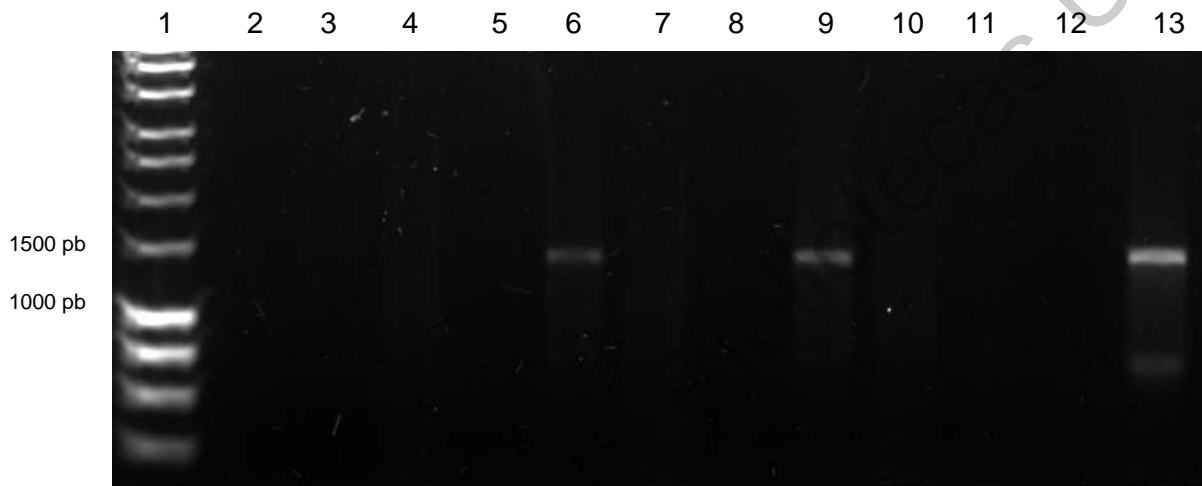


Figura 17. Gradiente de temperatura de alineamiento para amplificar el gen de *tctp* con los oligonucleótidos específicos en el genoma *B. bovis*. 1: marcador de talla molecular 1 kb, 2: control negativo 58°C, 3: *B. bovis* Zacatecas 58°C, 4: *B. bovis* Puebla 58°C, 5: control negativo 57°C, 6: *B. bovis* Zacatecas 57°C 7: *B. bovis* Puebla 57°C, 8: control negativo 56°C, 9: *B. bovis* Zacatecas 56°C, 10: *B. bovis* Puebla 56°C, 11: control positivo 55°C, 12: *B. bovis* Zacatecas 55°C, 13: *B. bovis* Puebla 57°C. Amplicón esperado 1199 pb.

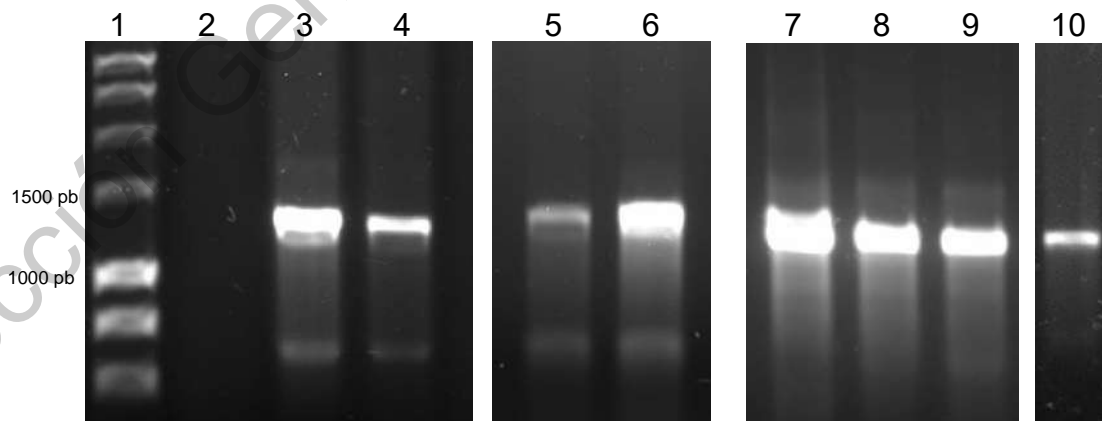


Figura 18. Amplificación del gen de *tctp* en diferentes aislados de *B.bovis*: 1: marcador de talla molecular, 2: control negativo, 3: ADN *B. bovis* Michoacán, 4: ADN *B. bovis* Michoacán, 5: Control positivo, 6: ADN *B. bovis* T2Bo, 7: ADN *B. bovis* Jalisco, 8:ADN *B. bovis* Tepic, 9: ADN *B. bovis* Michoacán, 10: ADN *B. bovis* Zacatecas. Tamaño de banda esperado 1199 pb.

### 7.2.5 Clonación del gen de *tctp* de diferentes aislados.

En la clonación del gen de *tctp*, se lograron obtener diferentes colonias positivas de las clonas del gen de *tctp* en aislados de *B. bovis* de Zacatecas, Tepic, la cepa T2Bo y Michoacán (figura 19 y 20). Las colonias positivas se dejaron crecer, se extrajo ADN plasmídico y, se midió la concentración por espectrofotometría en Nanodrop® (Cuadro 9).

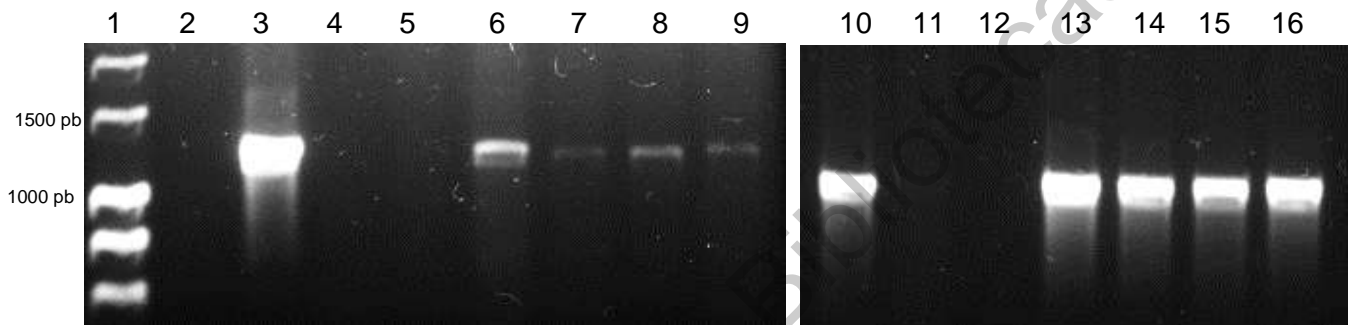


Figura 19. PCR de las colonias clonadas del gen de *tctp* de *B. bovis* aisladas de la cepa de referencia T2Bo y Zacatecas. 1: Marcador de talla molecular, 2: Control negativo, 3: control positivo, 4: Clona 1 T2Bo, 5: Clona 2 T2Bo, 6: Clona 3 T2Bo, 7: Clona 4 T2Bo, 8: Clona 5 T2Bo, 9: Clona 6 T2Bo, 10: clona 1 Zacatecas, 11: clona 2 Zacatecas, 12: clona 3 Zacatecas; 13: clona 4 Zacatecas, 14: clona 5 Zacatecas, 15: clona 6 Zacatecas, 16: clona 7 Zacatecas. Tamaño esperado de banda 1199 pb.

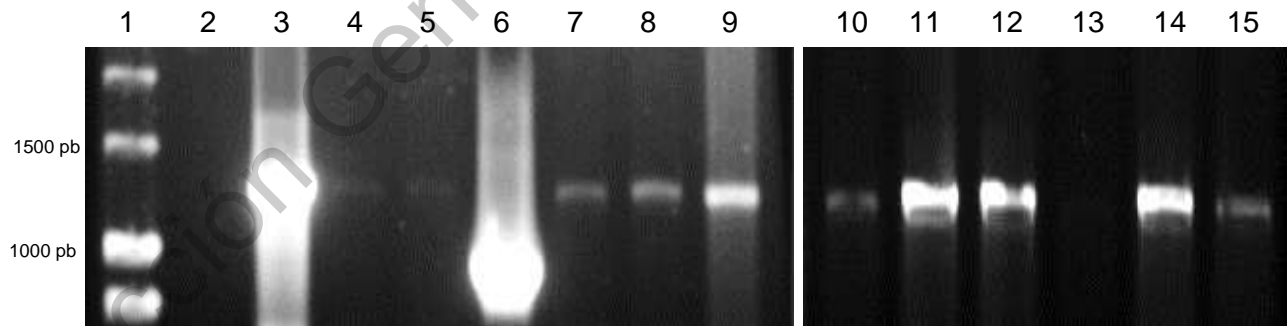


Figura 20. PCR de las colonias clonadas del gen de *tctp* de *B. bovis* aisladas de Michoacán y Tepic. 1: Marcador de talla molecular, 2: Control negativo, 3: control positivo, 4: Clona 1 Michoacán, 5: Clona 2 Michoacán, 6: Clona 3 Michoacán, 7: Clona 4 Michoacán, 8: Clona 5 Michoacán, 9: Clona 6 tepic Michoacán, 10: clona 1 Tepic, 11: clona 2 Tepic, 12: clona 3 Tepic; 13: clona 4 Tepic, 14: clona 5 Tepic, 15: clona 6 Tepic. Tamaño esperado de banda 1199 pb.



Aislado		Concentración
Zacatecas	7	14.9 ng/μl
	6	12.8 ng/μl
	4	19.9 ng/μl
Tepic	2	16.7 ng/μl
	5	24 ng/μl
	6	22.65 ng/μl

Aislado		Concentración
Michoacán	2	17.95 ng/μl
	5	17.8 ng/μl

Cuadro 9. Nanogramos por microlitros de ADN plasmidico medido por espectrofotometría de las diferentes colonias de los aislados de *B. bovis* de Zacatecas, Michoacán y Tepic.

#### 7.2.6 Secuenciación del gen de *tctp* de las diferentes cepas.

Se recibieron varios electroferogramas de las secuencias secuenciadas y fueron editadas. Se hizo un alineamiento con la herramienta bioinformática BLAST con la secuencia del gen *tctp* reportada en el NCBI, observando una similitud en el porcentaje de identidad de nucleótidos del 99.2% en la secuencia de *tctp* del aislado de *B. bovis* de Zacatecas (Figura 21) y del 99.6% % en la secuencia de *tctp* del aislado de *B. bovis* de Michoacán; y un 100% de identidad en aminoácidos en ambas secuencias, con lo que se obtuvo una secuencia consenso (Figura 22).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Babesia bovis BBOV_IV004730 mRNA for histamine-releasing factor, putative, complete cds, clone: XBBk017152, strain: Texas</a>	896	1199	65%	0.0	99.20%	<a href="#">AK441568.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Babesia bovis histamine-releasing factor, putative (BBOV_IV004730), partial mRNA</a>	870	1150	62%	0.0	99.17%	<a href="#">XM_001610352.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Babesia bovis MYND finger domain protein, putative (BBOV_IV004720), partial mRNA</a>	178	178	9%	5e-40	100.00%	<a href="#">XM_001610351.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Babesia bovis BBOV_IV004720 mRNA for MYND finger domain protein, putative, complete cds, clone: XBBk023288, strain: Texas</a>	169	169	8%	3e-37	100.00%	<a href="#">AK441931.1</a>

Figura 21. Resultado del alineamiento de nucleótidos con la herramienta Blast del NCBI de la secuencia de *tctp* de *B. bovis* de Zacatecas.

Secuencia predicha de aminoácidos:  
MVIDIVDAFRLQETPFTKAEYTGAIKKYIKRVTAHLEENAPDKVTSFKDDIQKFVK  
HVLGNFSDFEFYIGESLDLEAGLIYAYYNGEELAPRLVYIKEALTEERY

Figura 22. Secuencia consenso del gen de *tctp* de los aislados de *B. bovis* utilizados.

### 7.2.7 Análisis de la topología de la TCTP.

En el análisis de la topología usando herramientas bioinformáticas, no se pudo predecir un péptido señal (figura 23), ni dominios transmembranales (figura 24) y se predijo un dominio de proteína TCTP (figura 25).

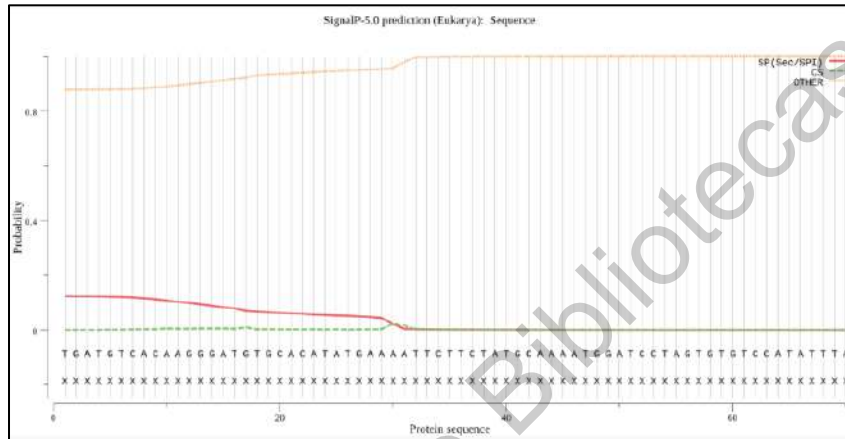


Figura 23. Predicción de la presencia de péptido señal en la secuencia de aminoácidos de TCTP con la herramienta bioinformática Signal P.

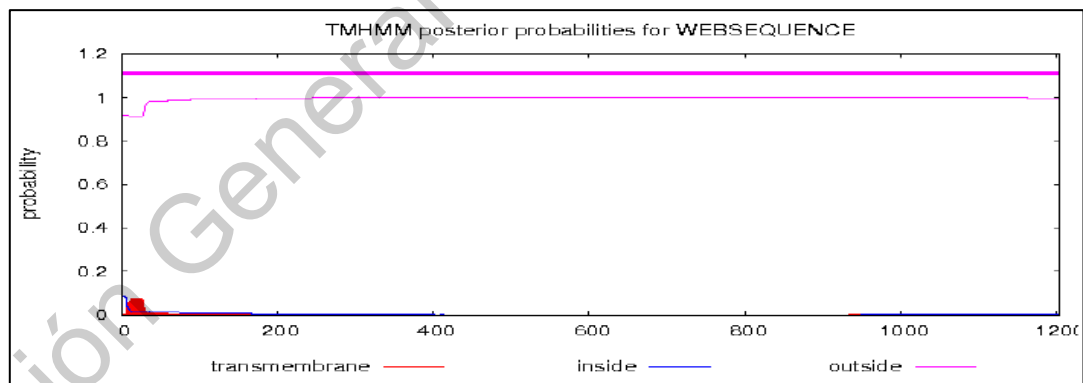


Figura 24. Predicción de la presencia de regiones transmembranales en la secuencia de aminoácidos de TCTP con la herramienta bioinformática TMHMM 2.0.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
TCTP	Translationally controlled tumour protei...	Domain	CL0080	1	171	1	170	1	165	166	182.4	8.1e-54	n/a	Hide
#HMM	RIYKdliigtEiFSosy....kike..ykdgyvevegknvtkkgndlliganasaeege.eguddevekndivdnfrigetstfokksykaylkdmkvvkkkLeekzeevkefkkaagevkklianfkoygfytesadpgrwllidyredgvtptvffkldg													
#MATCH	M++Ykd++lgtE++SDhy ++ + v++e++++V k++++ l +n+++e+g + ++d tve++dIud+frlqet fak tye yk+y+k+v+++Lee+ p++v++FK ++q++v++l+nfd++fy-gesrd ++ ++++++ ++ #P ++v++k++L													
#PP	g*****988744j3325,5799*****998887778999*****													
#SEQ	RLVYKDLFTGDEVCDAAYLRII PFDMGPI--QVAFENKSSKVKAGREDHI--EACIDDEESKGGSSVADPTVEVNIIDIVDAFLQETPTTKAEVTDYIDKVIKKNVTAHLEENAPDKVTSFKDIDQVFWMLGHFSDFEFPYIGESLDLEACLIVAYINGEELAPRLVYKDAL													

Figura 25. Predicción de dominios de proteína TCTP en la secuencia de aminoácidos de TCTP con la herramienta bioinformática Pfam.

### 7.2.7.1 Comparación con la TCTP de otras especies.

En el alineamiento múltiple entre la TCTP de *Bos taurus*, *Bos indicus* y *B. bovis* (figura 26) se encontró un 100% de identidad entre TCTP de *Bos taurus* y *Bos indicus*. Entre estos y la TCTP de *B. bovis* se encontró una identidad del 31.76%, en la secuencia de aminoácidos (figura 27).

