

Caracterización de la Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente
(TCTP) en *Babesia bigemina* e identificación de epítomos B conservados e
inmunogénicos

2023

M.V.Z. Valeria Guadalupe De
La Cruz González



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**Caracterización de la Proteína Tumoral Controlada
Traduccionalmente (TCTP) en *Babesia bigemina* e
identificación de epítomos B conservados e
inmunogénicos.**

Tesis

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

Presenta

M.V.Z. Valeria Guadalupe De La Cruz González

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. a 15 diciembre del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



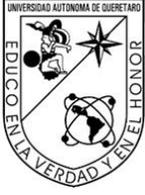
Caracterización de la Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) en Babesia bigemina e identificación de epítomos B conservados e inmunogénicos

por

Valeria Guadalupe De La Cruz González

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: CNMAC-309372



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Caracterización de la Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) en *Babesia bigemina* e identificación de epítomos B conservados e inmunogénicos.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. Valeria Guadalupe De La Cruz González

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Secretario

Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Vocal

MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio

Suplente

MSPAS. Chyntia Quetzalli Pérez Almeida

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Diciembre del 2023

México

DEDICATORIA

A mis padres, que han dado todo por ayudarme a cumplir esta meta, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano, con quien amo compartir esta vida, te amo.

A mis profesores, a quienes admiro y respeto, y que han marcado mi vida profesional.

A mis amigos del Laboratorio de Inmunología y Vacunas, de quienes me he acompañado más de dos años, han cambiado mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme el espacio para continuar con mi desarrollo profesional en este excelente programa educativo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme la beca que permitió costear mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Mosqueda, jamás me alcanzarán las palabras para expresar mi agradecimiento hacia usted. Por abrirme la puerta de su laboratorio desde aquel verano del 2019, por llenarme de oportunidades, por el apoyo, por compartir sus experiencias y conocimientos. Conocerle cambió mi vida profesional, académica y personal. Es un honor ser alumna suya y aprender de usted.

A mi mamá, Silvia Mireya González Cabrera, por apoyarme siempre, por decirme todos los días que estás orgullosa de mí e impulsarme a ser mejor persona, por luchar por mí y mi educación, por salvarme la vida tantas veces, por hacerme la mujer que soy. Te amo con todo mi ser.

A mi papá, José Ignacio De La Cruz Moreno, por hacer más fácil la posibilidad de cumplir este sueño, por ser ejemplo de esfuerzo, dedicación y trabajo. Te amo y te seguiré extrañando eternamente.

A mi hermano, José Ignacio De La Cruz González, por tu acompañamiento en este camino llamado vida, por tu apoyo incondicional, por hacer más fáciles mis días. Te amo, eres lo mejor que nuestros padres me han dado.

A Emilio, por contagiarme con tu energía, por tu acompañamiento, por hacer más agradable este tiempo. Gracias.

A mis sínodos, gracias por aceptar ser parte de esto, por sus consejos y su retroalimentación, por su paciencia y su tiempo.

Al Dr. Diego Josimar Hernández Silva por darme tantos consejos para mejorar mis experimentos. A Chyntia Pérez Almeida por proporcionar los péptidos para este trabajo, por tu asesoría y apoyo 24/7. A Edwin Esaú Hernández, por

enseñarme todo lo relacionado con cultivo celular y apoyarme durante los ensayos de neutralización. A Rodrigo Morales, Alma Cárdenas, Alejandra Carapia y todas las personas que apoyaron con la inmunización de las vacas. Su ayuda fue infinitamente valiosa para mí y para este proyecto.

Al Dr. José Guadalupe Gómez Soto y al Área Cunícula de la FCN por prestar el espacio para el desarrollo de una parte de este proyecto. Al Lic. Salvador Álvarez, al M.V.Z. Sigifredo Hurtado y al M.V.Z. Jair Millán, por proporcionar a las vacas y el espacio necesario para llevar a cabo las inmunizaciones.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología y Vacunas, quienes me apoyaron profesionalmente, enseñándome y llenándome de consejos para obtener mejores resultados. También gracias por el apoyo de forma personal, la amistad y todas esas horas dentro y fuera del laboratorio, han sido una gran compañía en estos dos años, hicieron que el trabajo se sintiera menos como tal.

A toda mi familia, por brindarme apoyo para emprender este nuevo camino y todo lo que este implicó, principalmente el cambio de ciudad.

Gracias infinitas a mis amigas América, Katty, Liz, Mayra, Mena, por quedarse conmigo a pesar de la distancia, por recibirme con tanta emoción en cada vuelta a Tepic, por alegrarse siempre por mis logros, soy afortunada por tenerlas en mi vida.

Y, por supuesto, también gracias a mis cujos, Leia y Bella, desde que llegaron la vida se sintió mejor, son las mascotas más hermosas que he tenido. A mi gatita Gris, que me acompañó un tiempo durante este proceso y se ganó mi corazón.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Babesiosis bovina	3
2.1.1 Situación de la enfermedad en México	4
2.1.2 Generalidades de <i>Babesia</i> spp.....	5
2.1.3 Ciclo biológico.....	6
2.1.3.1 Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp en el bovino	7
2.1.3.2 Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp en la garrapata	7
2.2 Babesiosis por <i>B. bigemina</i>	9
2.2.1 Características morfológicas.....	9
2.2.2 Genoma de <i>B. bigemina</i>	10
2.2.3 Respuesta Inmunitaria	11
2.3 Control de la Babesiosis bovina	13
2.3.1 Control del vector.....	13
2.3.2 Control del parásito.....	13
2.3.2.1 Quimioterapéuticos.....	13
2.3.2.2 Diagnóstico	14

2.3.2.3 Vacunación	15
2.4 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP).....	16
2.4.1 TCTP en organismos eucariontes.....	17
2.4.2 Estructura de TCTP en organismos Apicomplexos.....	19
2.4.3 Funciones de TCTP en Apicomplexos.....	20
2.4.4 Uso de TCTP como inmunógeno.....	21
2.4.5 Uso de TCTP como inmunógeno contra <i>Babesia bovis</i>	22
2.4.6 TCTP de <i>Babesia bigemina</i>	22
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos Específicos	26
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
6.1 Análisis de transcripción del gen <i>tctp</i>	27
6.1.1 Diseño de oligonucléotidos internos específicos	27
6.1.2 Extracción de ácidos nucleicos para obtener ARN total	27
6.1.3 Síntesis de ADN complementario a partir del ARN mensajero	29
6.1.4 Amplificación de un fragmento de ADN y ADNc por PCR	29
6.2 Ensayo de inmunización	30
6.2.1 Preparación de inmunógenos con péptidos de TCTP.....	30
6.2.2 Obtención de muestras de sangre e inmunización de conejos y bovinos	30
6.3 Determinación del reconocimiento de los péptidos por los anticuerpos	33
específicos anti-péptidos de TCTP mediante ELISA indirecta.	33

6.3.1 Estandarización de la concentración de los péptidos A, B y C de TCTP de <i>B. bigemina</i> y de los sueros de animales inmunizados.....	33
6.3.2 Determinación de anticuerpos anti-péptidos de TCTP de <i>B. bigemina</i> ..	34
6.4 Reconocimiento de la proteína nativa por los anticuerpos anti-péptidos de TCTP.....	34
6.5 Evaluación de la reacción cruzada de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP contra la proteína recombinante de <i>B. bovis</i>	35
6.5.1 Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.....	36
6.5.2 Transferencia de proteínas.....	36
6.5.3 Inmunodetección de proteínas.....	36
6.6 Determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP.....	37
VII. RESULTADOS.....	39
7.1 Ensayo de transcripción.....	39
7.1.1 Diseño de oligonucleótidos internos específicos.....	39
7.1.2 Amplificación de un fragmento del gen <i>tctp</i> de <i>B. bigemina</i> por PCR....	41
7.2 Ensayo de inmunización.....	41
7.3 Determinación del reconocimiento de los péptidos de TCTP de <i>B. bigemina</i> por los anticuerpos específicos.....	42
7.3.1 Estandarización de la concentración de los péptidos A, B, C y de la dilución de los sueros de los conejos y bovinos inmunizados.	42
7.3.2 Determinación de anticuerpos anti-péptidos de TCTP de <i>B. bigemina</i> ..	46
7.4 Reconocimiento de la proteína nativa por los anticuerpos anti-péptidos de TCTP.....	52
7.5 Determinación del reconocimiento de TCTP de <i>B. bovis</i> por anticuerpos anti-péptidos de TCTP de <i>B. bigemina</i>	52