B.T.	MIIYRDLISHDEMFSDIYKIREVADGL-----CLEVEGKMVSRTEGNIDDSLIGGNASAE	55
B.I.	MIIYRDLISHDEMFSDIYKIREVADGL-----CLEVEGKMVSRTEGNIDDSLIGGNASAE	55
B.bov	MLVYKDLFTGDEVCSDAYTHLNPFDNPEFASVAFVKSSK--VAKGNEDYGIACNDDEEG	58
	*:*	
B.T.	GPEGEGTESTVITGVDIVMNHHLQETSFTKEAYKKYIKDYMKSIGKLEEQRPERVKPFM	115
B.I.	GPEGEGTESTVITGVDIVMNHHLQETSFTKEAYKKYIKDYMKSIGKLEEQRPERVKPFM	115
B.bov	GGSSVAADPTVEMVIDIVDAFRLQETPFTKAETGYIKKYIKRVTAHLEENAPDKVTSFK	118
	*..*:*	
B.T.	TGAAEQIKHILANFKNYQFFIGENMNPDGMVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEKC	172
B.I.	TGAAEQIKHILANFKNYQFFIGENMNPDGMVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEKC	172
B.bov	DDIQKFVKHVLGNFSDFEFYIGESLDLEAGLIYAYNGEELAPRLVYIKEALTEERY	175
	. : *:*	

Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la TCTP de *Bos taurus* (B.T.), *Bos indicus* (B.I.) y *B. bovis* (B.bov).

1: B.T.	100.00	100.00	31.76
2: B.I.	100.00	100.00	31.76
3: B.bov	31.76	31.76	100.00

Figura 27. Matriz de identidad porcentual entre la secuencia de aminoácidos de TCTP de *Bos taurus taurus* (B.T.), *Bos indicus* (B.I.) y *B. bovis* (B.bov).

En el alineamiento múltiple entre la TCTP de *B. bovis* y *B. bigemina* (figura 28) se encontró un 86.29% de identidad, en la secuencia de aminoácidos (figura 29).

B.bovis	MLVYKDLFTGDEVCSDAYTHLNPFNDPEFASVAFEVKSSKVAKGNEDYGIACNDD-----	55
B.bigemina	MLVYKDLFTGDEVCSDAYAHLPFNADFANVAFEVKSNKVAKGNEDYGIACNDDNGLNA	60
	*****:*****:*.*****.*****	
B.bovis	--EEGGSSVAADPTVEMVIDIVDAFRLQETPFTKAEYTGYYIKKYIKRVTAHLEENAPDK	113
B.bigemina	LSEEGSSGPAADPGVEMVIDVDAFRLQETPFTKAEYTSYIKKYIKRVATHLEENQDR	120
	***.*.*** *****.*****.*****.:***** **.	
B.bovis	VTSFKDDIQKFVKHVLGNFSDFEFYIGESLDLEAGLIYAYNGEELAPRLVYIKEALTEE	173
B.bigemina	VAAFKTDIQNFVKHVLNFDNDFEFYIGESLDLEAGLVYAYNGEEVAPRLVYIKDALTEE	180
	*.:** **.******.*.*****.*****.*****.*****.*****	
B.bovis	RY	175
B.bigemina	RY	182
	**	

Figura 28. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la TCTP de *B. bovis* y *B. bigemina*.

1: B.bovis	100.00	86.29
2: B.bigemina	86.29	100.00

Figura 29. Matriz de identidad porcentual entre la secuencia de aminoácidos de TCTP de *B. bovis* y *B. bigemina*.

#### 7.2.7.2 Predicción de la estructura terciaria de la TCTP de *B. bovis*.

Usando un modelado bioinformático se predijo la estructura tridimensional de la TCTP obtenida de las cepas secuenciadas (figura 30), se predijo una estructura terciaria muy similar a la descrita en *P. falciparum*, con la hélice alfa característica de la TCTP en organismos del filo Apicomplexa, entre los aminoácidos 23 y el 31 (figura 31).

#### 7.2.8 Predicción de péptidos con alta probabilidad de ser epítipo B.

Con las predicciones hechas por los programas bioinformáticas, en la secuencia consenso de aminoácidos predicha sin exones se identificaron las regiones con mayores posibilidades de ser epítipos B (figura 32) y, se seleccionaron 4 regiones para ser sintetizados como péptidos (figura 33).

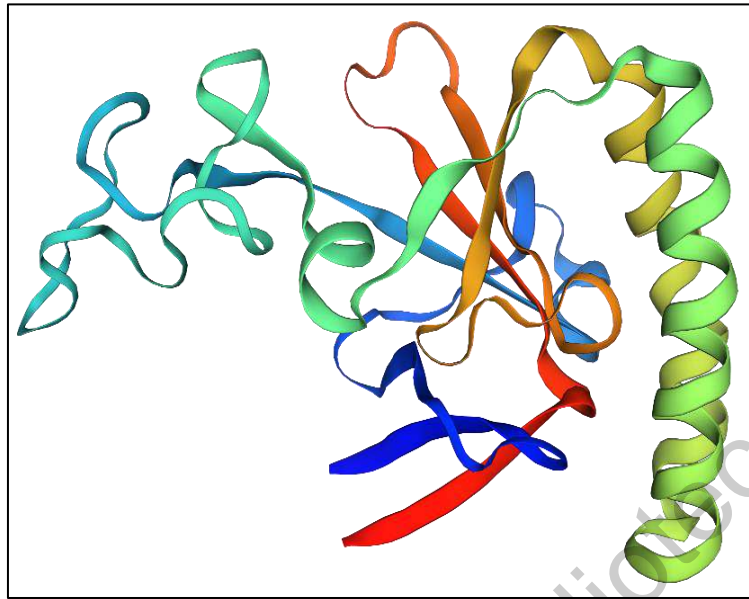


Figura 30. Predicción bioinformática de la estructura tridimensional de la TCTP de *B. bovis* a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida.

Model_03	M	L	V	R	D	L	F	T	G	D	E	V	C	S	D	A	Y	T	H	N	P	F	N	P	F	A	S	V	A	P	E	V	S	S	K	V	A	K	G	N	E	D	Y	G	I	A	C	N	D	D	E	E	G	G	S	S	V	A	A	65			
3p3k.1.A	M	V	R	D	L	F	T	N	D	E	V	C	S	D	S	Y	V	C	P	F	N	P	F	A	S	V	A	P	E	V	S	S	K	V	A	K	G	N	E	D	Y	G	I	A	--	D	N	S	E	D	A	V	E	G	M	G	A	67					
Model_03	D	P	T	V	E	N	D	I	V	D	A	F	R	L	D	E	T	P	E	T	K	A	Y	T	G	Y	I	R	K	Y	I	K	R	V	T	A	H	L	E	E	N	A	P	D	K	V	T	S	F	K	D	D	I	Q	K	F	V	K	H	V	L	G	130
3p3k.1.A	D	--	V	E	H	D	I	V	D	F	O	L	D	E	T	P	E	T	K	A	Y	T	G	Y	I	R	K	Y	I	K	R	V	T	A	H	L	E	E	N	A	P	D	V	L	F	K	I	R	A	Q	F	K	H	L	130								
Model_03	N	F	S	D	P	E	P	Y	G	E	S	L	D	L	E	A	G	L	I	Y	A	Y	N	G	E	E	L	A	P	R	L	V	Y	K	E	A	L	T	E	E	Y	175																					
3p3k.1.A	N	F	S	D	P	E	P	Y	G	E	S	L	D	M	E	A	G	L	I	Y	A	Y	N	G	E	E	L	T	P	R	V	Y	K	E	A	L	T	E	E	Y	175																						

Figura 31. Alineamiento de la estructura terciaria de TCTP de *P. falciparum* (3p3k.1.A) y de la secuencia consenso predicha de las secuencias obtenidas de *B. bovis* (Model\_03). Las flechas verdes sobre las secuencias indican la predicción de láminas  $\beta$  y los recuadros lilas las hélices  $\alpha$ .

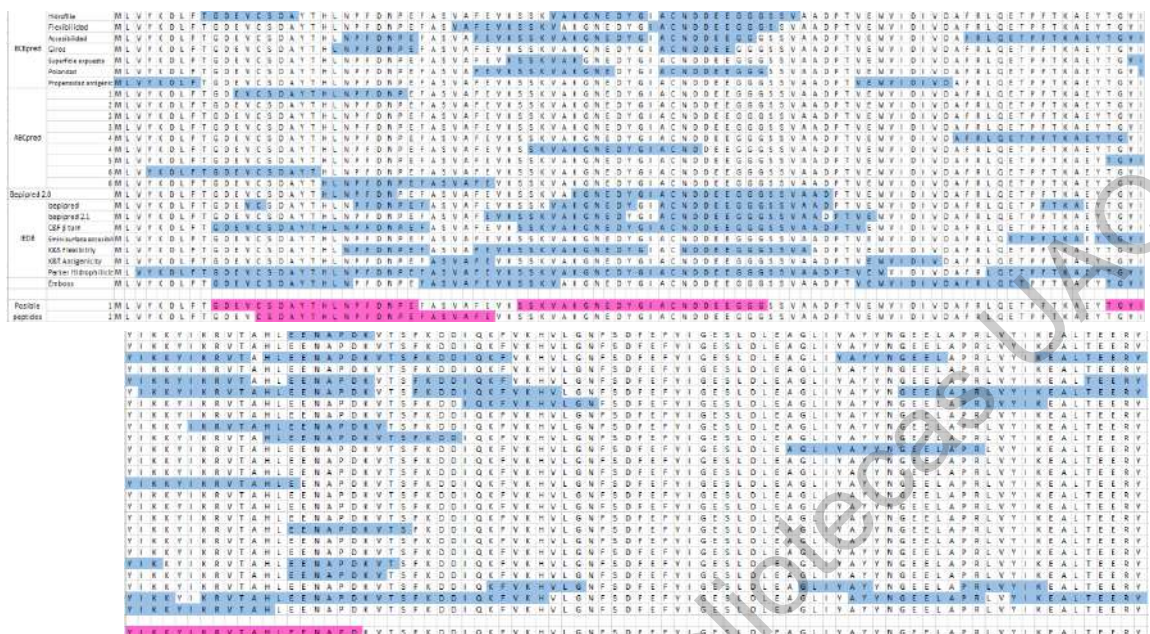


Figura 32. Predicción de regiones con probabilidad de ser epítomos B, las marcas azules indican las regiones predichas por las diferentes herramientas bioinformáticas y en rosa las regiones seleccionadas para sintetizar como péptidos.

<b>Péptido TCTP I</b>	<b>Péptido TCTP III</b>
GDEVCSDAYTHLNPFDNPE	TGYIKKYIKRVTAHLEENAPD
Tamaño del péptido: 19 aminoácidos	Tamaño del péptido: 21 aminoácidos
Localización en la secuencia de aminoácidos: 10-28	Localización en la secuencia de aminoácidos: 92-112
<b>Péptido TCTP II</b>	<b>Péptido TCTP IV</b>
SSKVAKGNEDYGIACNDDEEGGG	CSDAYTHLNPFDNPEFASVAFE
Tamaño del péptido: 23 aminoácidos	Tamaño del péptido: 22 aminoácidos
Localización en la secuencia de aminoácidos: 38-60	Localización en la secuencia de aminoácidos: 14-35

Figura 33. Características de los péptidos seleccionados para sintetizarse, con tamaño y localización dentro de la secuencia de aminoácidos del gen de *tctp* de *B. bovis*.

### 7.3 EVALUACIÓN EL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TCTP DE *B. BOVIS* EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.

#### 7.3.1 Inmunofluorescencia indirecta.

##### 7.3.1.1 Inmunofluorescencia indirecta con suero de conejos

Se usaron los sueros pre inmunización y de la 3ª inmunización como anticuerpo primario, usando como referencia los sueros pre inmunización de cada conejo. Se analizó que en el suero de los conejos inmunizados con el péptido I se observaron, en el suero del conejo 8, eritrocitos infectados con una fluorescencia con distribución citoplasmática y, en el conejo 10, no se observan claramente los merozoítos de *B. bovis* (figura 34). En las laminillas donde se usó el suero de la 3ª inmunización de conejos inmunizados con el péptido II, en los conejos 12 y 14, se observaron eritrocitos infectados (figura 35). Cuando se usó el suero de la 3ª inmunización de conejos inmunizados con el péptido III, en los conejos 20 y 22 no se observaron claramente eritrocitos infectados (figura 36) y, en las que se usó el suero de la 3ª inmunización de conejos inmunizados con el péptido IV, se puede observar, en el suero del conejo 17, eritrocitos infectados con fluorescencia con distribución citoplasmática, mientras que, en el conejo 19, no se observan claramente los merozoítos de *B. bovis* (figura 37). Al no tener señales positivas claras se decidió hacer dos inmunizaciones más. Sin embargo, se logró observar que los péptidos son inmunogénicos debido a que se observó señal positiva. La señal no fue observada cuando el frotis con glóbulos rojos infectado fue incubado con el suero pre inmunización o el suero de los conejos control inmunizados con adyuvante.

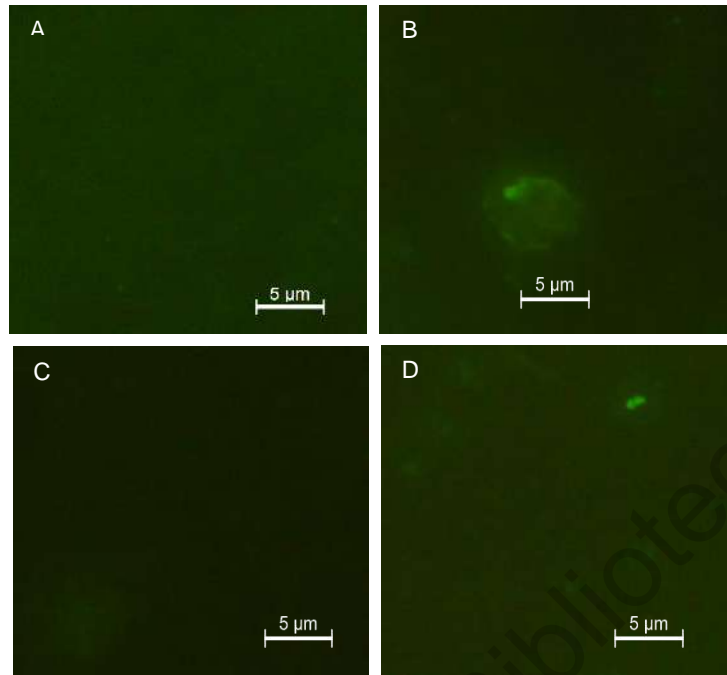


Figura 34. Inmunofluorescencia del suero de los conejos inmunizados con el péptido I de *TCTP* de *B. bovis*, a una dilución 1:50. A: suero pre inmunización conejo 8, B: suero pre inmunización conejo 10, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 8, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 10.

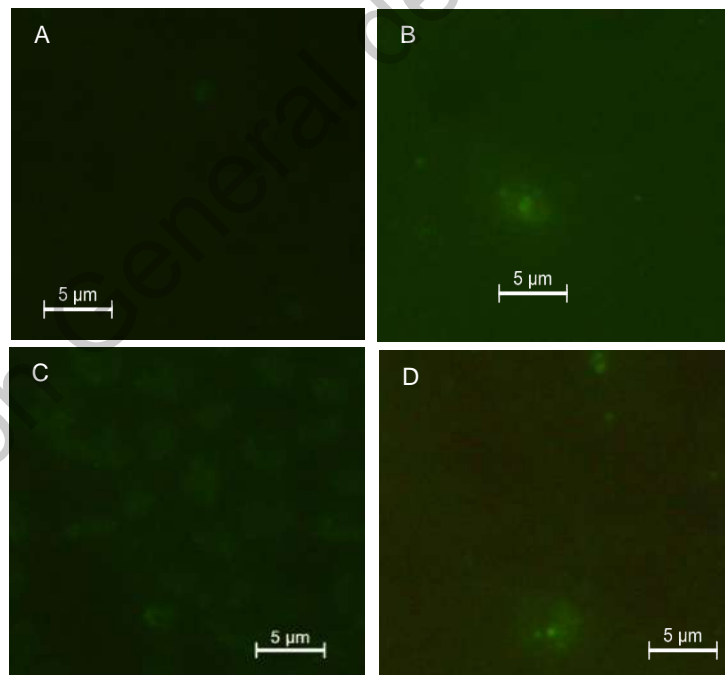


Figura 35. Inmunofluorescencia del suero de los conejos inmunizados con el péptido II de *TCTP* de *B. bovis*, a una dilución 1:50. A: suero pre inmunización conejo 12, B: suero pre inmunización conejo 14, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 12, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 14.



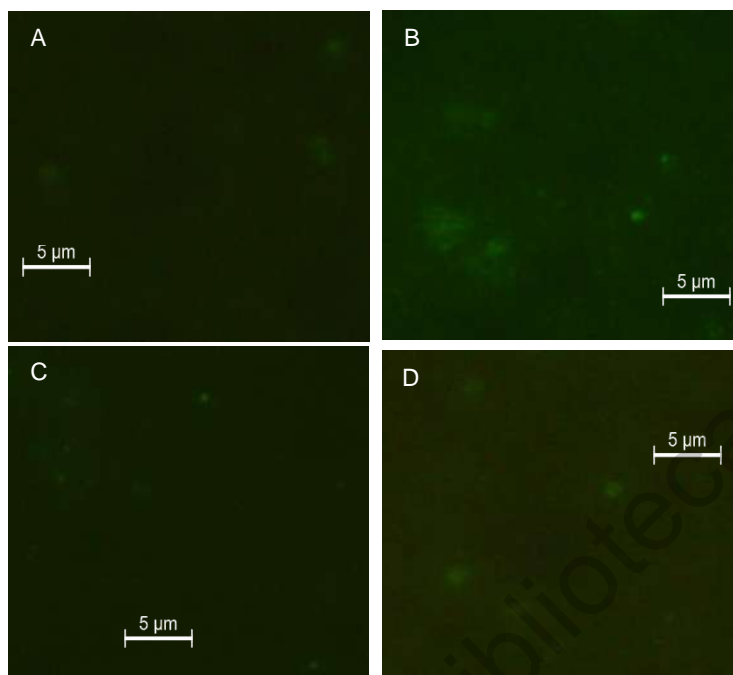


Figura 36. Inmunofluorescencia del suero de los conejos inmunizados con el péptido III de *TCTP* de *B. bovis*, a una dilución 1:50. A: suero pre inmunización conejo 20, B: suero pre inmunización conejo 22, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 20, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 22.

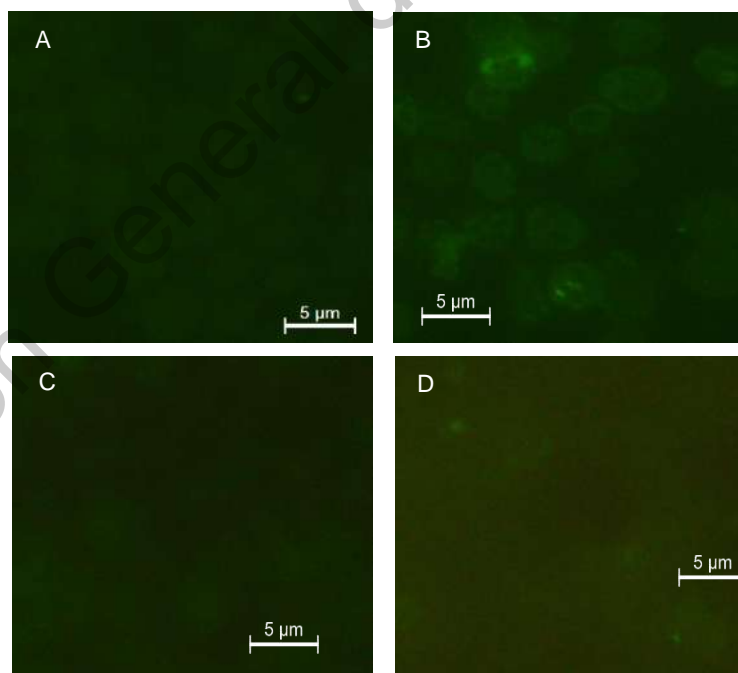


Figura 37. Inmunofluorescencia del suero de los conejos inmunizados con el péptido IV de *TCTP* de *B. bovis*, a una dilución 1:50. A: suero pre inmunización conejo 7, B: suero pre inmunización conejo 19, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 7, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización conejo 19.

### 7.3.1.2 Inmunofluorescencia indirecta suero de bovinos, segunda inmunización.

Para examinar la presencia de anticuerpos circulantes en los bovinos, después de la 2da inmunización se hicieron pruebas de Inmunofluorescencia indirecta usando como anticuerpo primario el suero de dos bovinos de cada grupo (control y vacunados). En las IFI con el suero de la segunda inmunización de los animales del grupo vacunado (7294 y 7279) se observaron eritrocitos parasitados (figura 38), mientras que en los frotis de eritrocitos infectados con *B. bovis* incubados con el suero pre inmunización y el suero del grupo control inmunizado con adyuvante (7280 y 9631) no se observaron señales claras de eritrocitos infectados (figura 39); por lo que se decidió empezar con el desafío. Los controles negativo y positivo en laminilla tuvieron resultados correspondientes (figura 40).

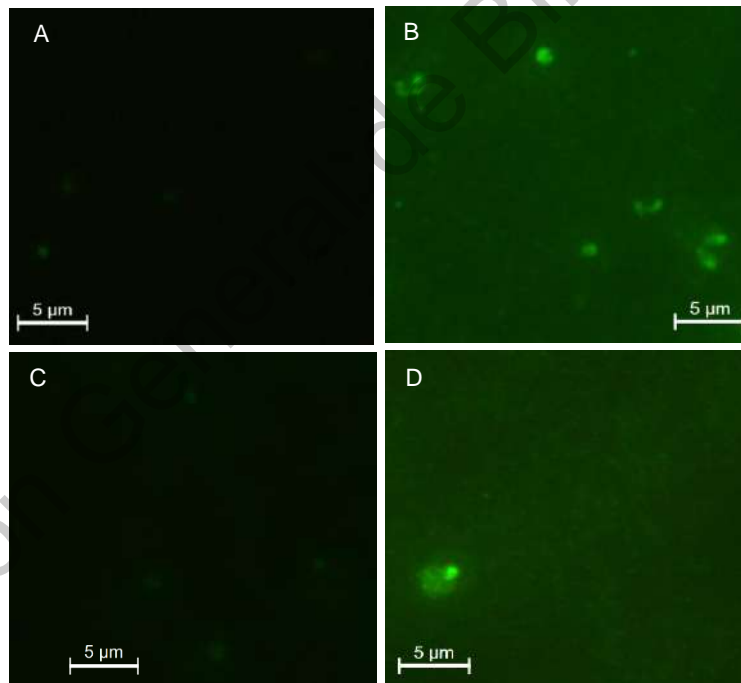


Figura 38. Inmunofluorescencia indirecta del suero de la 2ª inmunización de los bovinos inmunizados con la mezcla de péptidos de *TCTP* de *B. bovis*, a una dilución 1:60. A: suero pre inmunización bovino 7294, B: suero pre inmunización bovino 7279, C: suero 2ª inmunización bovino 7294, D: suero 2ª inmunización bovino 7279.

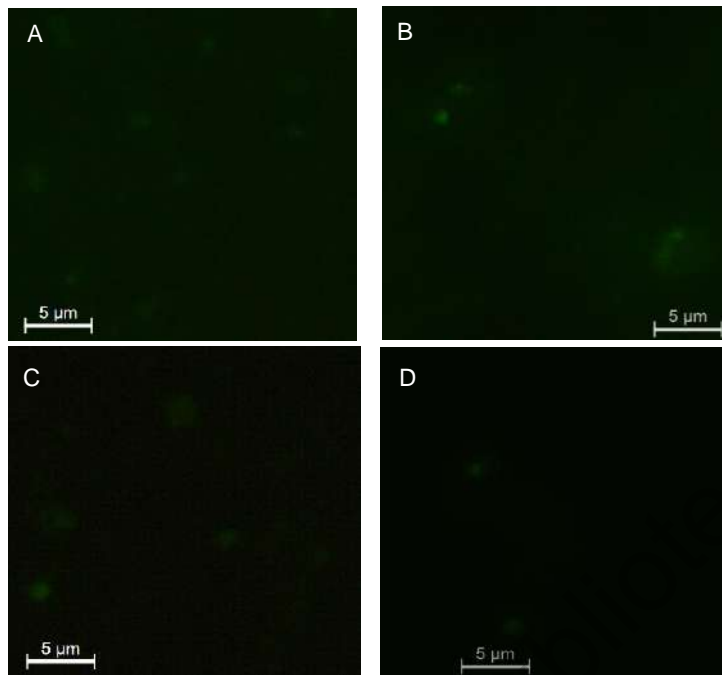


Figura 39. Inmunofluorescencia indirecta del suero de la 2ª inmunización de los bovinos del grupo control A: suero pre inmunización bovino 7280, B: suero pre inmunización bovino 9631, C: suero 2ª inmunización bovino 7280, D: suero 2ª inmunización bovino 9631.

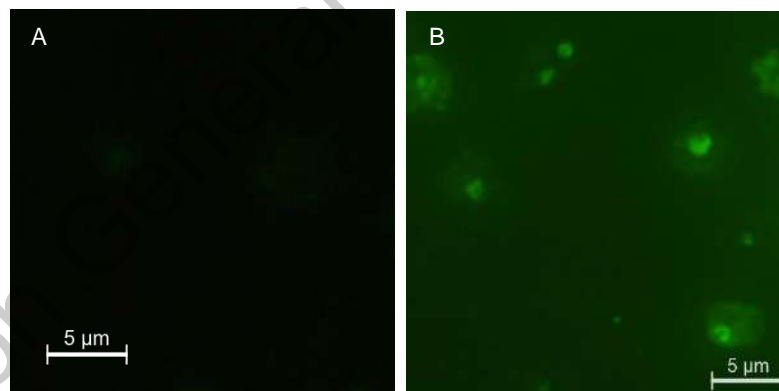


Figura 40. Controles de la inmunofluorescencia indirecta con suero de bovinos. A: Control negativo de la laminilla, inmunofluorescencia con suero de un bovino sano no infectado. B: Control positivo de la laminilla, inmunofluorescencia indirecta con suero de un bovino infectado con *B. bovis*.

### 7.3.1.3 Inmunofluorescencia indirecta suero de bovinos, tercera inmunización.

Para evitar observar reacciones inespecíficas en la IFI, se bloquearon los frotis de eritrocitos lavados infectados con *B. bovis*, con suero de conejo sano antes de poner el suero de los bovinos; se usó el suero de los bovinos pre inmunización y de la 3<sup>a</sup> inmunización, usando como anticuerpo secundario DAPI y Alexa 488. En los frotis de eritrocitos infectados con *B. bovis* incubados con el suero de los animales del grupo control inmunizados con adyuvante no se observaron eritrocitos infectados (figura 41 a 44), de igual manera que al ser incubados con los sueros pre inmunización. En el grupo de animales vacunados, con el suero del becerro 7289 se observa pocos eritrocitos infectados correspondientes con el frotis marcado con DAPI (figura 45), en la IFIs con los sueros de los becerros 7279 y 7294 se observan eritrocitos infectados correspondientes con las marcas por DAPI, aunque no se ven claramente (figura 46 y 47 respectivamente) y, en el becerro 9648 se observan claramente los eritrocitos infectados correspondientes con la tinción con DAPI (figura 48). Los controles negativo y positivo en laminilla tuvieron resultados correspondientes (figura 49).

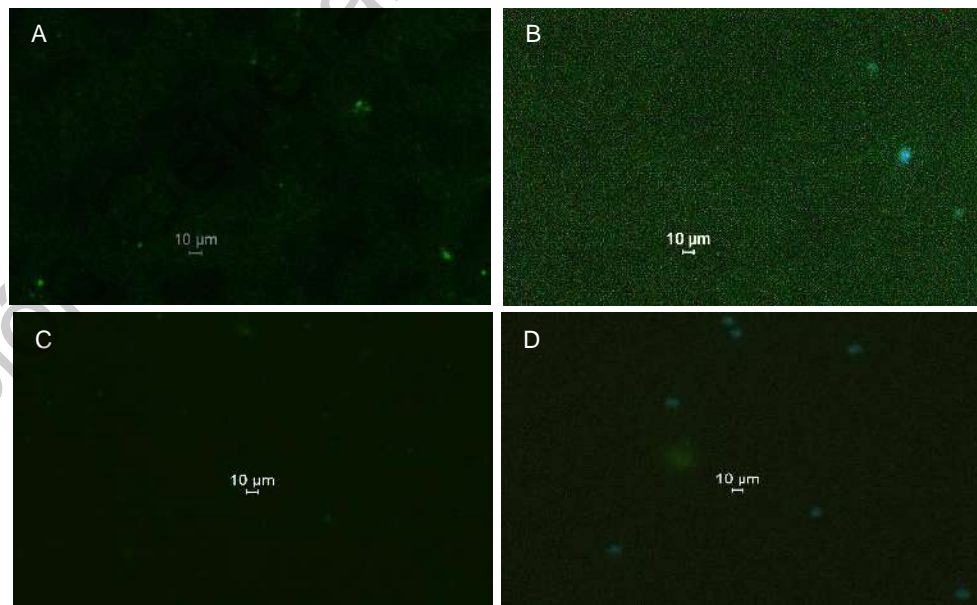


Figura 41. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7281 del grupo control. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

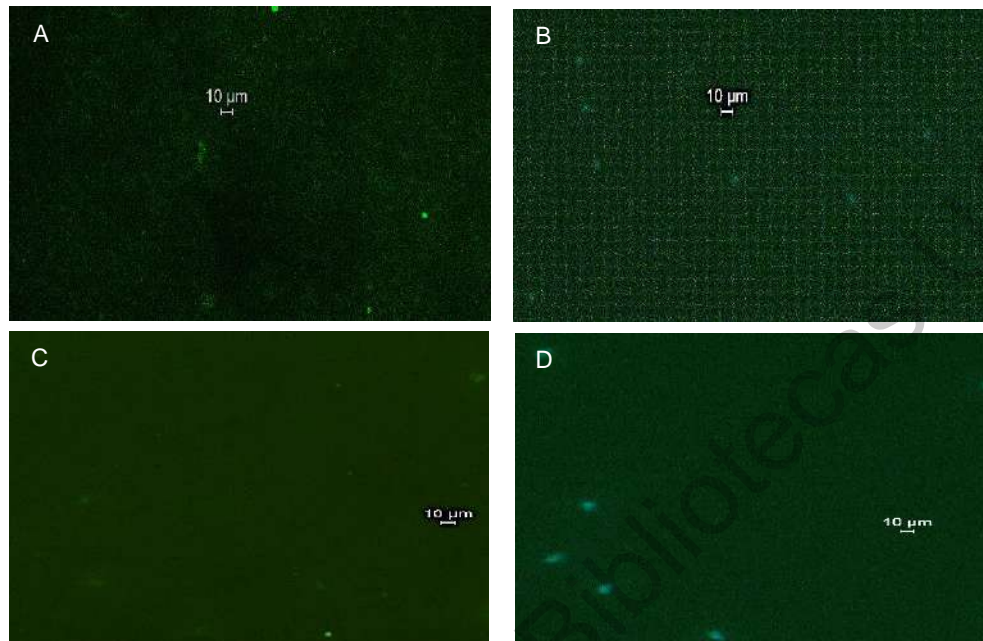


Figura 42. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 9631 del grupo control. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

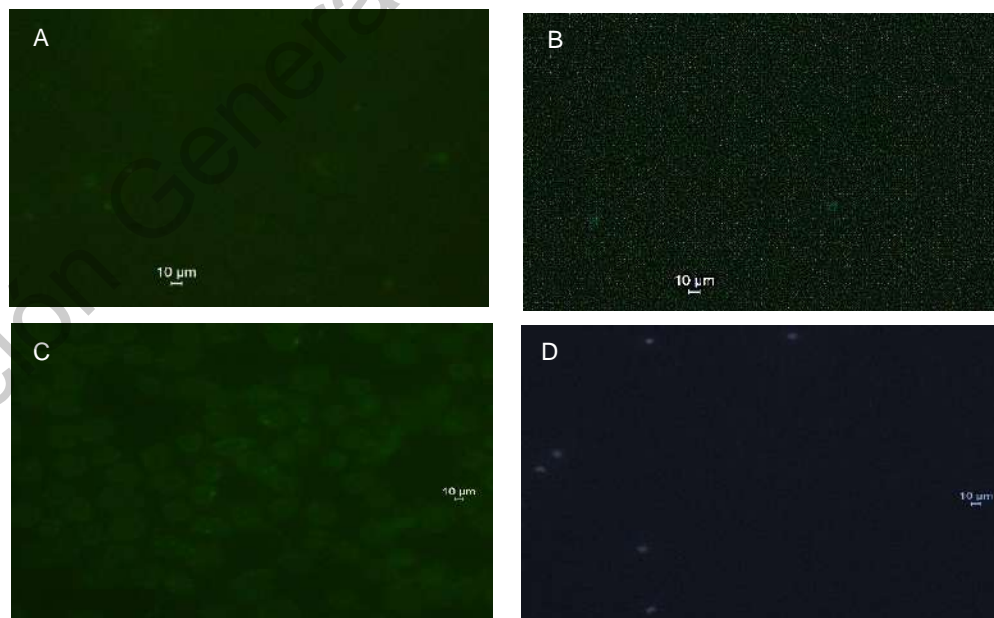


Figura 43. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7288 del grupo control A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