7.6 Ensayo de neutralización con los anticuerpos anti-péptidos de TCTP de bovinos.....	54
VIII. DISCUSIÓN	55
XI. CONCLUSIONES	59
X. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación del genoma de <i>B. bigemina</i> entre una cepa atenuada y una cepa virulenta.	10
2	Fármacos efectivos contra <i>Babesia</i> spp.	13
3	Relación del péptido con el ID de conejo inmunizado.	31
4	Relación del péptido con el ID del bovino inmunizado.	31
5	Calendario de tomas de muestra de sangre e inmunizaciones en conejos.	32
6	Calendario de tomas de muestra de sangre e inmunizaciones en bovinos.	32
7	Características específicas de los oligonucleótidos diseñados en el gen <i>tctp</i> de <i>B. bigemina</i> .	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de la estructura de <i>Babesia</i> spp.	6
2	Esquema del ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp.	8
3	Comparación del tamaño de los merozoítos de <i>Babesia</i> dentro de eritrocitos de bovinos.	10
4	Regulación de los mecanismos de respuesta inmunitaria ante una infección por <i>B. bovis</i> .	12
5	Modelos tridimensionales de TCTP de diferentes organismos eucariontes.	17
6	Comparación de la secuencia y estructura tridimensional de TCTP entre <i>Schizosaccharomices pombee</i> y <i>Plasmodium knowlesi</i> .	20
7	Esquema de la localización de los péptidos A, B y C en la proteína TCTP de <i>B. bigemina</i> .	30
8	Secuencia del gen <i>tctp</i> de <i>Babesia bigemina</i> dividido en intrones y exones.	39
9	Localización de los oligonucleótidos diseñados en la secuencia del gen <i>tctp</i> .	40
10	Resultado del ensayo de transcripción del gen <i>tctp</i> . Electroforesis en gel de agarosa.	41
11	Gráfico de la estandarización de la concentración del péptido A.	43
12	Gráfico de la estandarización de la concentración del péptido B.	43
13	Gráfico de la estandarización de la concentración del péptido C.	44

14	Gráfico de la estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con péptido A.	44
15	Gráfico de la estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con péptido B.	45
16	Gráfico de la estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con péptido C.	45
17	Gráficos de la estandarización de la dilución de sueros de vacas inmunizadas con los péptidos.	46
18	Determinación de anticuerpos contra el péptido A en suero de conejos.	47
19	Determinación de anticuerpos contra el péptido B en suero de conejos.	48
20	Determinación de anticuerpos contra el péptido C en suero de conejos.	48
21	Determinación de anticuerpos contra el péptido A en suero de vacas.	50
22	Determinación de anticuerpos contra el péptido B en suero de vacas.	50
23	Determinación de anticuerpos contra el péptido C en suero de vacas.	51
24	Determinación de anticuerpos en vacas inmunizadas con una mezcla de péptidos.	51
25	Resultados de microscopía por Inmunofluorescencia indirecta.	52
26	Western blot para evaluación de la reacción cruzada de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP de <i>B. bigemina</i> .	53

27	Gráfico del porcentaje de eritrocitos parasitados en ensayo de neutralización.	54
----	--	----

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad con repercusiones económicas en la ganadería debido a la muerte de animales, disminución en la producción y reproducción. En México es causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) se ha caracterizado en eucariotas, incluidos los parásitos Apicomplexos como *Plasmodium falciparum*, donde su función es inhibir la respuesta inmunitaria del hospedante. Incluso se ha estudiado en *Babesia bovis*, determinando que su estructura es altamente conservada y sus péptidos tienen la capacidad de reducir los signos clínicos de la enfermedad en los animales inmunizados. A la fecha, no se ha descrito la expresión de TCTP en *Babesia bigemina*, ni se ha estudiado su inmunogenicidad. En este trabajo la transcripción del gen *tctp* se demostró mediante RT-PCR. La inmunogenicidad de 3 péptidos de TCTP, predichos como epítomos B, se determinó obteniendo sueros de animales inmunizados y evaluándolos mediante ELISA indirecta e Inmunofluorescencia indirecta, demostrando la presencia de anticuerpos específicos anti-TCTP. Se evaluó la reacción cruzada de estos anticuerpos con la proteína de *B. bovis*. Finalmente, se determinó la capacidad neutralizante de los anticuerpos *in vitro*.

Palabras clave: Péptidos, Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente, Babesiosis bovina, vacunas, Apicomplexa.

ABSTRACT

Bovine babesiosis is a disease with economic repercussions in cattle farming due to the death of animals, decrease in production and reproduction. In Mexico it is caused by *Babesia bovis* and *B. bigemina*. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) has been characterized in eukaryotes, including Apicomplexan parasites such as *Plasmodium falciparum*, where its function is to inhibit the immune response of the host. It has even been studied in *Babesia bovis*, determining that its structure is highly conserved and its peptides have the capacity to reduce the clinical signs of the disease in immunized animals. To date, the expression of TCTP in *Babesia bigemina* has not been described and its immunogenicity has not been studied. In this work the transcription of the *tctp* gene was demonstrated by RT-PCR. The immunogenicity of 3 TCTP peptides, predicted as B epitopes, was determined by obtaining sera from immunized animals and evaluating them by indirect ELISA and indirect Immunofluorescence, demonstrating the presence of specific anti-TCTP antibodies. The cross-reactivity of these antibodies with *B. bovis* protein was evaluated. Finally, the neutralizing capacity of the antibodies was determined *in vitro*.

Key words: Peptides, Translationally Controlled Tumor Protein, bovine babesiosis, vaccines, Apicomplex.

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis es una enfermedad causada por el parásito *Babesia* spp, es una causa fuerte de pérdidas económicas en la producción animal en gran parte del país por la disminución en la producción de carne y leche, el costo del tratamiento de animales enfermos, el retraso en su desarrollo, disminución en la capacidad reproductiva, abortos e incluso la muerte de los animales que no son tratados a tiempo.

La babesiosis bovina, en México, es causada por las especies *B. bovis* y *B. bigemina*, las cuales son transmitidas por las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus*. La enfermedad se caracteriza por signos clínicos como anemia, fiebre (mayor a 40°C en algunos casos), hemoglobinuria, la presencia de parásitos en sangre y, en el caso de *B. bovis*, signos nerviosos como ataxia, temblores, postración, entre otros. Se han desarrollado vacunas que confieren protección inmunológica contra *B. bovis* y *B. bigemina*, estas consisten en el parásito vivo atenuado, sin embargo, tienen ciertas limitaciones como lo son: altos costos de producción, la necesidad de mantener la cadena fría durante el transporte y existe posible reversión de la virulencia. A la fecha no hay vacunas contra la babesiosis bovina que estén disponibles en el mercado en México.

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) se ha identificado en organismos eucariontes como mamíferos, plantas, levaduras, entre otros. Ha sido estudiada en mayor medida en mamíferos, en los cuales se ha reportado que la proteína tiene múltiples e importantes funciones. TCTP es una proteína con funciones intracelulares y de secreción y en mamíferos se ha determinado que se expresa de forma constitutiva en respuesta a múltiples estímulos como el estrés, señales pro-apoptóticas, diferenciación celular, entre otras. La proteína está presente también en parásitos del filo Apicomplexa, de los cuales el más estudiado es *Plasmodium falciparum*. Así se ha determinado que la proteína TCTP presenta una estructura altamente conservada en parásitos Apicomplexa, con una diferencia marcada: en los aminoácidos 22-30, donde está presente una hélice alfa en lugar de la lámina beta, que se forma en estructura

tridimensional de la proteína de otros eucariontes. Por esta diferencia estructural en la TCTP de Apicomplexos se ha hipotetizado que tiene funciones diferentes a las de otros eucariontes, como la participación en el proceso de pre-infección de los parásitos a la célula blanco de sus hospedantes y la inhibición de la respuesta inmunitaria de estos.

Estos y otros antecedentes fueron la base para que se realizara un estudio con la TCTP de *Babesia bovis*, determinando por bioinformática que en su estructura se encuentra la hélice alfa característica de protozoarios Apicomplexos. Además, fue demostrado que tras la inmunización de bovinos con péptidos de TCTP de *B. bovis* y posterior desafío contra el parásito, la severidad de los signos clínicos en los animales fue menor, comparado con un grupo control (no inmunizado con péptidos), de forma que no necesitaron de tratamiento para su recuperación. A la fecha no hay reportes del uso de esta proteína como candidato vacunal contra *B. bigemina*.

Este estudio tiene la finalidad de evaluar la transcripción del gen *tctp* en *Babesia bigemina* y la capacidad que tienen los péptidos de la proteína con epítomos B predichos para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

II. ANTECEDENTES

La babesiosis, es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Babesia* spp presente en la mayor parte del mundo (Vannier *et al.*, 2015), principalmente en las zonas tropicales y sub tropicales donde hay presencia de garrapatas, que actúan como vector y son esenciales en su ciclo biológico (Rojas *et al.*, 2004; Muñoz, 2016), afecta a una gran variedad de mamíferos, especialmente bovinos, equinos y caninos (Pérez de León *et al.*, 2010). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año de 1888 en Rumania, por el médico Viktor Babes, quien describió en sus observaciones, la presencia de cuerpos en el interior de eritrocitos de ganado infectado, que en principio clasificó como bacterias (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012b; Vannier *et al.*, 2015).

Esta enfermedad se reconoce también como una zoonosis. El primer caso en humanos fue causado por *Babesia divergens* en Yugoslavia en 1957 y reportado por Skrabalo & Deanovic (citado por Hunfeld *et al.*, 2008; Pérez de León *et al.*, 2010). El número de casos ha ido en aumento desde este primer reporte, en Europa se llegaron a reportar aproximadamente 60 casos hasta el año 2006, de los cuales un 70% fueron causados por *B. divergens* (Genchi, 2007). Sin embargo, otras especies como *Babesia microti*, se ha reportado en Norte América como el causante más común de babesiosis en humanos (Hunfeld *et al.*, 2008; Pérez de León *et al.*, 2010; Vannier *et al.*, 2015; Jalovecka *et al.*, 2019).

La babesiosis es un problema de salud grave que también puede provocar la muerte en humanos, principalmente en pacientes que pasan por procesos por los que se ven inmunocomprometidos, ya sea por esplenectomía, por padecer enfermedades como el SIDA o por estar en tratamiento con glucocorticoides (Ramos *et al.*, 2015). En estos pacientes el tratamiento suele ser más extenso con la posibilidad de que su organismo genere resistencia (Jalovecka *et al.*, 2019).