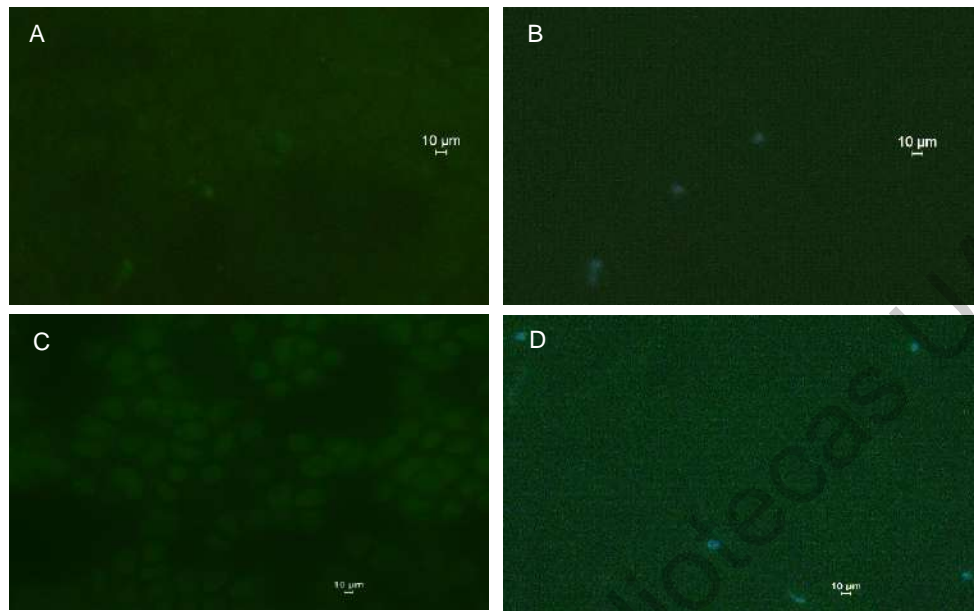


Figura 44. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7280 del grupo control. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

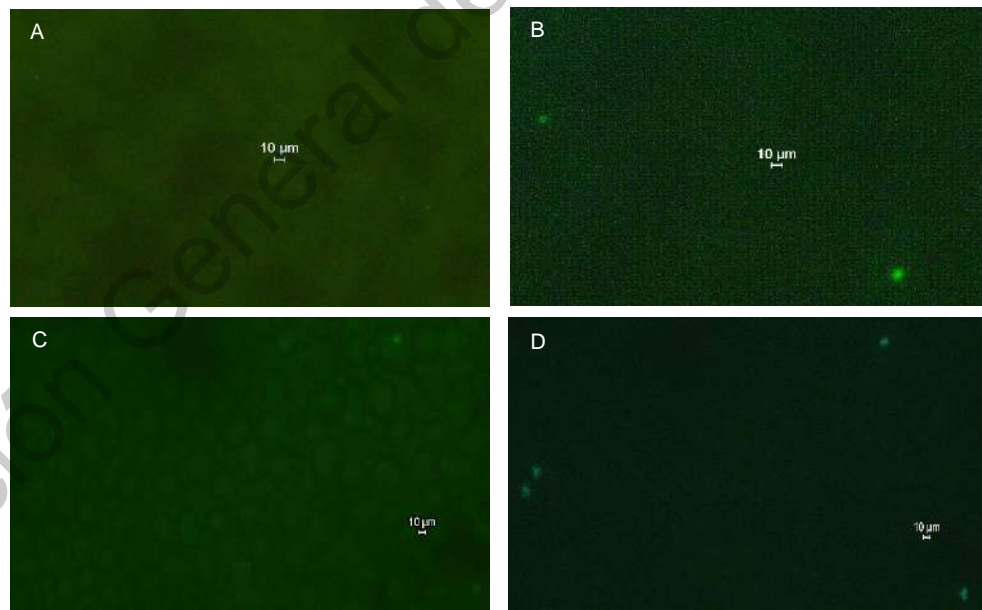


Figura 45. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7289 del grupo inmunizado. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

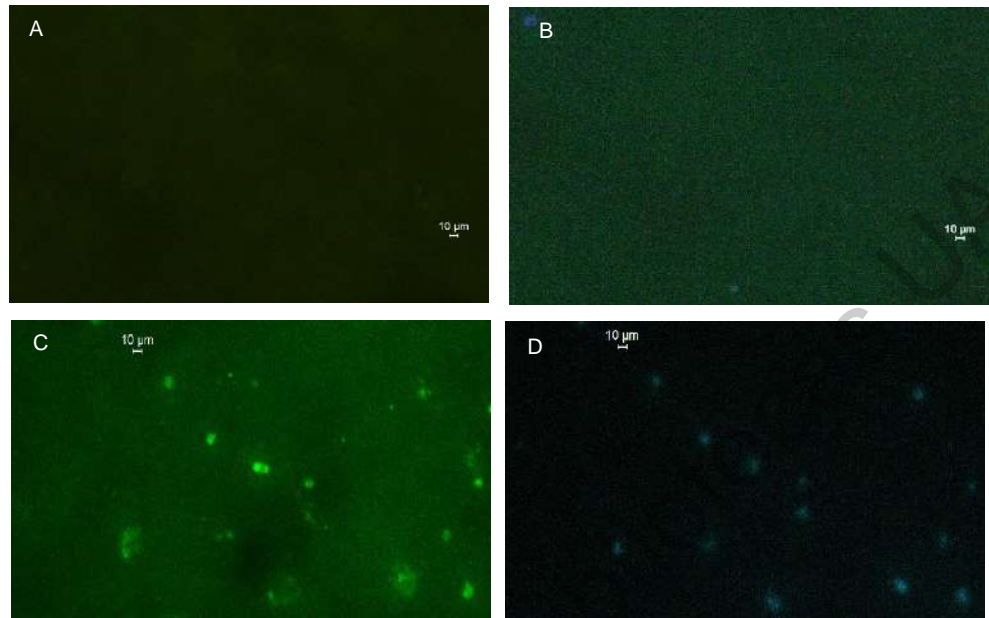


Figura 46. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7279 del grupo inmunizado. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

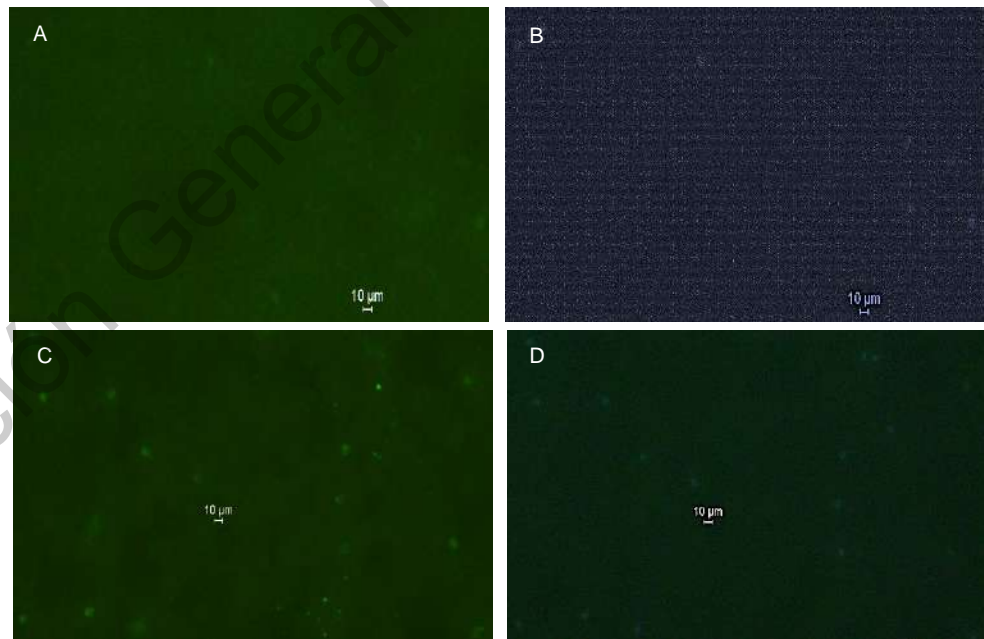


Figura 47. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 7294 del grupo inmunizado. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

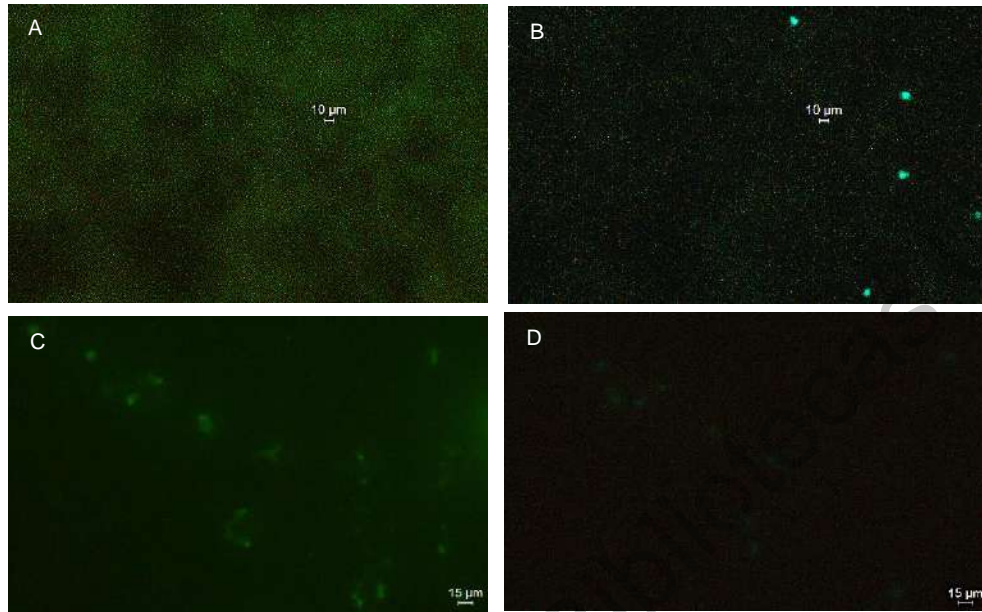


Figura 48. Inmunofluorescencia indirecta del suero del becerro 9648 del grupo inmunizado. A: suero pre inmunización Alexa 488, B: suero pre inmunización DAPI, C: suero 3<sup>a</sup> inmunización Alexa 488, D: suero 3<sup>a</sup> inmunización DAPI.

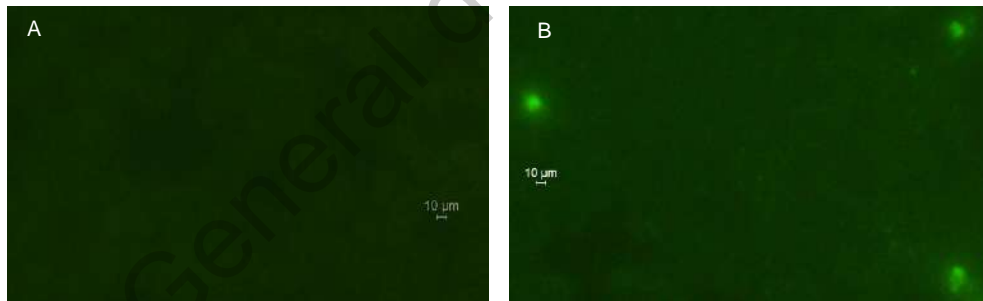


Figura 49. Controles de las laminillas utilizadas en la prueba de inmunofluorescencia indirecta. A. control negativo de la laminilla, inmunofluorescencia indirecta con suero de un bovino sano no infectado. B: control positivo de la laminilla, inmunofluorescencia indirecta con suero de un bovino infectado con *B. bovis*.



### 7.3.2 Evaluación de la respuesta en los bovinos.

Se realizó un examen físico diario a los bovinos, midiendo y registrando diariamente los parámetros por 15 días. Los registros de los animales se promediaron y se sacó la desviación estándar por grupo, se verificó la diferencia estadísticamente significativa usando prueba de T de Student a través del análisis de datos de Excel®.

- Temperatura corporal: en el grupo control se registró un aumento de la temperatura mayor a 40.5° entre el día 7 post infección (7288 y 9631) y el día 8 post infección (7280 y 7281), el becerro 7280 tuvo temperatura mayor a 40.5°C por 4 días y los becerros 7281 y 9631 por 5 días hasta que fueron tratados, el 7288 tuvo más de 40.5°C por 5 días, pero la temperatura empezó a disminuir de forma natural (Cuadro 10, figura 50). La temperatura corporal en promedio del grupo control se elevó más rápido con respecto al grupo vacunado y, se observó una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los grupos en los días 10 y 11 post desafío.

Días post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
2	39.525	0.449	39.3	0.308
3	39.225	0.228	39.025	0.370
4	40.2	0.354	39.475	0.370
5	39.225	0.415	39.65	0.433
6	39.6	0.394	39.725	0.334
7	40.275	0.438	40	0.644
8	40.875	0.426	40.675	0.487
9	40.85	0.35	40.85	0.320
10	40.95	0.415	41.2	0.367
11	41.475	0.228	40.775	0.356
12	40.4	1.032	39.95	0.618

Cuadro 10. Promedio y desviación estándar diaria por grupo de la temperatura corporal en grados centígrados.

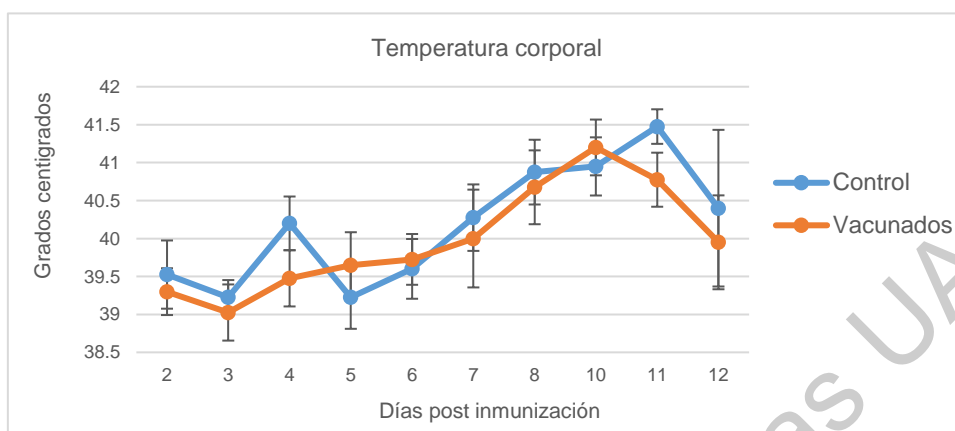


Figura 50. Gráfico con promedio y desviación estándar de la temperatura corporal por grupo.

- Frecuencia cardiaca: En general en ambos grupos se registró una frecuencia cardiaca mayor a las referencias (60-80 lpm) (Jackson & Cockcroft, 2002), a partir del día 5 post desafío en el grupo control y del día 5 post desafío en el grupo vacunado, con una diferencia significativa entre los días 10 a 12 post desafío ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 11, figura 51).

Días post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
4	75.0	15.843	74.0	20.494
5	75.0	13.379	81.0	14.248
6	93.0	9.539	101.0	15.330
7	86.5	7.399	79.5	8.047
8	85.0	15.588	92.0	16.248
9	94.0	6.633	95.0	15.588
10	100.0	6.928	106.0	10.770
11	96.0	11.662	110.0	24.413
12	94.7	10.499	103.0	12.450

Cuadro 11. Promedio y desviación estándar diaria por grupo de la frecuencia cardiaca, en latidos por minuto (lpm).

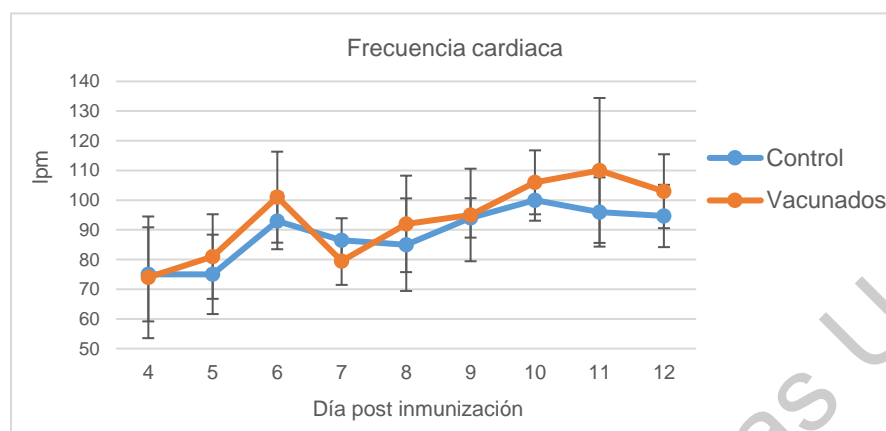


Figura 51. Gráfico con promedio y desviación estándar de la frecuencia cardiaca diaria por grupo.