2.1 Babesiosis bovina

La enfermedad en bovinos es también llamada Fiebre de Texas o Piroplasmosis, considerada una de las enfermedades más importantes en los bovinos. Se caracteriza por producir anemia, fiebre que llega a sobrepasar los 40°C,

hemoglobinuria, la presencia de parásitos en sangre y en ocasiones signos nerviosos como ataxia, temblores, postración, entre otros, que son causados por el secuestro de los eritrocitos infectados a los capilares cerebrales (Zintl *et al.*, 2005; Chaudhry *et al.*, 2010).

Las pérdidas económicas se deben a varias causas, entre ellas la disminución en la producción de carne y leche, los gastos por el tratamiento de animales enfermos, el retraso en su desarrollo, disminución en la capacidad reproductiva, abortos, e incluso la muerte de los animales que no son tratados a tiempo (Rojas *et al.*, 2004; Pérez de León *et al.*, 2010; Mosqueda *et al.*, 2012a).

2.1.1 Situación de la enfermedad en México

Esta enfermedad representa una de las mayores causas de pérdidas económicas en la industria ganadera en México, como en otras partes del mundo (Suárez & Noh, 2011). El 75% de la población de bovinos, para el 2004, se encontraba en zonas alta prevalencia de garrapatas (Rojas *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012a).

La enfermedad, en México, es producida por las especies *Babesia bovis* y *B. bigemina*, ambas transmitidas por dos especies de garrapatas: *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus*. La babesiosis es transmitida por medio de fómites también, como agujas o instrumental de cirugía contaminados con sangre de animales enfermos.

Los brotes de la enfermedad pueden surgir debido a la exposición de los animales al parásito o por inestabilidad enzoótica, que está relacionada con una cantidad significativa de garrapatas en el entorno. Esta inestabilidad enzoótica se refiere a la condición de equilibrio entre la enfermedad y el desarrollo de inmunidad que se da cuando la población del vector es insuficiente. En estos casos no todos los becerros se infectan con *Babesia* en sus primeros meses de vida. Este periodo inicial está marcado por la resistencia natural basada en la edad, que le provee protección al becerro debido a una serie de componentes presentes en el suero. Como resultado, algunos individuos serán susceptibles en su etapa adulta y podrían

manifestar un cuadro clínico más severo (Mosqueda *et al.*, 2012a; Ramos *et al.*, 2015).

2.1.2 Generalidades de *Babesia* spp

Los parásitos del género *Babesia* son protozoarios que pertenecen a un filo de microorganismos denominado Apicomplexa, nombre que se les ha dado por poseer un conjunto de estructuras al que se denomina “complejo apical”, cuyo rol es importante en el proceso de infección. Otros parásitos como *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* también pertenecen al filo Apicomplexa (Terkawi *et al.*, 2011; Vannier *et al.*, 2015). La mayoría de parásitos carecen de estructuras como cilios, pseudópodos o flagelos (Muñoz, 2016).

Las micronemas, las roptrias, los anillos polares y el conoide son estructuras que forman el complejo apical. El orden Piroplasmida, al que pertenece el género *Babesia*, se caracteriza por carecer de conoide (Figura 1) (Vignau *et al.*, 2005; Terkawi *et al.*, 2011; Hidalgo Ruiz *et al.*, 2018).

Algunos parásitos Apicomplexa como *Plasmodium* spp y *Babesia* spp poseen un mecanismo de invasión similar. Los organelos del complejo apical como las micronemas facilitan la orientación hacia la membrana de las células en el mamífero (Mosqueda *et al.*, 2012b). Después de esto, las micronemas y las roptrias secretan una serie de proteínas que son necesarias en el proceso de invasión a la célula blanco. Las proteínas de los micronemas (MICs) son indispensables para el contacto inicial y la adhesión del parásito a la célula (Mosqueda *et al.*, 2012b; Hernández-Silva *et al.*, 2018).

La estructura de estas proteínas secretadas se ha analizado y los resultados sugieren que existe una función conservada entre distintas especies de *Babesia* (Jalovecka *et al.*, 2019).

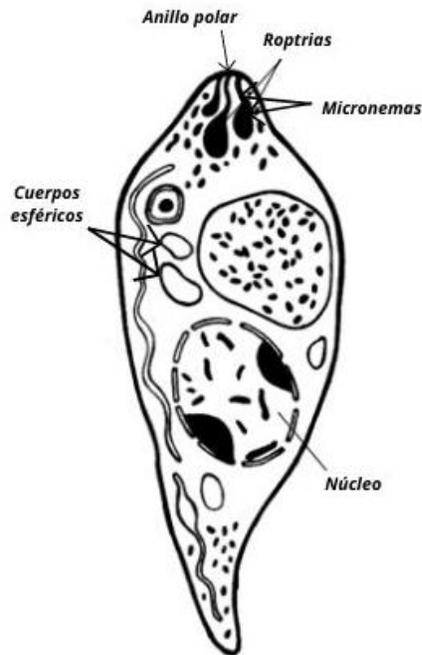


Figura 1. Esquema de la estructura de *Babesia* spp, señalando la presencia de las roptrias, micronemas, cuerpos esféricos y anillo polar del complejo apical (Tomado y modificado de Vignau *et al.*, 2005).

2.1.3 Ciclo biológico

El ciclo de desarrollo del parásito (Figura 2) persigue dos objetivos principales, el primero es el de preservar la especie por medio de la propagación y el segundo consiste en mantener la transmisión de hospedante a hospedante (Jalovecka *et al.*, 2019).

Las especies de *Babesia* poseen un ciclo de tipo indirecto ya que mantiene interacción con dos organismos, el invertebrado y el mamífero. El hospedante definitivo del parásito es la garrapata, donde lleva a cabo una fase de reproducción sexual; mientras que en el vertebrado realiza una fase de reproducción asexual por medio de fisión binaria (Vignau *et al.*, 2005; Terkawi *et al.*, 2010).

2.1.3.1 Ciclo de vida de *Babesia* spp en el bovino

La garrapata en estadio de larva (para *B. bovis*) o de ninfa/adulto (para *B. bigemina*) que se alimenta de sangre del mamífero, inocula la fase infectiva del parásito, los esporozoítos, junto con algunas sustancias vasoactivas. Posteriormente, el esporozoíto invade al eritrocito por medio de endocitosis, con ayuda de su complejo apical y algunas proteasas secretadas (Suárez & Noh, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012b).

Young & Morzaria (1986), describen una serie de pasos en el proceso de invasión de la célula, empezando con el contacto que se establece entre el eritrocito y el parásito, la orientación, de forma que el complejo apical quede en contacto con la membrana de la célula, la invaginación y la internalización.

Los parásitos llevan a cabo la multiplicación asexual dentro de los eritrocitos del bovino, pasando por una serie de cambios en los que pierde organelos y se convierte en una forma parasitaria conocida como trofozoíto. El trofozoíto queda en el citoplasma y, a partir de este se generan por merogonia, dos merozoítos que provocan la ruptura de la membrana celular y son liberados al torrente sanguíneo, donde cada uno de ellos buscará otro eritrocito para infectar (Chauvin *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012b). Una vez que cada merozoíto invade a otra célula comienza nuevamente el proceso asexual para producir trofozoítos y posteriormente dos merozoítos nuevos (Young & Morzaria, 1986; Suárez & Noh, 2011).

Este ciclo dentro del mamífero se mantendrá de forma indefinida y asíncrona (pueden ocurrir las diferentes etapas en el mismo momento) dependiendo de la patogenicidad del parásito, la respuesta del hospedante (si muere o su sistema inmunitario controla la invasión) y si hay aplicación de algún tratamiento para la eliminación del parásito (Chauvin *et al.*, 2009).

2.1.3.2 Ciclo de vida de *Babesia* spp en la garrapata

Por otra parte, cuando una garrapata se alimenta de sangre conteniendo los merozoítos, la mayoría de estos llega a ser destruidos, pero algunos pasan al lumen del intestino de la garrapata, donde se transforman en cuerpos radiales (gametos) que poseen forma oval o alargada. Estos gametos se fusionan y dan lugar a un

zigoto oval (8-10 μm) cuya estructura se alarga y adquiere movilidad, forma conocida como ooquineto, que penetra a las células del intestino donde comienzan la esporogonia y se obtiene como resultado los esporoquinetos. Estos últimos continuarán el ciclo atravesando el intestino de la garrapata, alcanzando la vía hemolinfática y llegando a diferentes sitios anatómicos como las células musculares, células de los túbulos de Malpighi o a las células del ovario, en las que infectarán a los huevos (transmisión transovárica). En las larvas, los esporoquinetos alcanzan las glándulas salivales, donde se convierten en una gran cantidad de esporozoítos infectantes que continuarán el ciclo una vez que esta garrapata vuelva a succionar sangre de un mamífero (Young & Morzaria, 1986; Chauvin *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012b).

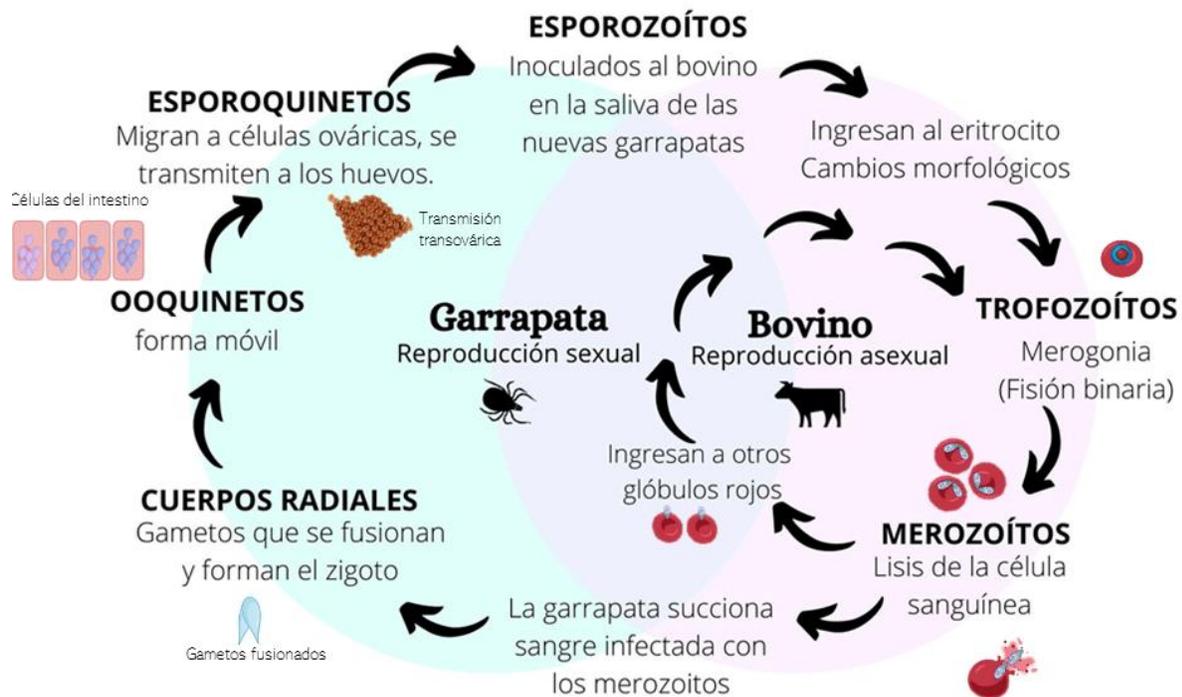


Figura 2. Ciclo biológico de *Babesia* spp. Adaptado de Mosqueda *et al.* (2012b) (Mosqueda *et al.*, 2012b).

Los parásitos han desarrollado mecanismos que les permiten alargar su vida, un ejemplo de ello es la transmisión transovárica, que garantiza que una sola garrapata transmitirá el parásito a una gran cantidad de larvas (Jalovecka *et al.*, 2019). Algunas especies de *Babesia* como *B. bigemina*, *B. canis* o *B. ovis* pueden transmitirse en la garrapata sin necesidad de que estas se alimenten de algún mamífero infectado (Young & Morzaria, 1986).

2.2 Babesiosis por *B. bigemina*

La enfermedad causada por *B. bigemina*, después de la causada por *B. bovis*, es de las más severas en los bovinos en el mundo (Figueroa *et al.*, 1992). Es transmitida por garrapatas en estadio de ninfa o adulto y los efectos patogénicos que causa se relacionan con la ruptura del eritrocito, como la anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia. El periodo de incubación dura entre 12 y 16 días en inoculaciones experimentales. La parasitemia en sangre periférica puede ser alta (alcanzando un 10%) en contraste con *B. bovis* donde es menor al 1% (Young & Morzaria, 1986; Figueroa *et al.*, 1992; Zintl *et al.*, 2005; Muñoz, 2016).

2.2.1 Características morfológicas

B. bigemina se caracteriza por ser de gran tamaño en comparación con otras especies de *Babesia*. Los merozoítos miden de 4.5 - 2.5 μm , y se presentan pares formando un ángulo agudo entre ellos, a comparación de *B. bovis* que son más pequeñas, 2.4 - 1.5 μm , cuyos merozoítos forman un ángulo obtuso entre ellos (Figura 3) (Bock *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2015; Muñoz, 2016).

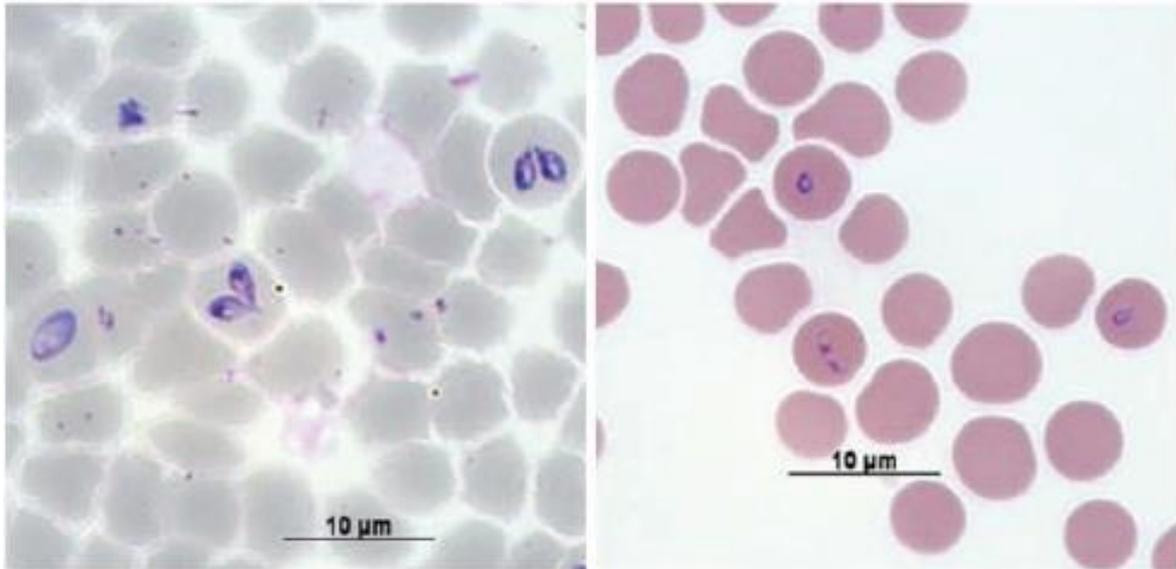


Figura 3. Comparación del tamaño de los merozoítos de *Babesia* dentro de eritrocitos de bovinos. A la izquierda *B. bigemina* y a la derecha *B. bovis* (Mosqueda *et al.*, 2012b).

Chauvin *et al.* (2009), reportan una clasificación basada en el tamaño de las distintas especies del género *Babesia*. Las que son clasificadas como de gran tamaño, cuyo merozoíto es casi del tamaño del radio del eritrocito; en este grupo se incluye *B. bigemina* junto con *B. canis*, *B. major*, y *B. ovata*, entre otras. Las de tamaño pequeño, cuyo merozoíto es de menor medida que el radio del eritrocito, por ejemplo *B. bovis*, *B. ovis*, *B. gibsoni*, entre otras.

2.2.2 Genoma de *B. bigemina*

Sachman-Ruíz *et al.* (2021), hicieron estudios relacionados con el proceso de atenuar una cepa y a partir de esto secuenciaron el genoma de *B. bigemina* comparando las secuencias de la cepa atenuada en laboratorio encontrando notables diferencias entre algunas características como la longitud total (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de las características del genoma de *B. bigemina* entre una cepa atenuada y una virulenta. Traducido de Sachman-Ruíz *et al.*, 2021.

Datos de secuenciación/cepa	<i>B. bigemina</i> atenuada	<i>B. bigemina</i> virulenta
# contigs	3914	1537
Longitud total (pb)	9,180,241	11,852,459

GC (%)	52.3	50.74
Cobertura (X)	264	89
# N's por 100 kpb	0.03	0.01
GenBank No. de acceso	JAFBJA000000000	PRJNA685857
GC = Contenido de guaninas y citocinas. # N's = Número de nucleótidos no asignados.		

Los estudios reportados sobre el genoma de *Babesia bigemina* son menos con respecto a los que han sido publicados de *Babesia bovis*, por esta razón se tienen menos datos acerca de las características en comparación con otros parásitos de este filo.

2.2.3 Respuesta Inmunitaria

La resistencia natural a la enfermedad se ha estudiado desde hace años y se ha determinado que es independiente de los anticuerpos. Los becerros, en sus primeros nueve meses de vida, presentan una serie de componentes en el suero que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento del parásito y por lo tanto no presentan la enfermedad de forma severa (Zintl *et al.*, 2005; Mosqueda *et al.*, 2012a). Inicialmente, los estudios sobre la resistencia a la enfermedad la relacionaban con los anticuerpos que la madre transmitía a la cría por medio del calostro, sin embargo, incluso los novillos cuyas madres no presentaban anticuerpos eran resistentes a la enfermedad. En estudios más recientes se ha demostrado que en este fenómeno intervienen la interleucina 12 (IL-12), el interferón gamma (INF- γ) en conjunto con la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Goff *et al.*, 2001; Bock *et al.*, 2004).