- Frecuencia respiratoria: En general en ambos grupos se registró una frecuencia respiratoria mayor a las referencias (15-30 rpm) (Jackson & Cockcroft, 2002) mayor a las referencias (60-80 lpm), con una diferencia significativa entre los días 11 a 12 post desafío ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 12, figura 52).

Días post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
2	50	6.000	48	5.65685425
3	39	3.317	46	9.16515139
4	46	10.392	50	7.21110255
5	44	11.662	48	10.198039
6	52.5	7.794	43	6.40312424
7	39.5	9.937	39	6.40312424
8	60	18.547	59	16.583124
9	56	12.961	71	25.6709953
10	61	25.199	66	15.3622915
11*	56.5	16.394	73	24.7184142
12*	42.67	1.886	56	8.48528137

Cuadro 12. Promedio y desviación estándar diaria por grupo de la frecuencia respiratoria, en respiraciones por minuto. El asterisco indica diferencia significativa entre los días.

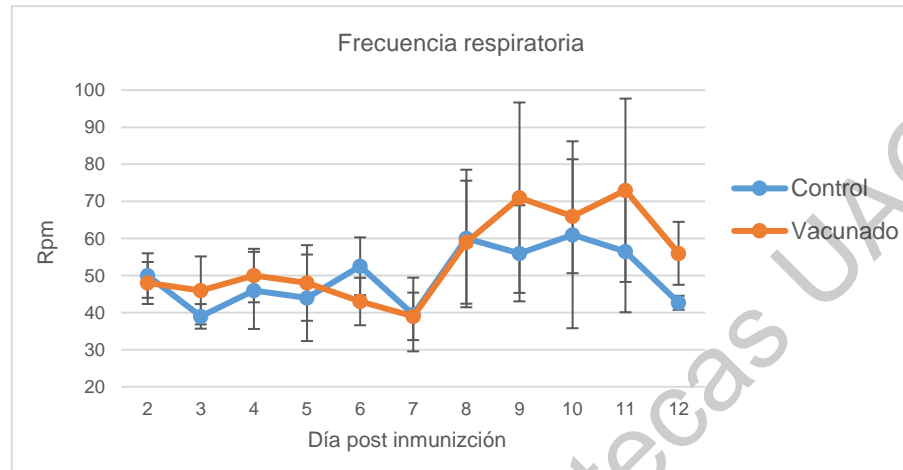


Figura 52. Gráfico con promedio y desviación estándar de la frecuencia respiratoria diaria por grupo.

- Tiempo de llenado capilar: En general en ambos grupos el tiempo de llenado capilar se mantuvo ligeramente arriba de los rangos de referencia ( $\leq 2$  segundos) (Jackson & Cockcroft, 2002), pero se mantuvo menor a 5 segundos, indicando que hay un problema menor, sin llegar a ser un tiempo anormal (Jackson & Cockcroft, 2002). Se observó una diferencia significativa de los días 9 a 12 post desafío ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 13, figura 53).

Día post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
2	2.3	0.957	2.5	0.957
3	2.3	0.500	2	0.500
4	3.0	0	2.25	0
5	2.5	0.577	2.5	0.577
6	2.0	0	2.25	0
7	2.0	0	2	0
8	2.5	0.577	2.5	0.577
9	2.5	0.577	3.5	0.577
10	3.0	0.816	2.5	0.816
11	2.8	0.500	3.25	0.500
12	3.3	0.577	2.75	0.577

Cuadro 13. Promedio y desviación estándar diaria por grupo del tiempo de llenado capilar, en segundos.

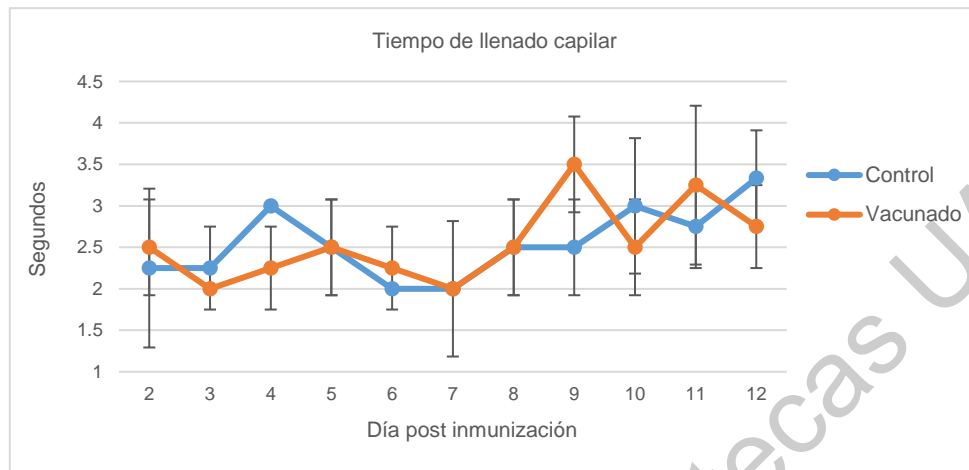


Figura 53. Gráfico con promedio y desviación estándar del tiempo de llenado capilar diario por grupo.

- Volumen celular aglomerado: En el grupo control, los días 12 y 13 post infección se mostró en promedio menor en el hematocrito (16%) (Cuadro 14, figura 54) y, la mayor disminución del porcentaje del hematocrito (40.69%) fue el día 12 post infección (Cuadro 15, figura 55). En el grupo vacunado, el día 12 post infección se observó un promedio menor en el hematocrito (16.5%) (Cuadro 14, figura 54) y, la mayor disminución en el porcentaje del hematocrito (39.58%) fue el día 12 post infección (Cuadros 15, figura 55). El volumen celular aglomerado estuvo por debajo del límite inferior de las referencias (24-26%) (Jackson & Cockcroft, 2002) a partir del día 10 post desafío, sin diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de hematocrito, pero si hay en el porcentaje de disminución del hematocrito en los días 8 y 9 post infección ( $P \leq 0.05$ ).

Día post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
2	26.75	3.403	27.5	4.933
3	26	3.367	27.5	5.447
4	26.75	3.202	28.25	2.872
5	24.75	2.986	27.25	4.349
6	23.75	4.992	24.25	4.349
7	24	5.477	24.75	3.948
8	25.25	5.560	24	4.082
9	24.75	7.411	22	5.228
10	21.25	5.560	19.75	4.573
11	18.75	5.377	18.5	4.655
12	16	3.367	16.5	3.873
13	16	2.944	16.75	3.775
14	16.5	3.109	17.25	3.594
15	16.75	3.775	17.5	4.203

Cuadro 14. Promedio y desviación estándar diaria por grupo del hematocrito, en porcentaje.

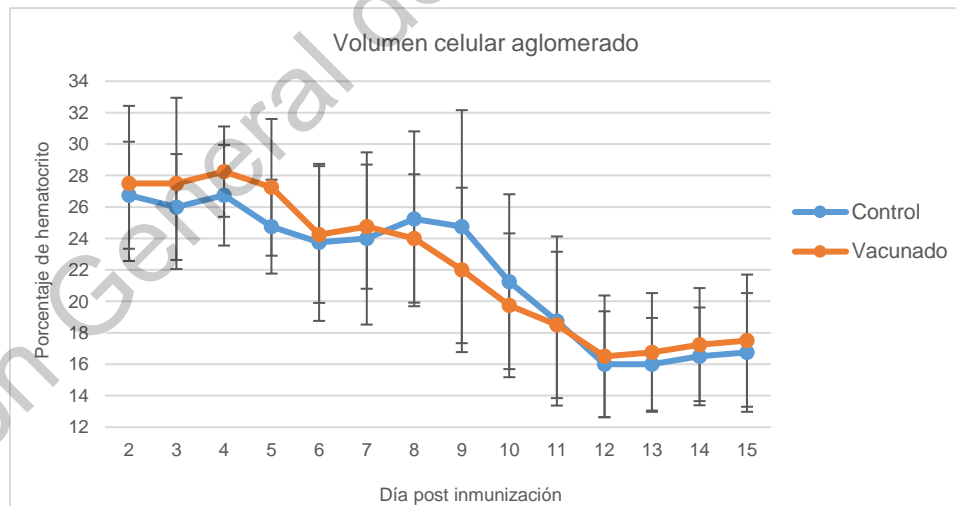


Figura 54. Gráfico con promedio y desviación estándar del hematocrito diario por grupo.

Grupo	Animal	Día post inmunización					
		10	11	12	13	14	15
Control	7280	27.27	45.45	50.00	36.36	40.91	45.45
	7281	10.71	21.43	35.71	53.57	46.43	42.86
	9631	10.00	20.00	40.00	36.67	33.33	30.00
	7288	37.04	37.04	37.04	33.33	33.33	33.33
	<b>Promedio</b>	<b>21.26</b>	<b>30.98</b>	<b>40.69</b>	<b>39.98</b>	<b>38.50</b>	<b>37.91</b>
	<b>DE</b>	<b>13.20</b>	<b>12.36</b>	<b>6.46</b>	<b>9.18</b>	<b>6.38</b>	<b>7.41</b>
Inmunizado	7279	9.52	19.05	28.57	33.33	33.33	38.10
	7289	25.00	28.57	42.86	39.29	35.71	28.57
	7294	24.24	27.27	33.33	33.33	33.33	33.33
	9648	50.00	53.57	53.57	50.00	46.43	46.43
	<b>Promedio</b>	<b>27.19</b>	<b>32.12</b>	<b>39.58</b>	<b>38.99</b>	<b>37.20</b>	<b>36.61</b>
	<b>DE</b>	<b>16.79</b>	<b>14.91</b>	<b>11.06</b>	<b>7.86</b>	<b>6.25</b>	<b>7.62</b>

Cuadro 15. Promedio y desviación estándar diaria por grupo, control o vacunado, del porcentaje de disminución de hematocrito.

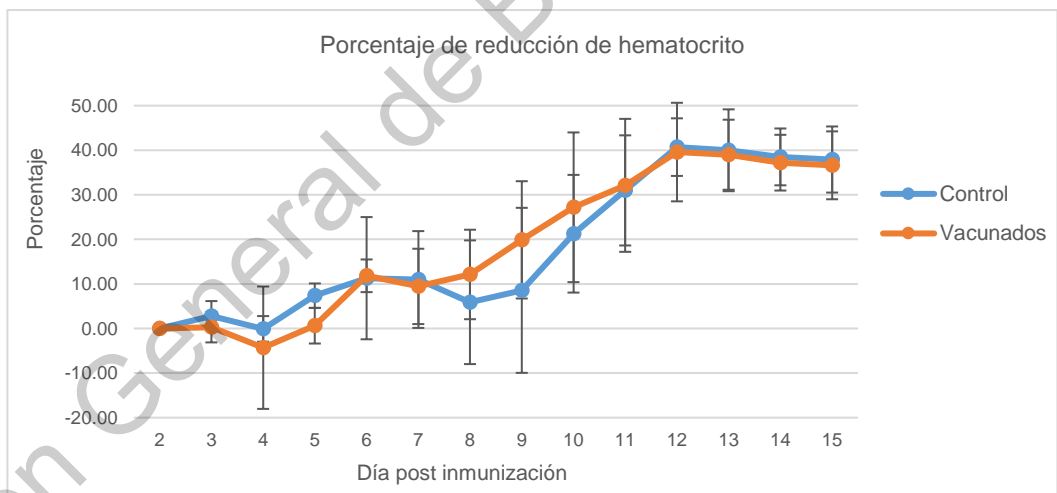


Figura 55. Gráfico con promedio y desviación estándar del porcentaje de disminución del hematocrito diario por grupo.

- Porcentaje de eritrocitos infectados: en ambos grupos se observaron eritrocitos parasitados en los frotis de sangre venosa, en el grupo control se observó hasta un 0.45% de eritrocitos infectados en los animales 7281 y 7288 en los días 10 y 11 post infección, respectivamente; en el grupo vacunado se observó hasta un 0.35% en el becerro 7289 al día 9 post

infección (Cuadro 16, figura 56); se observó una diferencia estadísticamente significativa en el día 12 post infección ( $P \leq 0.05$ ).

Día post inmunización	Control		Vacunado	
	Promedio	D.E.	Promedio	D.E.
6	0.03	0.025	0.01	0.022
7	0.03	0.025	0.01	0.022
8	0.13	0.103	0.14	0.089
9	0.19	0.134	0.16	0.114
10	0.24	0.160	0.19	0.054
11	0.18	0.160	0.13	0.075
12	0.12	0.131	0.05	0.035

Cuadro 16. Promedio y desviación estándar diaria por grupo, control o vacunado, del porcentaje de eritrocitos infectados.

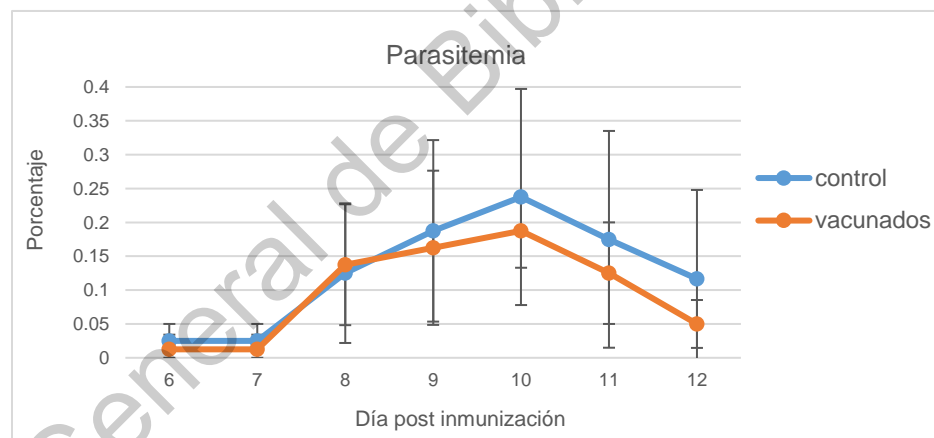


Figura 56. Gráfico con promedio y desviación estándar del porcentaje de eritrocitos infectados diario por grupo.

Un aspecto importante observado fue el comportamiento de los animales, en el grupo control se observaron los animales con ánimo de regular a malo, observándose letárgicos y deprimidos a partir del día 9 post infección hasta que se determinó la muerte experimental (figura 57 y 58); los animales del grupo vacunado mantuvieron un buen ánimo y rumiando, el día 13 y 14 pos infección algunos animales de este grupo se observaron con un ánimo regular, todos los animales de este grupo recuperaron el buen ánimo a final del estudio. Del grupo control 3 de los 4 animales se determinaron en



muerte experimental el día 13 (7280) y 14 (7281 y 9631) post infección, del grupo vacunado ningún animal fue determinado en muerte experimental (Cuadro 17).

Grupo	Animal	Parásito en frotis sanguíneo	Temperatura >40.5°C más de 3 días	Disminución del hematocrito	Letargia, depresión	Anorexia	Muerte experimental
Control	7280	X	X	X	X	X	X
	7281	X	X		X	X	X
	7288	X	X	X			
	9631	X	X	X	X	X	X
Vacunado	7279	X	X				
	7289	X		X			
	7294	X					
	9648	X	X	X			

Cuadro 17. Signos clínicos observados en cada uno de los animales para determinar la muerte clínica y dar tratamiento.



Figura 57. Becerro 7280 con letargia y depresión. En ambas imágenes se observa el becerro apartado, acostado, letárgico con la cabeza y orejas hacia abajo mientras que el resto de los animales permanecen activos, curiosos y alerta.



Figura 58. Becerros 7281 y 9631 con letargia y depresión. Se observan ambos becerros apartados, acostados y letárgicos con la cabeza y orejas hacia abajo, mientras que el resto de los animales comen y permanecen activos, curiosos y alerta.

Además, se observó la condición corporal de los animales, en el grupo control se observó que los animales tuvieron una pérdida de peso que continuó hasta después de finalizado el estudio, en cambio los animales del grupo vacunado bajaron su condición corporal pero se recuperaron hacia el final del estudio. También, se observó en el grupo control la presencia de problemas digestivos (diarrea en un animal) y problemas respiratorios (tos en dos animales). Como hallazgo en el frotis de sangre venosa de los animales del grupo vacunado a partir del día 13 post infección se observaron signos de regeneración de eritrocitos como metarubricitos y cuerpos de Howell-Jolly.