El hospedante desarrolla mecanismos tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la adquirida ante la exposición al parásito (Figura 4). El rol de importancia que presenta el bazo ha sido demostrado, ya que en animales que han pasado por una esplenectomía las parasitemias suelen ser más altas. La primera línea de defensa ante una primera exposición está conformada por los macrófagos, monocitos activados y los neutrófilos por medio de mecanismos como la fagocitosis y la secreción de citocinas. Todos estos mecanismos se encuentran mejor estudiados en *B. bovis*, en la que se considera a la fagocitosis como el mecanismo

por el cual son eliminados los parásitos en el ganado, todo esto en conjunto con anticuerpos específicos que actúan como opsoninas (Bock *et al.*, 2004).

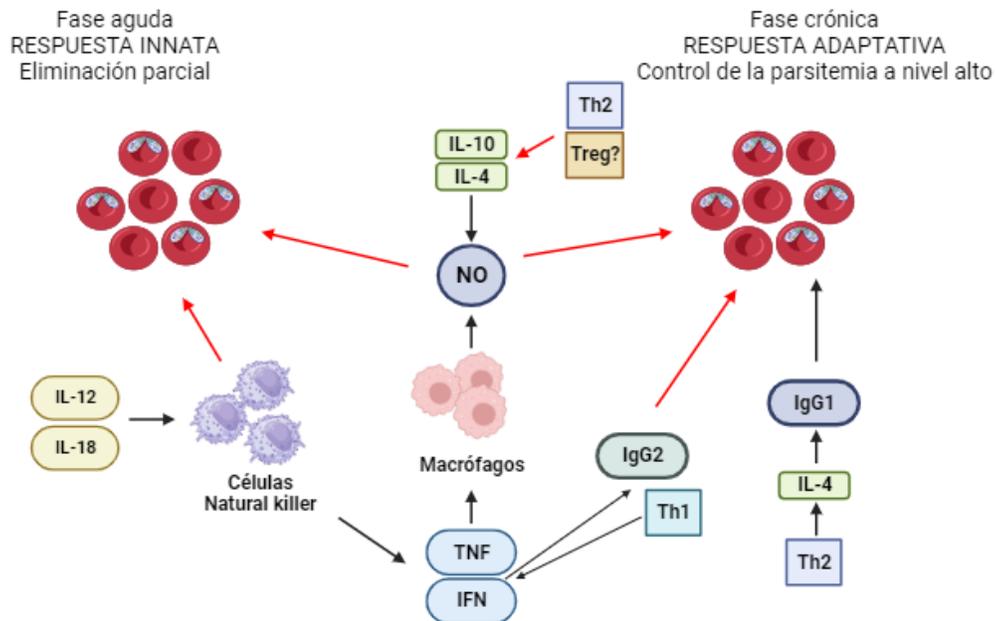


Figura 4. Regulación de los mecanismos de respuesta inmunitaria ante una infección por *B. bovis*. (Adaptado de Chauvin *et al.*, 2009).

La producción temprana de óxido nítrico (NO) por parte del bazo de animales jóvenes les confiere la capacidad de controlar la infección evitando un cuadro clínico severo (Zintl *et al.*, 2005; Chauvin *et al.*, 2009), este en conjunto con la IL-12 y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) inducen el incremento de la fagocitosis por parte de los macrófagos (Bock *et al.*, 2004).

Un animal que se recupera de esta enfermedad desarrolla inmunidad ante una futura exposición (Cantó *et al.*, 2003). La reacción cruzada entre *B. bovis* y *B. bigemina* no ha sido descrita, sin embargo, algunos autores expresan haber encontrado que una exposición ante *B. bigemina* provee cierta protección contra *B. bovis* pero no viceversa (Bock *et al.*, 2004).

2.3 Control de la Babesiosis bovina

2.3.1 Control del vector

Uno de los métodos de control de la babesiosis consiste en disminuir la población del vector transmisor del parásito, la garrapata. La prevención por medio de acaricidas llega a ser efectiva, sin embargo, ha disminuido su eficacia. Las desventajas de los acaricidas son, por ejemplo, el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas, además del costo de los químicos, que puede sobrepasar el alcance de algunos ganaderos (Young & Morzaria, 1986).

Se han desarrollado vacunas basadas en proteínas recombinantes con la finalidad de inducir en el ganado una respuesta inmunitaria de protección contra la garrapata. La proteína Bm86, extraída del intestino de *Rhipicephalus microplus*, es un ejemplo. Entre las ventajas de la prevención por medio de vacunación se encuentra la relación entre el costo y la efectividad, la disminución de la contaminación del ambiente y del uso de productos acaricidas; sin embargo, para fines de erradicación se puede complementar con los acaricidas (Pérez de León *et al.*, 2010).

2.3.2 Control del parásito

2.3.2.1 Quimioterapéuticos

Los quimioterapéuticos son utilizados para tratar a los bovinos infectados por *Babesia*. La efectividad de una serie de fármacos contra *B. bovis* y *B. bigemina* ha sido reportada, por ejemplo, el Imidocarb (Imidogan[®] o Imidocarb Sanfer[®]), el diaceturato de diminazeno (Pirofort[®] o Berenil[®]), entre otros, de los cuales la dosis y la vía de administración se indican en el Cuadro 2 (Bock *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2012b).

Cuadro 2. Fármacos efectivos contra *Babesia* en bovinos (Tomado de Mosqueda *et al.*, 2012b).

Componente	Dosis	Vía de Administración
Imidocarb	1-3 mg/kg	IM o SC
Aceturato de diminaceno	3-5 mg/kg	IM
Nerolidol	25 µM	-
Triclosán	50 µg/ml	-

El tratamiento con quimioterapéuticos necesita ser complementado con terapia de soporte, como la administración de fluidos, transfusión sanguínea, dextrosa y vitaminas del complejo B (Mosqueda *et al.*, 2012b; Muñoz, 2016). La recuperación de la enfermedad, en zonas endémicas, depende de la detección temprana y la administración inmediata del tratamiento (Mosqueda *et al.*, 2012b).

Este método de control presenta desventajas, ya que los fármacos se han vuelto más costosos. Especialmente, el costo del tratamiento se considera muy elevado como para ser la única forma de control utilizada. Además de que el uso indiscriminado de los fármacos aumenta la posibilidad de generar resistencia en los parásitos y que haya efecto residual del fármaco en los productos destinados al consumo humano como la carne o la leche (Young & Morzaria, 1986; Suarez and Noh, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012b).

2.3.2.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la babesiosis es una herramienta importante para el control. La historia epidemiológica debe ser tomada en cuenta, es decir, si el animal procede de zonas endémicas a la enfermedad o ha estado expuesto a garrapatas. El examen físico es necesario para definir si los signos clínicos son consistentes con los de babesiosis. Finalmente, el diagnóstico debe ser confirmado por medio de pruebas de laboratorio (Vannier *et al.*, 2015).

Los métodos de detección se han mejorado actualmente, estos pueden dividirse en métodos directos, que detectan al parásito, y los métodos indirectos, que detectan o el material genético del parásito o la presencia de anticuerpos que el animal ha generado por la exposición al parásito. Existen diversas opciones con alta sensibilidad y especificidad, aunque todas ellas varían en el tiempo requerido, los costos y la sofisticación del equipo necesario (Kim *et al.*, 2007; Pérez de León *et al.*, 2010).

La microscopía está entre los métodos directos, con ella es posible observar al parásito dentro del eritrocito en sus diferentes formas: trofozoíto o merozoíto, o en el caso de *B. bovis* los eritrocitos de los capilares del cerebro (post mortem). Esta técnica ofrece buenos resultados y el equipo necesario no es tan sofisticado; sin

embargo, se necesita experiencia y práctica para la detección eficiente, además el identificar al parásito al microscopio puede ser complicado cuando los animales presentan bajas parasitemias (Kim *et al.*, 2007; Pérez de León *et al.*, 2010; Mosqueda *et al.*, 2012b).

Los métodos moleculares se describen como indirectos, estos permiten detectar la presencia de una parte del ADN o ARN del patógeno y a la fecha son considerados los más sensibles. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método por el cual se puede amplificar un fragmento del genoma, es decir, que genera una gran cantidad de copias del fragmento de ADN con ayuda de oligonucleótidos específicos. Métodos como este tienen la ventaja de ser altamente específicos, pero se requiere equipo más sofisticado, personal capacitado y mayor tiempo para realizar una prueba de PCR (Kim *et al.*, 2007; Mosqueda *et al.*, 2012b).

Por su parte, el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), y la prueba de Fijación del Complemento (CFT), entre otros, son opciones de métodos de diagnóstico serológicos. La efectividad de su función es determinada con base en el resultado: un resultado positivo indica la exposición al patógeno, mientras que uno negativo puede sugerir la falta de exposición previa o estar en una etapa inicial de la infección (Kim *et al.*, 2007; Pérez de León *et al.*, 2010).

2.3.2.3 Vacunación

Las vacunas que confieren protección inmunológica contra *B. bovis* y *B. bigemina*, consisten en la inmunización con el parásito vivo atenuado, sin embargo, han presentado ciertas limitaciones como el hecho de que requieren estrictamente mantener la cadena fría durante el transporte y existe posibilidad de que se revierta la virulencia. O la posibilidad de contaminación con otros patógenos (Bock *et al.*, 2004; Pérez de León *et al.*, 2010). Estudios con cepas de *Babesia* spp que han sido atenuadas por pasajes han sido desarrollados también (Suárez & Noh, 2011).

Un inmunógeno atenuado contra *B. bovis* y *B. bigemina* ya ha sido desarrollado en México, se trata de un compuesto para el cual se utilizó la cepa BOR de *B. bovis* (atenuada por radiación) y la cepa BIS de *B. bigemina* (atenuada

por pases en cultivo *in vitro*), que al ser inoculado en los animales es capaz de proveerles protección, con resultados de eficacia de hasta un 100% (Cantó *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2011). Sin embargo, esta vacuna no está disponible en el mercado.

También se ha propuesto que las proteínas con rol funcional relevante en procesos en la infección, como la invasión del parásito al eritrocito, son las más indicadas para ser investigadas como candidatos vacunales (Florin-Christensen *et al.*, 2014).

La evaluación de la estabilidad enzoótica de una zona debe ser mejorada para determinar si es recomendable la profilaxis por medio de vacunación. También, es necesaria la existencia de vacunas eficaces y seguras, que tengan buena capacidad de inducir una respuesta inmunitaria y que les confiera protección a los animales (Mosqueda *et al.*, 2012a).

2.4 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP)

La TCTP es una proteína ubicua considerada como un homólogo del Factor Liberador de Histamina (HRF). El HRF se ha encontrado en humanos, en los cuales se ha relacionado con funciones como la liberación de histamina y la modulación de la producción de algunas citocinas por células como los basófilos y eosinófilos, por ejemplo, estimula la producción de IL-8 por parte de los eosinófilos, o la IL-4 e IL-13 por los basófilos (Mathieu *et al.*, 2015).

El nombre de esta proteína se le dio debido a que fue aislada a partir de células tumorales, en las que se encuentra sobreexpresada, y porque su regulación se lleva a cabo a nivel traduccional. Esta proteína se ha denominado también de otras formas, por ejemplo, fortalina, P21, Q23 y P23 para grupos de clones de ADNc diferentes tanto de ratones como de humanos (Boomer & Thiele, 2004; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Demarta-Gatsi *et al.*, 2017).

2.4.1 TCTP en organismos eucariontes

La TCTP ha sido estudiada en una gran variedad de eucariontes, entre ellos mamíferos, plantas, hongos, levaduras e insectos, en los cuales se ha analizado y comparado la estructura tridimensional de la proteína (Figura 5) determinando importante similitud entre ellas (Boomer & Thiele, 2004).

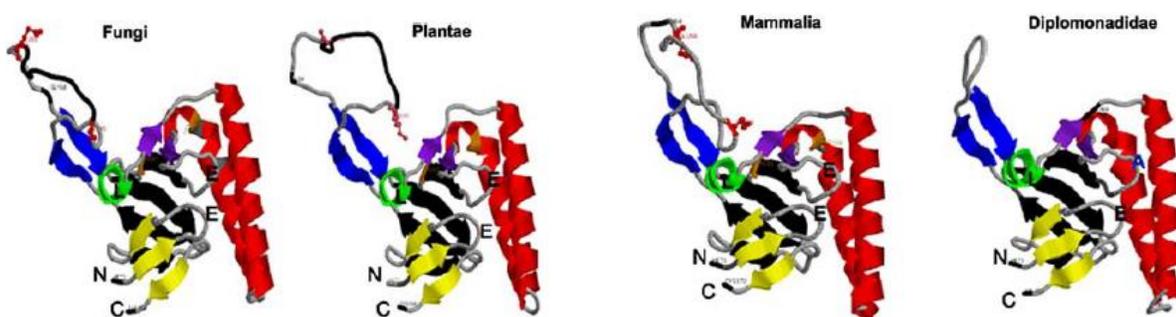


Figura 5. Estructuras tridimensionales de TCTP de diferentes organismos eucariontes en las que se observa evidente similitud entre ellas (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

Esta proteína es estructuralmente similar a la familia de chaperonas libres de nucleótidos de guanina conocida como Mss4/Dss4. En la estructura de la molécula se han identificado tres dominios diferentes: cuatro láminas β , tres hélices α y una estructura conocida como asa flexible, todos ellos se unen formando una estructura compleja (Thaw *et al.*, 2001).

En la estructura de la proteína se ha localizado, por estudios de cristalografía de rayos X, un sitio de unión a la tubulina. Este sitio es el mismo que la región de unión al calcio, que corresponde a los dominios helicoidales de la estructura (Gachet *et al.*, 1999; Boomer & Thiele, 2004).

En la secuencia del gen *tctp* de diferentes organismos estudiados, como humanos, ratas y ratones, se ha encontrado la presencia de intrones y exones, de promotores tales como la caja TATA, pseudogenes (15, 18 y 13 respectivamente) (Boomer & Thiele 2004; Calderón-Pérez *et al.*, 2014). En la secuencia de ARNm no se ha identificado ninguna región codificante como péptido señal (Boomer and Thiele, 2004).

La proteína TCTP se considera indispensable para el desarrollo de los organismos, y esto se llegó a confirmar en *Drosophila* y en ratones, ya que individuos con deficiencia de la proteína mueren (Wu *et al.*, 2009). Hsu *et al.*, en el 2007 y Chen *et al.*, también en el 2007, realizaron estudios *in vivo* en modelos de estos organismos y demostraron que las funciones realizadas por la proteína son indispensables para el desarrollo de los individuos.

La expresión de TCTP en los mamíferos, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional, se encuentra regulada por diferentes factores, como las condiciones de estrés, algunas señales de crecimiento emitidas por los factores de crecimiento, factores de desarrollo de tejido, señales pro-apoptosis, citocinas, el aumento de calcio a nivel del citoplasma, y en el caso de las plantas el ciclo circadiano (Gachet *et al.*, 1999).

La proteína está implicada en gran variedad de procesos fisiológicos, por su interacción con algunas proteínas como la tubulina y la actina de los microtúbulos, de forma que regula su reordenamiento y le da estabilidad a la célula durante la mayor parte del ciclo celular (Gachet *et al.*, 1999; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). Otros ejemplos de procesos en los que TCTP participa son la proliferación de células a través de su interacción con proteínas G (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2015), en el crecimiento y reprogramación de las células, la inhibición de la apoptosis, e incluso se le asocia con diferentes tipos de cáncer en humanos, por el rol que representa en la transformación maligna de las células (Calderón-Pérez *et al.*, 2014). TCTP también se relaciona con algunos factores de elongación como eEF1A y eEF1 β , necesarios para este proceso por su participación en el transporte de ARN de transferencia (ARNt) al ribosoma durante la traducción de proteínas (Chen *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009).

La participación de la proteína TCTP también se ha demostrado en la regulación de la respuesta inmunológica en organismos vertebrados por su capacidad para unirse a múltiples ligandos. Esta produce algunos efectos como la liberación de histamina en respuesta a la presencia de IgE, induciendo la inflamación, la proliferación de células B y la modulación en la secreción de citocinas

por parte de los basófilos y los eosinófilos. Un efecto inflamatorio en problemas de asma fue encontrado en modelos de ratones (Mathieu *et al.*, 2015). La proteína tiene actividad antiapoptótica en parásitos como *Giardia lamblia* y en garrapatas *Ixodidae*, en comparación de algunas levaduras donde su actividad es proapoptótica, posiblemente por la interacción de esta con membranas mitocondriales (Hinojosa-Moya *et al.*, 2007).

2.4.2 Estructura de TCTP en organismos Apicomplexos

La TCTP se ha encontrado expresada también en múltiples parásitos del filo Apicomplexa. En *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria en humanos, es uno de los más estudiados ya que representa una de las principales causas de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo. Este parásito es transmitido por mosquitos y en el humano invade los glóbulos rojos causando signos clínicos graves, incluso a nivel del sistema nervioso central (Demarta-Gatsi *et al.*, 2017).

La TCTP de *Plasmodium* spp., presenta una estructura muy similar al HRF de los humanos. Mathieu *et al.* (2015), reporta que el 33% de la secuencia de sus aminoácidos es idéntica, mientras que el 55% es similar, así mismo Calderón-Pérez *et al.* (2014), mencionan datos similares en el caso de la TCTP de *Plasmodium falciparum* (*PfTCTP*), cuya secuencia es un 34% idéntica y un 59% similar a la proteína en los humanos.

Hinojosa-Moya *et al.* (2008), realizó una búsqueda de las secuencias consenso de la TCTP en una amplia variedad de organismos con la finalidad de comprobar la presencia de la α -hélice, que no se encuentra en otros organismos eucariontes (Figura 6).