### 7.3.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

#### 7.3.3.1 Titulación de los péptidos TCTP II,III, IV.

Se titularon los péptidos usando el suero de dos animales de cada grupo (vacunado y control) con diferentes concentraciones de cada uno de los péptidos 8  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$  y se midió la absorbancia a los 10, 15, 20 y 25 minutos a 450 nm. Se observó una mayor diferencia a los 20 minutos con 4 $\mu\text{g/ml}$  de concentración de cada uno de los péptidos (figura 59).

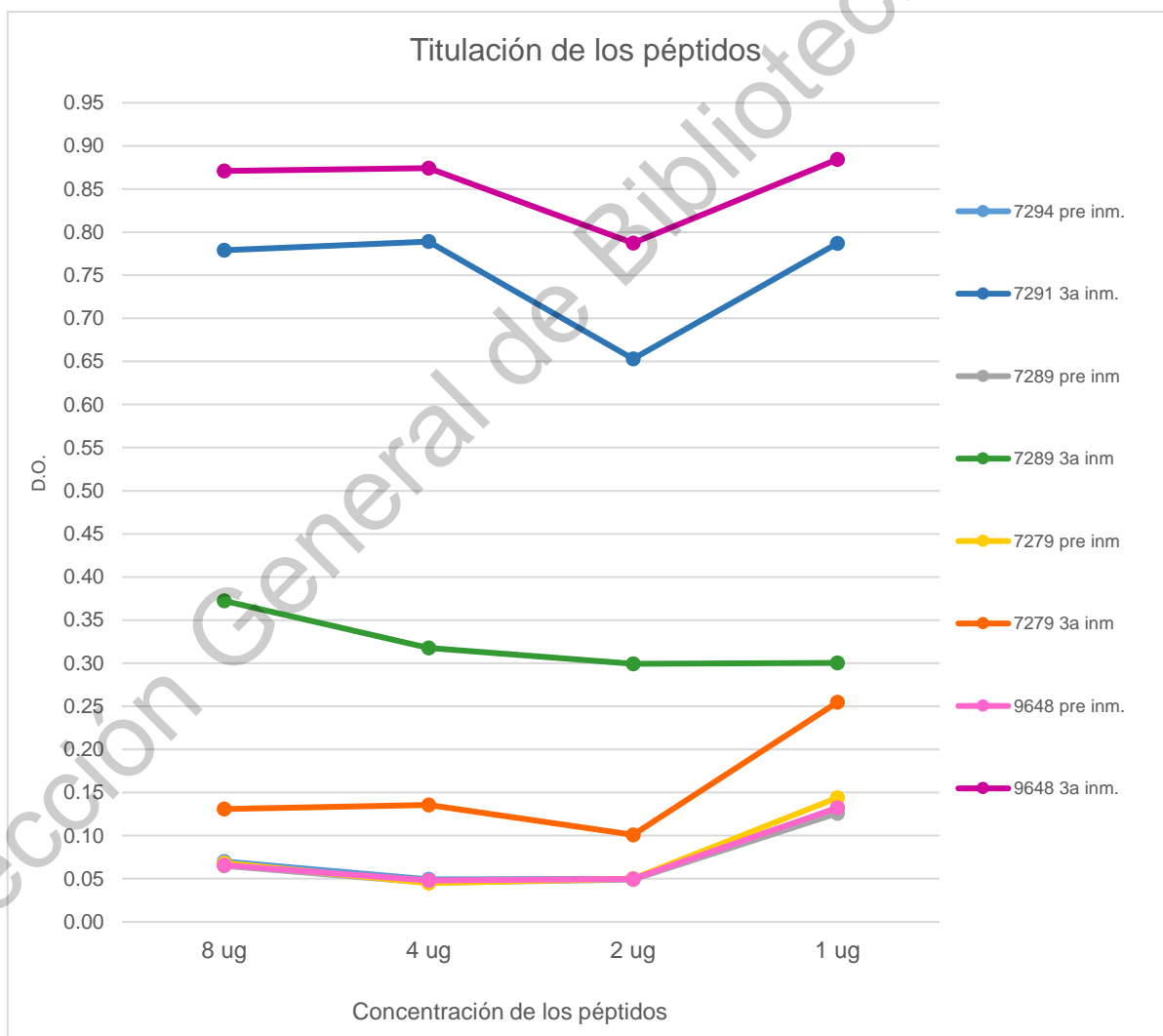


Figura 59. Titulación de los péptidos por ELISA, densidad óptica observada a los 20 minutos.

### 7.3.3.2 Titulación de anticuerpos en suero de bovinos inmunizados y grupo control.

Con los resultados de la titulación de los péptidos se sensibilizaron las placas de ELISA con 4 µg/ml de los péptidos en cada pozo, se colocó el suero pre inmunización y de 3ª inmunización en diluciones seriadas de 1:500 a 1:1 240 000; se midió la absorbancia a los 20 minutos a 450 nm. En los animales del grupo control no se observó diferencia entre el suero pre inmunización y el suero de la 3ª inmunización (figura 60 y 61). En los animales del grupo vacunado se midió un título de anticuerpos en el suero de la 3ª inmunización, se obtuvo un título de anticuerpos de 1:32 000 en los becerros 9648 y 7294 (figura 62 y 63) y 1:2000 en los becerros 7289 y 7279 (figura 64 y 65).



Figura 60. Gráficas de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7281 y 7280, ambos de grupo control.

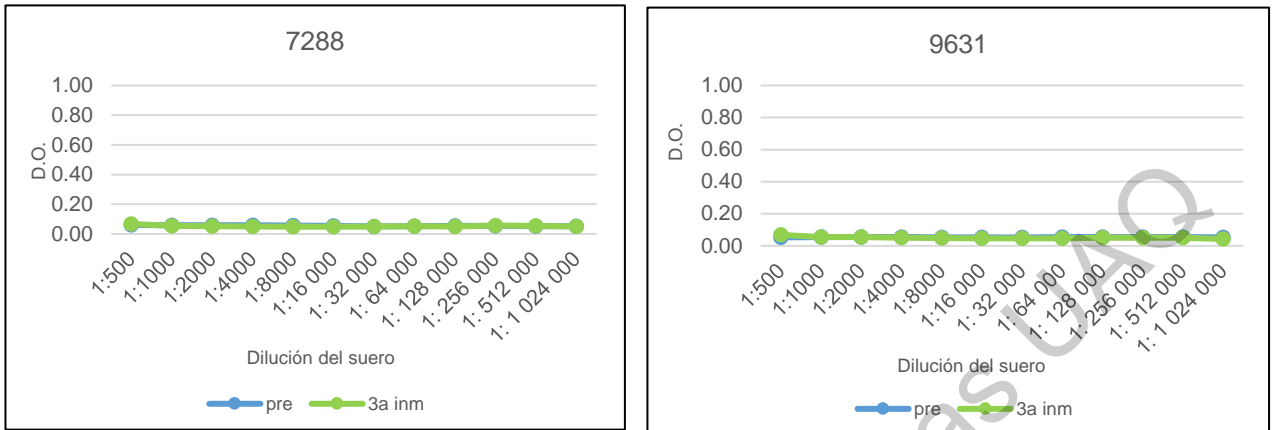


Figura 61 Gráficas de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7288 y 9631, ambos de grupo control.

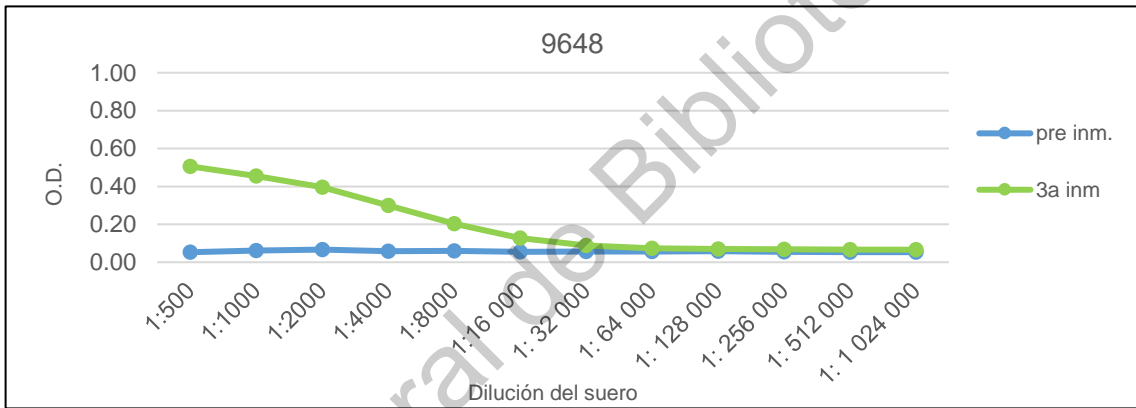


Figura 62. Gráficas de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 9648, del grupo vacunado.

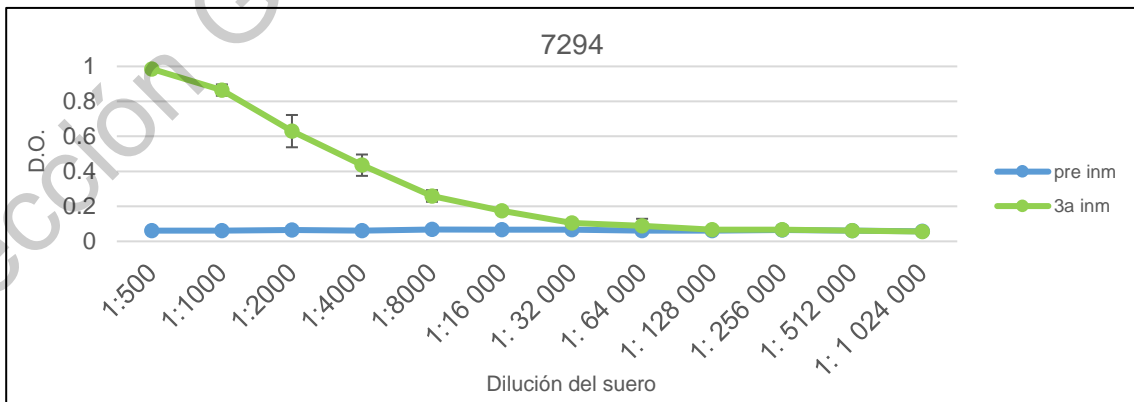


Figura 63. Gráficas de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7294, del grupo vacunado.

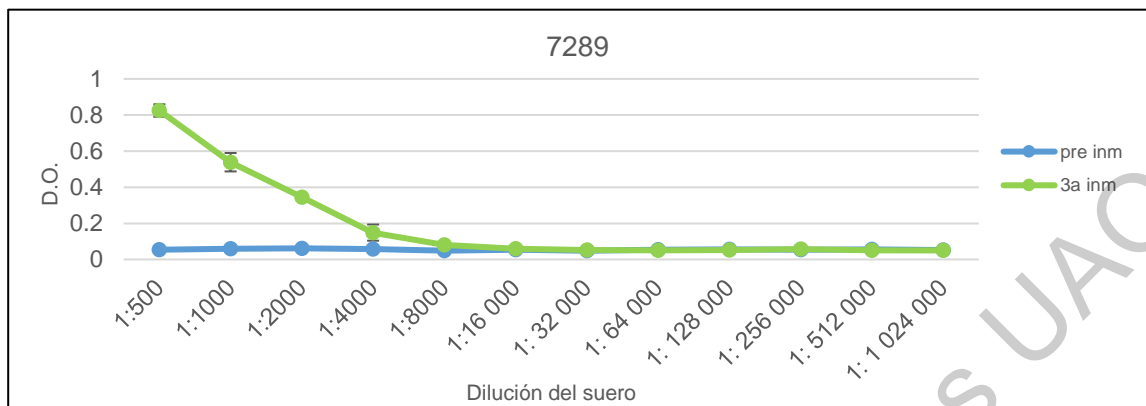


Figura 64. Gráficas de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7289, del grupo vacunado.

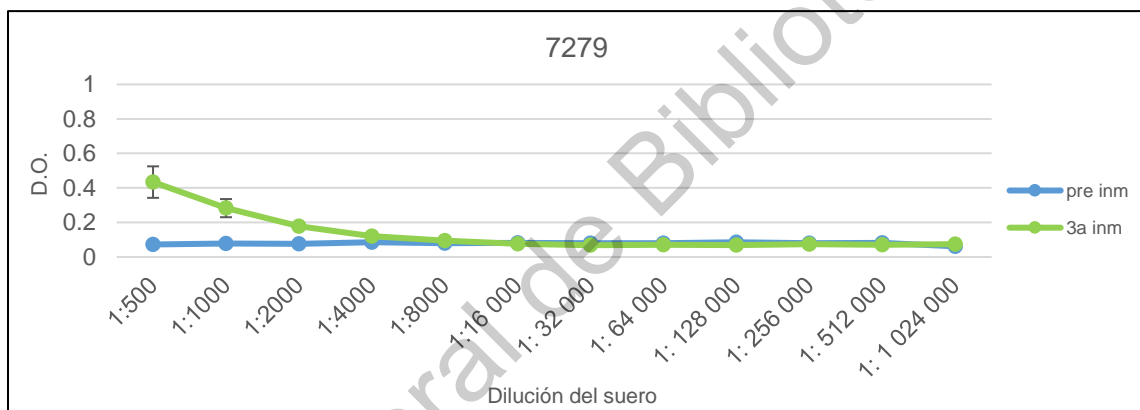


Figura 65. Gráfica de la titulación de anticuerpos usando el suero pre inmunización y de la 3ª inmunización del becerro 7279, del grupo vacunado.

### 7.3.3.3 Determinación de anticuerpos.

Se sensibilizaron las placas con 4µg/ml de cada uno de los péptidos en cada pozo, se colocó el suero pre inmunización, de la 1ª a la 3ª inmunización en una dilución 1:4000; se midió la absorbancia a los 20 min a 450 nm. En los animales del grupo control no se observó diferencia entre las inmunizaciones (figura 66), mientras, en los animales del grupo inmunizado, se observó un aumento de anticuerpos a partir de la segunda inmunización (figura 67).

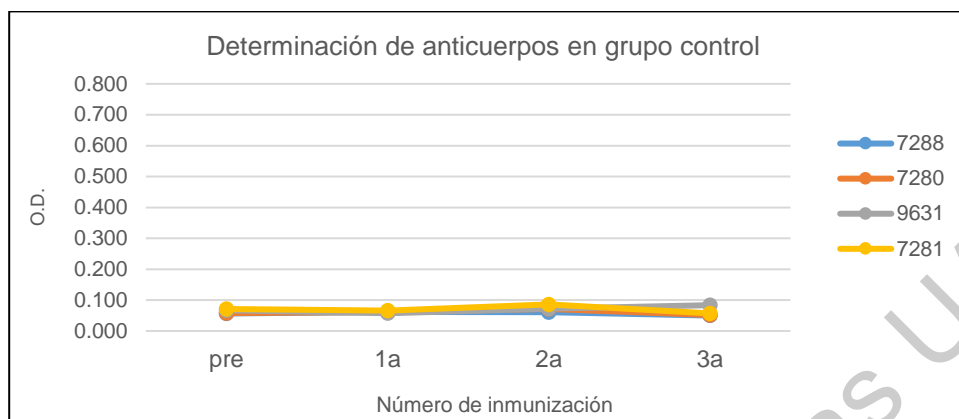


Figura 66. Gráfica de la determinación anticuerpos del grupo control, usando los sueros de pre inmunización a los sueros de la 3ª inmunización, dilución 1:4000.

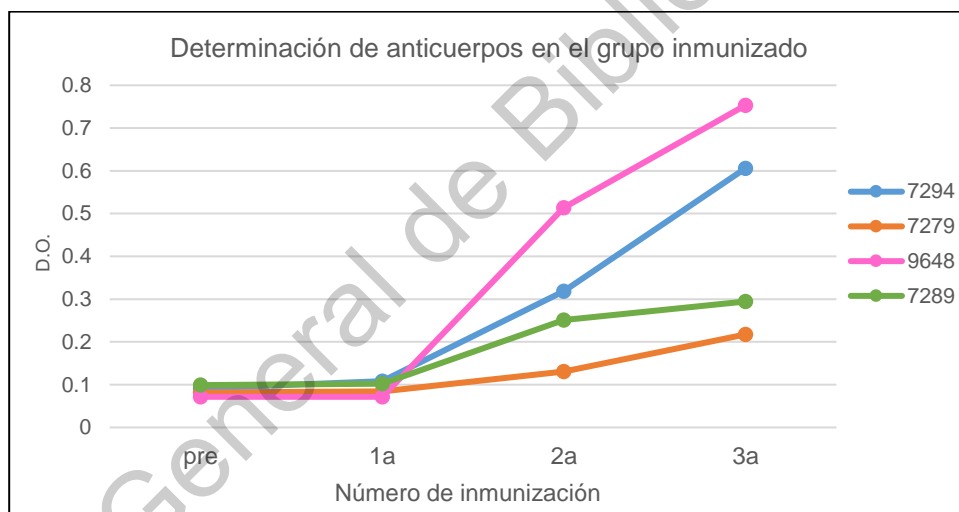


Figura 67. Gráfica de la determinación anticuerpos del grupo inmunizado.