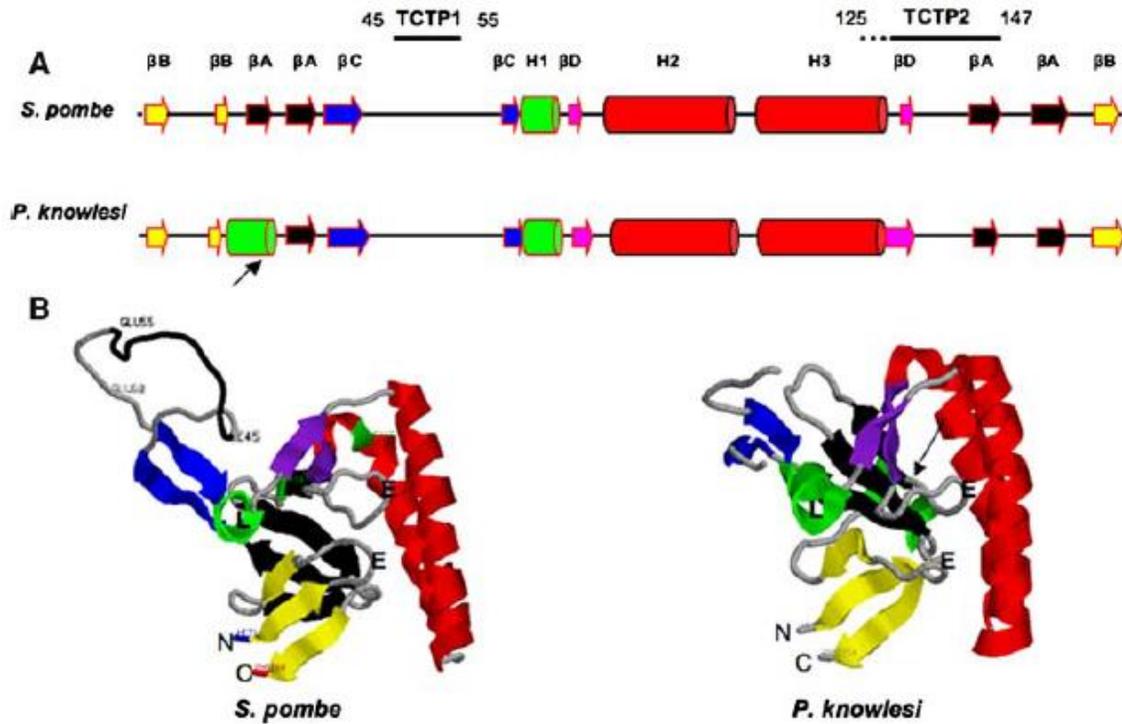


Figura 6. Comparación de las estructuras bidimensional y tridimensional de TCTP de *Schizosaccharomyces pombe* y *Plasmodium knowlesi* donde se señala la presencia de una α -hélice señalada con la flecha en el panel A en *P. knowlesi* (Hinojosa-Moya *et al.*, 2008).

2.4.3 Funciones de TCTP en Apicomplexos

Mathieu *et al.* (2015) y Demarta-Gatsi *et al.* (2017), realizaron un estudio en roedores, inoculando a un grupo de ellos con *Plasmodium berghei* y obtuvieron como resultado que la TCTP cumple su función en la pre-invasión al eritrocito, por medio de la alteración en la producción de la interleucina 6 (IL-6). La IL-6 es necesaria para el control de enfermedades parasitarias por parte del hospedante, esto afecta la respuesta celular por el desarrollo o mantenimiento inadecuado de las células T favoreciendo la persistencia del parásito en el organismo.

La estructura adicional que se encontró en organismos como *P. berghei*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* ha sido estudiada y se ha determinado que tiene un potente sitio de unión a la proteína G. La expresión de TCTP en individuos infectados por *Plasmodium falciparum* también ha sido estudiada y se ha encontrado mayor concentración de la proteína en sangre del hospedante. La TCTP del parásito induce la liberación de histamina por parte de los mastocitos, esto fue comprobado utilizando *E. coli* como vector de expresión (Xoconostle-Cazárez & Ruíz-Medrano, 2017).

Boomer & Thiele (2004), mencionan que la proteína se ha relacionado con parásitos resistentes a la artemisina, que funciona como fármaco antimalaria. En estos parásitos la sobre expresión de la proteína sugiere su participación en la resistencia a este fármaco.

Calderón-Pérez y colaboradores (2014), realizaron un experimento donde incubaron TCTP de *Plasmodium falciparum* (*PfTCTP*) y TCTP de humanos (*HsTCTP*) en dos grupos de células B de ratones, con lo que determinaron que la proliferación de estas células es menor en el grupo incubado con *PfTCTP* comparada con el otro grupo incubado con *HsTCTP*. Además, la proteína de *P. falciparum* presentó mayor afinidad en la unión a las células B en comparación con la proteína de humanos, por esto se ha hipotetizado que el alfa hélice adicional de la estructura en Apicomplexos le confiere esta capacidad al parásito para bloquear de forma competitiva a la proteína de su hospedante, evitando así la proliferación de células B.

2.4.4 Uso de TCTP como inmunógeno

La TCTP se ha sugerido como candidato para el desarrollo de estrategias de protección contra las enfermedades como malaria, al ser una enfermedad de importancia en humanos, ha sido estudiada principalmente en esta especie. Taylor *et al.* (2015) propone que los ratones inmunizados con esta proteína desarrollan mayor resistencia a la enfermedad. En un estudio experimental, ellos demuestran que al desafiar contra *Plasmodium yoelii* a un grupo de ratones inmunizados con

TCTP, se disminuye el porcentaje de parasitemia, comparado con un grupo control (no inmunizados con la proteína TCTP).

La fracción peptídica única de la estructura de TCTP en organismos Apicomplexos podría proveer inmunidad protectora por la posibilidad de que sea esta la que facilita la invasión del parásito y genera la supresión de la respuesta inmunitaria al tener mayor afinidad a los receptores de la proteína en el hospedante (Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017).

2.4.5 Uso de TCTP como inmunógeno contra *Babesia bovis*

La TCTP ya ha sido caracterizada y probada como candidato vacunal contra *Babesia bovis*. Pérez Almeida (2020), realizó el análisis bioinformático de la estructura tridimensional y secuencia consenso de TCTP de *B. bovis*, observó la presencia de la alfa hélice, característica de la proteína de los Apicomplexos, determinando su similitud con la que presenta *P. falciparum*. Realizó también alineamiento con la secuencia de aminoácidos de la proteína de diferentes especies, como *B. bigemina* determinando que existe similitud de 86.29% entre ellas. La TCTP de *Bos taurus* y de *Bos indicus* tuvo una similitud del 31.76% al compararla con la de *Babesia bovis*.

Pérez Almeida (2020), trabajó también con la predicción bioinformática de la estructura terciaria de TCTP de *B. bovis* cuyo resultado tuvo una similitud de 59.64% con la de TCTP de *P. falciparum*.

La predicción de péptidos con capacidad de ser epítomos B fue realizada con el uso de herramientas bioinformáticas a partir de la secuencia consenso de la TCTP de *B. bovis*. Estos péptidos fueron sintetizados y con ellos se inmunizó un grupo de bovinos, al que posteriormente desafió con una cepa virulenta de *B. bovis*. Los animales del grupo inmunizado no requirieron tratamiento para su recuperación, contrario a lo ocurrido con el grupo control (Pérez Almeida, 2020).

2.4.6 TCTP de *Babesia bigemina*

Previamente, se llevó a cabo la búsqueda bioinformática de la secuencia del gen *tctp* de *B. bigemina*, en las bases de datos del Centro Nacional de Información

Bioteconológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI). El gen fue identificado como Factor Liberador de Histamina, putativo (No. Referencia XP_012768057.1), con una longitud de 601 pares de bases que comprenden tres exones y dos intrones.

La secuencia del gen fue identificada en el genoma del parásito, situado en el cromosoma II. Posteriormente, se diseñaron dos oligonucleótidos externos, uno en dirección sentido y otro en antisentido, para amplificar el gen completo mediante PCR, a partir de muestras de ADN del parásito, aislado de Michoacán.

La verificación del producto de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose una banda de 865 pares de bases, la cual fue posteriormente purificada y sometida a secuenciación. La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia de referencia, revelando un porcentaje de similitud del 97.67% mediante el análisis con ClustalW (Datos no publicados).

III. JUSTIFICACIÓN

La babesiosis es una enfermedad distribuida ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, y puede ser mortal si no se trata a tiempo. Esta enfermedad continúa siendo un problema en los sistemas de producción de diversas zonas de México, donde es causada por *B. bovis* y *B. bigemina*, dos de las especies de mayor impacto económico. Las pérdidas económicas se deben mayormente a la mortalidad por enfermedad, generando pérdidas de animales de alto valor genético, además de la disminución de la producción, abortos, costos de quimioterapéuticos, etc. El control de la enfermedad implica la utilización de diferentes métodos, como el empleo de garrapaticidas para controlar el vector, además de fármacos dirigidos contra *Babesia* para tratar la enfermedad. Sin embargo, estos métodos han presentado desventajas significativas, lo que ha ocasionado un aumento notable en los costos asociados al control de esta enfermedad. Estas limitaciones han generado la necesidad de desarrollar alternativas para la prevención de la enfermedad, como la creación de vacunas que contienen al parásito vivo atenuado, las cuales han resultado ser muy efectivas, pero poco seguras y costosas. La TCTP ya ha sido probada como vacuna experimental contra otros organismos del filo Apicomplexa, como *Plasmodium* spp y péptidos de esta han sido evaluados como vacuna contra *Babesia bovis*, obteniendo buenos resultados de eficacia. La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente no ha sido caracterizada en *B. bigemina*, pero al ser este un parásito que pertenece al filo Apicomplexa es recomendable evaluar péptidos de esta como candidatos inmunogénicos con la finalidad de disminuir la severidad de la enfermedad.

IV. HIPÓTESIS

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) se expresa en *Babesia bigemina* y contiene epítomos B conservados que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la expresión de TCTP en *Babesia bigemina* e identificar epítomos B conservados que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la transcripción y expresión de TCTP.
2. Evaluar la inmunogenicidad de péptidos de TCTP.
3. Determinar la capacidad de neutralización del parásito por los anticuerpos anti-TCTP.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo del presente trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, de la UAQ (número: 99FCN2021). Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas y en Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.1 Análisis de transcripción del gen *tctp*

El análisis de transcripción del gen en estadios intraeritrocíticos de *B. bigemina* se realizó con eritrocitos de bovino infectados con el parásito cultivados *in vitro*.