#### 7.3.3.4 Titulación de anticuerpos totales.

Para verificar si existe una diferencia en la cantidad de anticuerpos totales entre los animales del grupo control y vacunado, se hizo una titulación de los anticuerpos totales en suero de los bovinos con el suero de los bovinos pre inmunización, el suero de la 3ª inmunización (pre desafío) y el suero tomado 20 días después del desafío, en diluciones seriadas en base 10 de 1:100 a 1: 1:100 000 000 000; se midió la absorbancia a los 25 minutos a 450 nm. En los animales

del grupo control se observa que en 3 de los animales (7280, 9631 y 7288) la absorbancia medida en el suero post desafío es igual que en el suero pre inmunización y pre desafío (figura 68); en el grupo inmunizado se observó en 3 de los 4 animales (7294, 9648 y 7289) que la absorbancia medida de suero post inmunización es más alta con respecto a los sueros pre inmunización y pre desafío (figura 69).

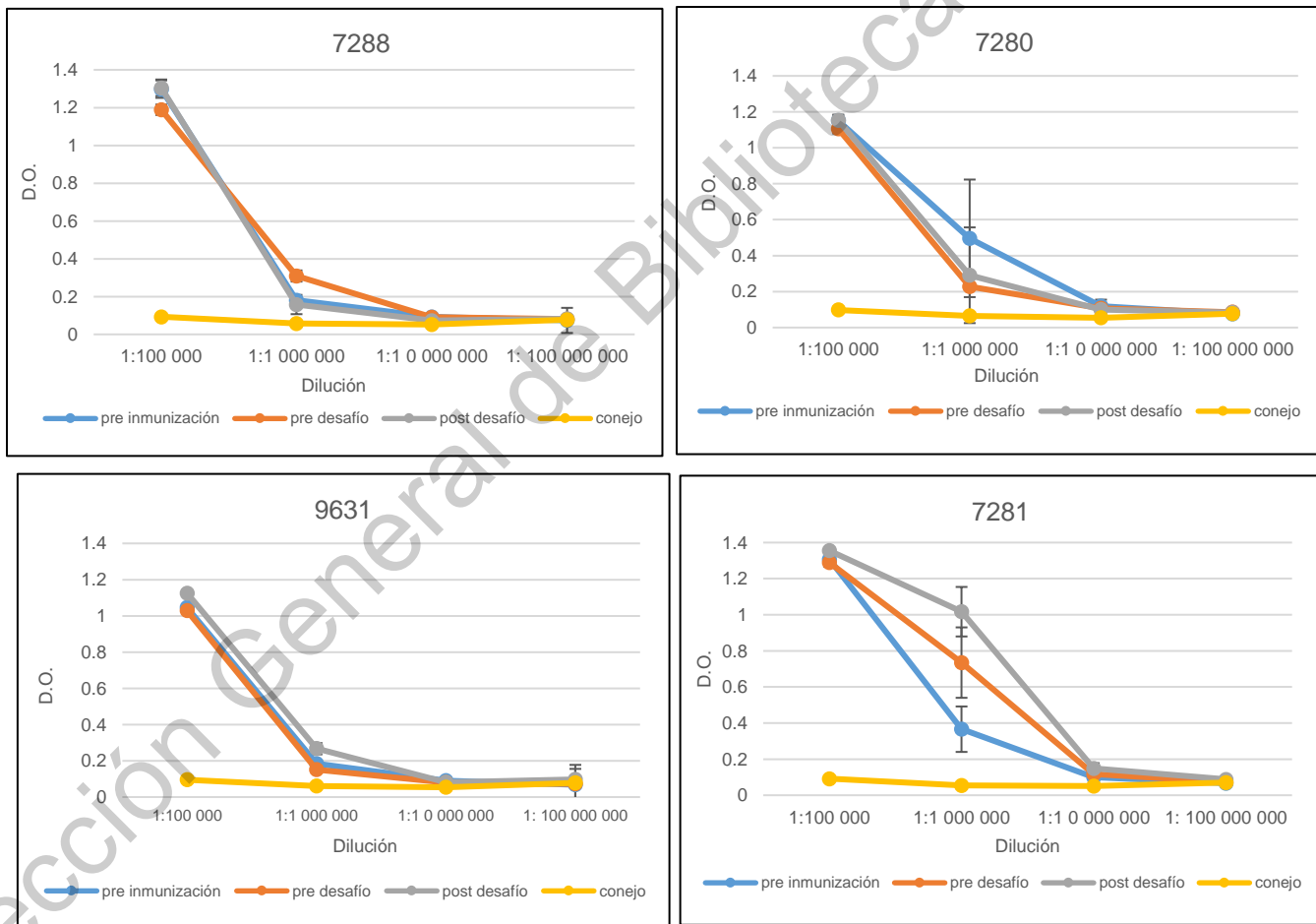


Figura 68. Gráficas de la titulación de anticuerpos totales del grupo control, usando sueros de pre inmunización hasta después del desafío, diluciones 1:100 000 a 1:100 000 000.



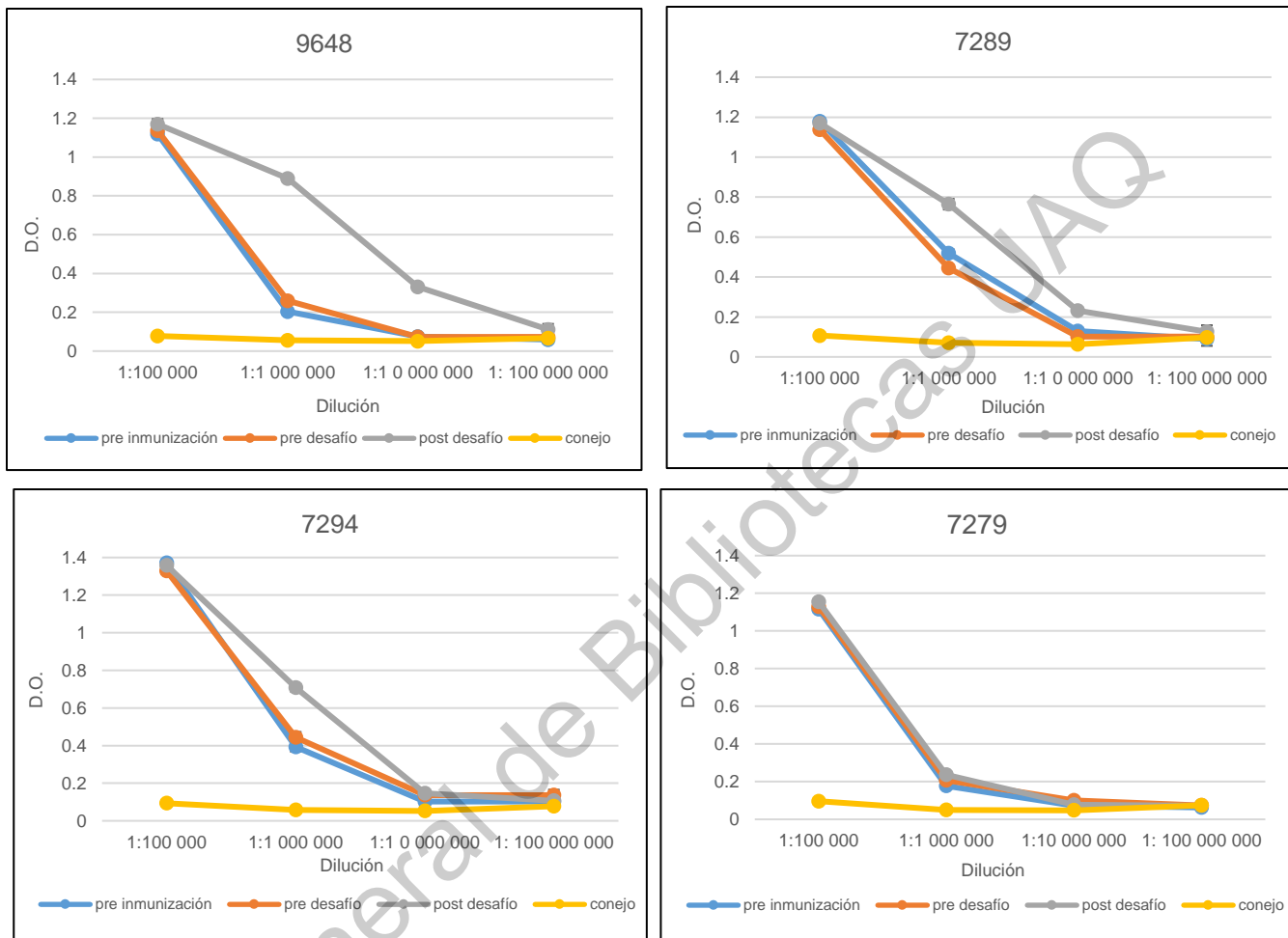


Figura 69. Gráficas de la titulación de anticuerpos totales del grupo inmunizado, usando sueros de pre inmunización hasta después del desafío, diluciones 1:100 000 a 1:100 000 000.

## 8. DISCUSIÓN

La identificación y estudio de la *TCTP* en *B. bovis* es importante por su potencial papel en la respuesta inmune del hospedador, siendo estudiado su potencial como vacuna en otros organismos del filo Apicomplexa. Este estudio describe la identificación y caracterización del gen de *TCTP* en *B. bovis*.

La *TCTP* es una proteína abundante, conservada y con muchas funciones importantes dentro de la célula, ha sido identificada la mayoría de los organismos eucariontes (Hinojosa-Moya, et al., 2008); como era de esperarse, esta proteína se identificó en los diferentes aislados de *B. bovis*. También se analizó la similitud de esta proteína con su homóloga en los bovinos, para saber si podía tener estructuras y por lo tanto funciones similares. Tanto en *Bos taurus* como en *B. indicus*, siendo esta proteína 100% idéntica entre las dos especies de bovinos, pero con una similitud de estos con la proteína en *B. bovis* del 31.76%; siendo una similitud menor a la mencionada entre *P. falciparum* y la *TCTP* de mamífero del 54% (Mathieu, et al., 2015). También se observó una similitud con *P. falciparum* del 58% y, con *B. bigemina* del 81%, una similitud menor a la mencionada entre *TCTP* de *P. falciparum* y *P. berguei* del 97% (Mathieu, et al., 2015), y con *P. yoelii* del 97% (Walker, et al., 2000). De igual manera a lo mencionado entre diferentes cepas de *P. yoelii* (Walker, et al., 2000), no hubo diferencias en la secuencia de aminoácidos de *TCTP* de *B. bovis* de los aislados secuenciados; sugiriendo la posibilidad de que la proteína tenga una función similar en *B. bovis*.

Al predecir con herramientas bioinformáticas la estructura terciaria de la *TCTP* de *B. bovis* y compararla con la estructura descrita de *P. falciparum*, son muy similares entre sí, presentando la alfa hélice característica de los organismos del filo Apicomplexa en los mismos aminoácidos, por lo que la función de la *TCTP* de *B. bovis* podría ser muy similar a la documentada de la *TCTP* de *P. falciparum*.

Se predijeron 4 péptidos usando diferentes herramientas bioinformáticas identificando regiones hidrofílicas, flexibles, accesibles, giros, superficies expuestas, polares y con propensión antigénica para predecir péptidos con alta probabilidad de ser epítipo B. Se ha propuesto el diseño de una vacuna basada en péptidos de *TCTP* de *P. falciparum* (Elhag, et al., 2020), donde se usó también la herramienta bioinformática del IEDB para predecir péptidos B, T y regiones con afinidad a alelos de MHC I y II. En este estudio se diseñó un péptido entre el aminoácido 17 a 25 de la secuencia de aminoácidos de *TCTP* de *P. falciparum*, por su afinidad a las células B; similar al péptido 4 que se diseñó en este trabajo entre el aminoácido 14 y 35. También diseñaron 2 péptidos entre los péptidos 141 a 148 por su afinidad a los alelos del MHC I y, entre los aminoácidos 146 a 160 por su afinidad a los alelos del MHC II. Nosotros no analizamos la afinidad a MHC debido a que no existen aún las herramientas bioinformáticas para predecir los alelos de MHC en bovinos. En el diseño de la vacuna basada en péptidos de *TCTP* de *P. falciparum* diseñaron péptidos pequeños de entre 9 y 15 aminoácidos, nosotros diseñamos péptidos de mayor tamaño, entre 19 y 23 aminoácidos, ya que estimulan una mayor respuesta inmune y el cambio de isotipo de IgM a IgG. También se han utilizado péptidos diseñados con las herramientas bioinformáticas de ABCpred, BCEpred y IEDB en la proteína *Hap2* de *B. bigemina*, donde diseñaron 2 péptidos de 17 y 26 aminoácidos, los cuales se usaron para inmunizar conejos (Camacho-Nuez, et al., 2017). Y, utilizando las mismas herramientas bioinformáticas para diseñar péptidos, en la proteína *RAP-2* de *B. bovis* diseñaron péptidos de 16 a 36 aminoácidos para inmunizar bovinos, señalando que los anticuerpos generados por estos péptidos eran capaces de producir una respuesta inmune (Hidalgo-Ruiz, et al., 2018).

En los conejos se realizaron en total 5 inmunizaciones cada 21 días, de manera similar a lo indicado en otro estudio donde también utilizaron péptidos de la proteína *HAP2* de *B. bigemina*, donde inmunizaron en 5 ocasiones pero cada 15 días (Camacho-Nuez, et al., 2017)y, en otro estudio los conejos se inmunizaron en

6 ocasiones cada 15 días utilizando 3 péptidos de la proteína MIC-1 (proteína del micronema) de *B. bigemina* (Hernández-Silva, et al., 2018). En bovinos se realizaron 3 inmunizaciones en total cada 21 días, observando anticuerpos después de la segunda inmunización; en otros estudios se ha mencionado el uso de 4 inmunizaciones cada 21 días en bovinos inmunizados con péptidos de RON-2 (proteína del cuello de las roptrías) de *B. bovis* (Hidalgo-Ruiz, et al., 2018).

Se produjeron anticuerpos específicos tanto en conejos y bovinos. En las IFI usando el suero de conejo de la 3ª inmunización, se pudo observar la presencia de anticuerpos contra *B. bovis*, observando señales positivas más claras con el péptido II, un poco menor con los péptidos I y III, y muy poca señal con el péptido IV, debido a esto se decidió hacer dos inmunizaciones más; sin embargo se pudo observar una distribución citoplasmática de la proteína, muy similar a la descrita al realizar IFI en eritrocitos infectados con *P. berguei* y suero de ratones inmunizados con HRF (Mathieu, et al., 2015; Dermata-Gatsi, et al., 2016). En la IFI usando el suero de los bovinos, se pudo observar en el suero de los 4 animales los anticuerpos específicos a *B. bovis*, confirmando con DAPI. En bovinos inmunizados con péptidos de RON-2 de *B. bovis* también se han mencionado la generación de anticuerpos específicos observados por IFI (Hidalgo-Ruiz, et al., 2018).

En el desafío con el aislado de campo de *B. bovis*, 3 de los 4 animales del grupo control inmunizado con adyuvante requirieron tratamiento para evitar la muerte del animal. Se pudo identificar una diferencia en el porcentaje de parasitemia entre el grupo control y el grupo inmunizado. Se ha mencionado que al inmunizar ratones inmunizados con *P. berguei* sin el gen de *tctp*, hay una reducción y un retraso en la aparición de la parasitemia (Mathieu, et al., 2015). Mencionando resultados similares el inmunizar con TCTP de *P. falciparum* y desafiar con *P. yoelii*, o al inmunizar con TCTP de *P. yoelii* y desafiar con *Plasmodium chabaudi chabaudi*; donde se observa un retraso en el porcentaje de parasitemia en los ratones inmunizados con la proteína en comparación con los ratones inmunizados con PBS (Taylor, et al., 2015).

En el presente trabajo también se observó una menor severidad en los signos clínicos observados en los bovinos del grupo inmunizados con una recuperación más rápida; el tiempo de llenado capilar se registró ligeramente arriba de los parámetros pero se mantuvo menor a 5 segundos, indicando que hay un problema menor, sin llegar a ser un tiempo anormal (Jackson & Cockcroft, 2002). Similar a lo reportado en ratones, donde al inmunizar ratones con *P. berguei* sin el gen de *tctp*, se destacó una disminución del 90% en signos neurológicos en comparación con el grupo control (Taylor, et al., 2015).

Se otros estudio, inmunizando bovinos con cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina*, observaron signos dieciocho días después del desafío, pero los bovinos fueron llevados a una zona endémica de la enfermedad donde esperaron a que las garrapatas se alimentaran de estos bovinos y les transmitieran el parásito. En comparación los becerros del presente trabajo, presentaron síntomas a los 9 días, sin embargo, en nuestro estudio se utilizaron eritrocitos parasitados para el desafío.

De manera similar observaron que ambos grupos presentaron síntomas, aumento de la temperatura y disminución del volumen celular aglomerado, siendo más severos en el grupo control, siendo la principal diferencia los signos como anorexia, disminución de peso, postración y depresión, por lo que estos bovinos requirieron tratamiento (Cantó Alarcón, et al., 2003). Se pudo observar que no hay relación entre el título de anticuerpos específicos y la severidad de signos clínicos presentados en el desafío.

En el título total de anticuerpos, se observó que en el grupo control se observa la misma cantidad de anticuerpos totales en las 3 muestras, incluso en dos animales es menor la cantidad de anticuerpos en el suero post desafío que en el suero pre desafío o pre inmunización. En el grupo inmunizado se observó que la mayoría de los animales presentan una mayor cantidad de anticuerpos totales en el suero post desafío en comparación con el suero pre desafío y pre inmunización. Esta diferencia podría estar correlacionada con el título de anticuerpos específicos

contra *TCTP* de *B. bovis*, ya que los animales que muestran mayor diferencia entre los sueros son los animales que tienen un mayor título de anticuerpos con *TCTP*; sin embargo es importante estudiar a fondo la interacción de esta proteína en *B bovis* con células de B de bovinos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 9. CONCLUSIONES

Se logró identificar y amplificar el gen de *TCTP* en diferentes asilados de *B. bovis* de diferentes regiones; al caracterizarla se verificó que es muy similar a la *TCTP* de *P. falciparum*. Con herramientas bioinformáticas se diseñaron péptidos, los cuales demostraron ser inmunogénicos al producir anticuerpos específicos en conejos y bovinos. Además, se observó su potencial uso como vacuna contra *B. bovis* al presentarse una menor severidad en los signos clínicos de los bovinos en el desafío.

## 10. REFERENCIAS

- Ahmed, J. S. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitology Research*, 88, s48-s50.
- Almagro Armenteros, J., Tsirigos, K., Kaae Sonderby, C., Nordahl Petersen, T., Winther, O., Brunak, S., . . . Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37, 420-423. Obtenido de <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Alvarez, J., Ramos, J., Rojas, E., Mosqueda, J., Vega, C., Olvera, A., . . . Cantó, G. (2004). Field Challenge of Cattle Vaccinated with a combined Babesia bovis and Babesia bigemina Frozen Immunogen. *Annals New York Academy of Sciences*, 1026, 277-283.
- Amzallag, N., Passer, B., Allanic, D., Segura, E., Théry, C., Gound, B., . . . Telerman, A. (2004). TSAP6 Facilitates the Secretion of Translationally Controlled Tumor Protein/ Histamine-releasing factor via a Nonclassical Pthway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 46104-46112.
- Barbet, A. (2009). Persistence mechanisms in tick-borne diseases. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 76, 53-58.
- Bhisutthibhan, J., Philibert, M., Fujioka, H., Aikawa, M., & Meshnick, S. (1999). The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur J Cell Biol*(78), 665-670.
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D313-D319.
- Bock, R., Jackson, L., Vos, A. D., & Jorgesen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*(129), S247-S269.



- Bonnet, C., Perret, E., Dumont, X., Picard, A., Caput, D., & Lenaers, G. (2000). Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast*, 16, 23-33.
- Boomer, & Thiele, B. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 379-385.
- Boomer, U.-A. (2012). Cellular function and regulation of the translationally controlled tumour protein TCTP. *The Open Allergy Journal*, 5, 19-32.
- Boomer, U.-A., Borovjagin, A., Greagg, M., Jeffrey, I., Russel, P., Laing, K., . . . Clemens, M. (2002). The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is highly structured RNA, wich activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *Rna*, 8, 478-496.
- Brayton, K., Lau, A., Herndon, D., Hannick, L., Kappmeyer, L., Berens, S., . . . Nene, V. (2007). Genoma sequence of Babesia bovis and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *Plos pathogens*, 3(10), 1401-1413.
- Bridges, D., Bunn, J., van Mourik, J., Grau, G., Preston, R., Molyneux, M., . . . Craig, A. (2009). Rapid activation of endothelial cells enables P. falciparum adhesion to pletelet decprated von Willebrand factor strings. *Blood*, 115, 1472-1474.
- Brown, W., & Palmer, G. (1999). Designing Blood-stage Vaccines against Babesia bovis and B. bigemina. *Parasitology today*, 15(7), 275-281.
- Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., & Ruiz-Medrano, R. (2014). The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein (TCTP) is incorporated more efficiently into B cells than its human homologue. *PLoS One*(9), e85514.
- Camacho-Nuez, M., Hernández-Silva, D., Castañeda-Ortiz, E., Paredes-Martínez, M., Rocha-Martínez, M., Alvarez-Sánchez, M., . . . Mosqueda, J. (2017).

Hap2, a novel gene in *Babesia bigemina* is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation. *Parasites & vectors*, 10, 568.

Cantó A., G., Rojas R., E., Álvarez M., J., Ramos A., J., Mosqueda G., J., Vega y Muguía, C., & Figueroa M., J. (2003). Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo in vitro en una confrontación de campo. II Inmunización en un area endémica. *Técnica Pecuaria en México*, 41(3), 307-315.

Cantó Alarcón, G., Álvarez Martínez, J., Rojas Martínez, E., Ramos Aragón, J., Mosqueda Gualito, J., Vega y Murguía, C., & Figueroa Millán, J. (2003). Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada fe cultivo in vitro bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de enfermedad. *Veterinaria México*, 34(4), 323-332.

Chauvin, A., Moreu, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 1-18.

Curnow, J. (1968). In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected with *Babesia argentina*. *Nature*, 217, 267-268.

de Waal, D., & Combrink, M. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 88-96.

Dermata-Gatsi, C., Smith, C., Thiberge, S., Peronet, R., Commere, P.-H., Matondo, M., . . . Mécheri, S. (2016). Protection against malaria in mice is induced by blood stage–arresting histamine-releasing factor (HRF)–deficient parasites. *Journal of Experimental Medicine*, 213(8), 1419-1428.

Deville, S., Ben Arous, J., Bertrand, F., & Dupuis, L. (s.f.). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de <http://www.fao.org/docs/eims/upload/299860/an378e00.pdf>

- Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M., & Kutzer, E. (1998). Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. *Parasitology Research*, *84*, 181-187.
- Eichhorn, T., Winter, D., Büchele, B., & al, e. (2013). Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, *85*, 38-45.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S., Luciani, A., Potter, S., . . . Finn, R. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*, D427-D432. Obtenido de <https://pfam.xfam.org/search/sequence>
- Elhag, M., Albagi, S., Ahmed, N., Alaagib, R., Haroun, E., Abubaker, M., & Hassan, M. (2020). Design of Epitope Based Peptide Vaccine Against *Plasmodium Falciparum*. *Proceedings of Abstracts of International Research Conference on Pharmaceutical and Allied Sciences. IRCPAS/2020/PP-238*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.
- Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M., . . . Yokoyama, N. (2015). An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitology International*, *79*-85.
- Feng, Y., Liu, D., Yao, H., & Wang, J. (2007). Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Archives of biochemistry and biophysics*, *467*(1), 48-57.
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R., & Alonso-Díaz, M. (2012). First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, *183*, 338-342.
- Fish, L., Leibovich, B., Krigel, Y., McElwain, T., & Shkap, V. (2008). Vaccination of cattle against *B. bovis* infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. *Vaccine*, *265*, G29-G33.

- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., & Bommer, U.-A. (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of Cell Science*, *112*, 1257-1271.
- Ganesharo Joshi, V., Dighe, V., Thakuria, D., Malik, Y., & Kumar, S. (2013). Multiple antigenic peptide (MAP): a synthetic peptide dendrimer for diagnostic, antiviral and vaccine strategies for emerging and re-emerging viral diseases. *Indian Journal of Virology*, *24*(3), 312-320.
- Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., & Valdez, R. A. (2001). 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 Immunology*, *23*, 463-471.
- Goff, W. L., Warner, G., & Craig, T. M. (1984). Increased activity of bovine adcc effector cells during acute *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*, *16*, 5-15.
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, *43*, 125-132.
- Gross, B., Gaestel, M., Böhm, H., & Bielka, H. (1989). cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Research*, *17*(20), 8367.
- Hernández-Silva, D., Valdez-Espinoza, U., Meracdo-Uriostegui, M., Aguilar-Tipacamú, G., Ramos-Aragón, J., Hernández-Ortiz, R., . . . Mosqueda, J. (2018). Immunomolecular Characterization of MIC-1, a Novel Antigen in *Babesia bigemina*, Which Contains Conserved and Immunodominant B-Cell Epitopes that Induce Neutralizing antibodies. *Veterinary Sciences*, *5*(2), 32.

- Hidalgo-Ruiz, M., Suarez, C., Mercado-Uriostegui, M., Hernández-Ortiz, R., Ramos, J., Galindo-Velasco, E., . . . Moqueda, J. (2018). Babesia bovis RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce and invasion-bloking humoral immune response in immunized cattle. *Prasites & vectors*, 11, 575.
- Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W., & Ruiz-Medrano, R. (2008). Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 66, 472-483.
- Jackson, P., & Cockcroft, P. (2002). *Clinical Examination of Farm Animals*. Oxford: Blackwell Science.
- James, M. (1988). *Babesiosis of domestic animales and man*. Boca Raton, Florida: CRC PRESS.
- Jenkins, & C., M. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Paraistology*, 291-310.
- Jespersen, M., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: imporving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24-W29.
- Jones, S., Lew, A., Jorgensen, W., & Barker, S. (1997). Babesia bovis: Genome size, number of chromosomes and telomeric probe hydridisation. *International Journal for Parasitology*, 27(12), 1569-1573.
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*(129), S3-S14.
- Kang, H., Lee, M., Song, H., Han, S., Kim, Y., Young, J., & Choi, I. (2001). Molecular identification of IgG-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor. *The Journal of Immunology*(166), 6545-6554.

- Kuttler, K. L. (2018). World-Wide Impact of Babesiosis. En M. Ristic, *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press.
- Lau, A., Tibbals, D., & McElwain, T. (2007). Babesia bovis: the development of an expression oligonucleotide microarray. *Experimental parasitology*, 117, 93-98.
- Lespagnol, A., Duflaut, D., Beekman, C., Blanc, L., Fiucci, G., Marine, J.-C., . . . Telerman, A. (2008). Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1723-1733.
- Life Technologies. (2014). *Topo TA Cloning for Sequencing*.
- MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., . . . Meshnick, S. R. (2001). Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10829-10832.
- MacDonald, S., Rafnar, T., Landon, J., & Lichtenstein, L. (1995). Molecular identification of an IgE dependent histamine releasing factor. *Science*, 269, 688-690.
- Madeira, F., Park, Y., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., . . . López, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47, W636-W641.
- Mathieu, C., Demarta-Gatsi, C., Porcherie, A., Brega, S., Thiberge, S., Ronce, A., . . . Mécheri, S. (2015). Plasmodium berghei histamine-releasing factor favours liver-stage development via inhibition of IL-6 production and associates with a severe outcome of disease. *Cellular Microbiology*, 17(4), 542-558.

- Mdachi, R., Murilla, G., Omukuba, J., & Cagnolati, V. (1995). Disposition of diminazene aceturate (Beneril) in trypanosome-infected pregnant and lactating cows. *Veterinary Parasitology*(58), 215-225.
- Möller, S., Croning, M., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning. *Bioinformatics*, 17(7), 646-653. Obtenido de <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>
- Mosqueda, J., McElwain, T., & Palmer, G. (2002). Babesia bovis merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(11), 6448-6455.
- Mosqueda, J., McElwain, T., Stiller, D., & Palmer, G. (2002). Babesia bovis Merozoite Surface Antigen 1 and Rhoptry-Associated Protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(3), 1599-1603.
- O'Connor, R., Lane, T., Stroup, S., & Allred, D. (1997). Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA 1) expressed by Babesia bovis during antigenic variation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89, 259-270.
- O'Connor, R., Lane, T., Stroup, S., & Allred, D. (1997). Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by Babesia bovis during antigenic variation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89, 259-270.
- Pelleau, S., Dlop, S., Badiane, M., Vitte, J., Beguin, P., Nato, F., . . . Jambou, R. (2012). Enhanced Basophil Reactivities during Severe Malaria and Their Relationship with the Plasmodium falciparum Histamine-Releasing Factor Translationally Controlled Tumor Protein. *Infection and Immunity*, 80(8), 2963-2970.
- Peptide 2.0. (2020). Obtenido de <https://www.peptide2.com/>

- Promega corporation. (2020). *Biomath Calculator*. Recuperado el julio de 2019, de <https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>
- Rodriguez, R., & Tress, A. (1996). In vitro responsiveness of *Babesia bovis* to imidocarb dipropionate and the selection of a drug-adapted lines. *Veterinary parasitology*, 62, 35-41.
- Rodríguez-Vivas, R., Grisi, L., Pérez de León, A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J., Frago S., H., . . . García C., D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74.
- Romero-Salas, D., Mira, A., Mosqueda, J., García-Vázquez, Z., Hidalgo-Ruiz, M., Ortiz Vela, N., . . . Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*- infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 217, 101-107.
- Saha, S., & Raghava, G. (2004). BcdPred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physicochemical properties. *International Conference on Artificial Immune Systems*, 197-204.
- Saha, S., & Raghava, G. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 65(1), 40-48.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 1788-1809.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (26 de junio de 2020). *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp.*
- Shoda, L., Palmer, G. H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D. L., & Brown, W. (2000). *Babesia bovis* stimulates macrophages express



interleukin-1b, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and Immunity*, 68(9), 5139-5145.

Suarez, C., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180, 109-125.

Taylor, K., Van, T., MacDonald, S., Meshnick, S., Fernley, R., Macreadie, I., & Smooker, P. (2015). Immunization of mice with Plasmodium TCTP delays establishment of Plasmodium infection. *Parasite Immunology*, 23-31.

Taylor, R., & Mc-herdy, N. (1979). Preliminary observations on the combined use of imidocarb and Babesia blood vaccine in cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50, 326-329.

Telerman, A., & Amson, R. (2017). *TCTP/ tpt1- Remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64). Switzerland: Springer.

Thaw, P., Baxter, N., Hounslow, A., Price, C., Waltho, J., & Craven, J. (2001). Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nature Estructure Biology*, 8(8), 701-704.

U.S. National Library of Medicine. (2020). *Nacional Center for Biotechnology Information*. Recuperado el abril de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5478636>

Valdez-Espinoza, U. (2015). Identificación de epítomos conservados en aislados de *B. bigemina*.

Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., . . . Hui, R. (2007). Genome-scale protein expression and structural biology of Plasmodium falciparum and related Apicomplexan organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 151(1), 100-110.

- Vega, C., Buening, G., Green, T., & Carson, C. (1985). In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *American Journal of Veterinary Research*, 46(2), 416-420.
- Vita, R., Mahajan, S., Overton, J., Dhanda, S., Martini, S., Cantrell, J., . . . Peters, B. (2018). The immune epitope database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D339-D343.
- Walker, D. J., Pitsh, J. L., Peng, M. M., Robinson, B. L., Peters, W., Bhisutthibhan, J., & Meshnick, S. R. (2000). Mechanism of Artemisinin Resistance in the Rodent Malaria Pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(2), 344-347.
- Wang, F., Hu, C., Hua, X., Song, L., & Xia, Q. (2013). Translationally Controlled Tumor Protein, a Dual. *Plos One*, 8(7), e69284.
- Wu, H., Gong, W., Yao, X., Wang, J., Perrett, S., & Feng, Y. (2015). Evolutionarily Conserved Binding of Translationally Controlled Tumor Protein to Eukaryotic Elongation Factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 8694-8710.
- Wu, P.-S., Yang, C.-Y., Jong-Young, J., Chou, C.-H., Chen, S., Leo Wang, C.-K., . . . Yang-Yen, H.-F. (2009). Critical Roles of Translationally Controlled Tumor Protein in the Homeostasis and TCR-Mediated Proliferation of Peripheral T Cells. *The Journal of Immunology*, 183, 2373-2381.
- Xoconostle-Cazáres, B., & Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-function relationship of TCTP. En A. Telerman, & R. Amson, *TCTP/ tpt1-remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64, pág. 309). Switzerland: Springer.

Dirección General de Bibliotecas UAQ