El protocolo de Hernández-Silva *et al.* (2018), se tomó como referencia para el desarrollo de este objetivo. Se diseñaron oligonucleótidos internos específicos para la amplificación de un fragmento de ADN. La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo de dos muestras de eritrocitos lavados, infectados con *Babesia bigemina*, y obtenidos de cultivo con 6% de parasitemia, para obtener el ARN total. Posteriormente, se realizó la retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm), obtenido en las muestras de ARN total. El ADN y ADNc se amplificó por PCR y los productos de esta (amplicones) fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa.

6.1.1 Diseño de oligonucleótidos internos específicos

La secuencia del gen *tctp* sin intrones se obtuvo por medio de bioinformática para el diseño de un par de oligonucleótidos internos, sentido y antisentido. Se utilizó el programa Oligoanalyzer™ Tool, de Integrated DNA Technologies (IDT) para predecir las características de los oligonucleótidos. Finalmente, las secuencias de los oligonucleótidos obtenidas se enviaron a sintetizar a la empresa Oligo T4 en Irapuato, Guanajuato.

6.1.2 Extracción de ácidos nucleicos para obtener ARN total

Los eritrocitos de muestras de cultivo fueron lavados con solución VyM (Vega *et al.*, 1985), para eliminar el medio en el que estaban suspendidos. Se agregaron 500 µl de VyM a cada muestra, después se centrifugaron a 25 000 g durante 5

minutos y por último se decantó el sobrenadante. Este proceso fue repetido en dos ocasiones.

La extracción de ácidos nucleicos de eritrocitos infectados con *B. bigemina* se realizó con el método de fenol-cloroformo, utilizando Tri Reagent[®] Solution (Sigma), a través del siguiente protocolo (TriReagent[®]-Manufacturer's protocol, 1995):

1. Homogenización: Se agregó Tri Reagent[®] Solution en proporción de 900 µl por cada 100 µl de eritrocitos lavados, y se homogenizó por pipeteo repetitivo.
2. Separación: Las muestras homogeneizadas se guardaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. El cloroformo se agregó en volumen de 200 µl por muestra. Los tubos fueron agitados durante 15 segundos. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugaron a 12 000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase fenólica y la fase acuosa fueron separadas.
3. Precipitación del ARN: La fase acuosa se guardó en tubos cónicos de 1.5 ml estériles. Los ácidos nucleicos fueron precipitados con isopropanol, agregando 500 µl a cada muestra. Estas últimas se guardaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, después fueron centrifugadas a 12 000 g durante 8 minutos a 4°C para obtener un pellet en el fondo de cada tubo.
4. Lavado del ARN: El sobrenadante de cada muestra fue retirado y los pellets se lavaron con etanol grado biología molecular al 75%. Las muestras se centrifugaron a 7 500 g durante 5 minutos a 4°C.
5. Solubilización del ARN: El etanol fue retirado de las muestras. Los pellets fueron secados durante 5 minutos para re-suspenderlos en agua grado biología molecular.

6.1.3 Síntesis de ADN complementario a partir del ARN mensajero

El Kit DNase I (Invitrogen, California, USA) se utilizó para degradar el ADN de la muestra, siguiendo las instrucciones del fabricante (No. de catálogo: 18068-015). La reacción de DNase I fue preparada y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se agregó 25 mM de EDTA a la muestra y, se incubó a 65°C durante 10 minutos en un termociclador para inactivar la DNase. Las muestras fueron transferidas a hielo una vez terminada la incubación.

El Kit Tetro™ cDNA Synthesis (Meridian Bioscience, Ohio, USA) (No. de catálogo: BIO-65043) se utilizó para la síntesis de ADNc, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones correspondientes fueron preparadas y posteriormente se utilizó el siguiente programa de termociclado:

- 25°C durante 10 minutos
- 45°C durante 30 minutos
- 85°C durante 5 minutos

Las muestras fueron transferidas a hielo al terminar la última incubación. Los productos de la síntesis de ADNc se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.1.4 Amplificación de un fragmento de ADN y ADNc por PCR

La amplificación del ADNc obtenido se realizó utilizando los oligonucleótidos diseñados. El programa de PCR fue estandarizado utilizando un gradiente de temperatura de alineamiento de 52 a 59°C. Una vez determinada la temperatura de alineamiento correcta, la amplificación de ADN y ADNc se realizó con el siguiente programa de PCR:

- Desnaturalización inicial: 95°C, 1 minuto
- Desnaturalización: 95°C, 15 segundos
- Alineamiento: 52.5°C, 15 segundos
- Extensión: 72°C, 30 segundos
- Extensión final: 72°C, 5 minutos

El producto de la amplificación (amplicón) se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para determinar si las bandas obtenidas presentan el tamaño esperado respectivamente.

6.2 Ensayo de inmunización

Previamente Chyntia Pérez-Almeida identificó regiones con alta probabilidad de ser epítomos B, utilizando herramientas bioinformáticas, diseñando tres péptidos.

Los péptidos fueron sintetizados en formato MAPS-8 por peptide 2.0. Cada péptido se preparó en emulsión con adyuvante para la inmunización de conejos y de bovinos. Las muestras de sangre se obtuvieron para separar y recuperar el suero para posteriores análisis.

6.2.1 Preparación de inmunógenos con péptidos de TCTP

Las dosis de inmunógenos fueron preparadas con la finalidad de determinar si los péptidos A, B y C de TCTP de *B. bigemina*, diseñados por Chyntia Q. Perez Almeida (Figura 7) inducen la producción de anticuerpos específicos.

Los péptidos se solubilizaron en PBS (Phosphate-Buffered Saline) para obtenerlos a una concentración de 2 mg/ml. Los preparados de cada péptido, previamente diluidos en PBS, se emulsificaron en concentración de 100 µg/ml, con el adyuvante Montanide ISA 71® (Seppic, Francia) en proporción 70:30. Cada preparado fue mezclado con la finalidad de formar micelas de tamaño uniforme.



Figura 7. Localización de los péptidos en la proteína TCTP de *B. bigemina*.

6.2.2 Obtención de muestras de sangre e inmunización de conejos y bovinos

Este experimento se realizó con un grupo de siete conejos de la raza Nueva Zelanda, de ocho meses de edad aproximadamente, y con nueve bovinos. Fueron asignados dos animales, de forma aleatoria, por cada péptido diseñado y, uno para

el grupo control. La distribución de los conejos fue la detallada en el Cuadro 3, y la distribución de los bovinos está detallada en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Relación del péptido con el ID de conejo inmunizado.

Péptido	ID de conejo
Control negativo (sin péptidos)	8
A	5
	10
B	3
	2
C	7
	4

Cuadro 4. Relación del péptido con el ID del bovino inmunizado.

Péptido	ID del bovino
Control negativo (sin péptido)	2444
A	8856
	1377
B	2119
	10824
C	9039
	4602
Mezcla de péptidos	2145
	74796

Una muestra de sangre de cada animal fue obtenida sin anticoagulante, antes de la primera inmunización, por medio de punción en la vena auricular. Las muestras fueron procesadas para su uso posterior, centrifugando a 2 500 rpm durante 5 minutos. El suero fue separado para su almacenamiento en congelación a -20°C.

Cada animal fue inoculado con 1 ml de la solución del inmunógeno preparado aplicado por vía subcutánea cercano a los nódulos linfáticos preescapulares. El conejo y el bovino del grupo control fueron inoculados con la emulsión del adyuvante Montanide ISA 71® con PBS, en proporción 70:30.

El calendario de inmunización de los conejos (Cuadro 5) consistió en cinco inmunizaciones con un espacio aproximado de 21 días y una toma de muestra de sangre entre cada una de ellas. La eutanasia a los animales se realizó a los 11 días después de la última inmunización. Las muestras de sangre final se obtuvieron de la vena yugular.

Por otra parte, el calendario de inmunización de los bovinos (Cuadro 6) consistió en cuatro inmunizaciones, con un periodo de 21 días entre cada una.

Cuadro 5. Calendario de toma de muestras de sangre e inmunizaciones en conejos

Actividad	Fecha
1era toma de muestra de sangre	15/diciembre/2021
1era inmunización	18/diciembre/2021
2da toma de muestra	07/enero/2022
2da inmunización	07/enero/2022
3era toma de muestra	29/enero/2022
3era inmunización	29/enero/2022
4ta toma de muestra	12/febrero/2022
4ta inmunización	22/febrero/2022
5ta toma de muestra	17/marzo/2022
5ta inmunización	17/marzo/2022
Toma de muestra de sangre final y eutanasia de los conejos	28/marzo/2022

Cuadro 6. Calendario de toma de muestras de sangre e inmunizaciones en bovinos

Actividad	Fecha
1era toma de muestra de sangre	09/febrero/2023
1era inmunización	09/febrero/2023
2da toma de muestra	02/marzo/2023
2da inmunización	02/marzo/2023
3era toma de muestra	23/marzo/2023
3era inmunización	23/marzo/2023
4ta toma de muestra	13/abril/2023
4ta inmunización	13/abril/2023
5ta toma de muestra	04/mayo/2023

6.3 Determinación del reconocimiento de los péptidos por los anticuerpos específicos anti-péptidos de TCTP mediante ELISA indirecta.

La presencia de anticuerpos anti-TCTP en el suero de los conejos y bovinos inmunizados fue determinada por medio de pruebas de ELISA indirecta. La concentración de péptido necesaria y la dilución de suero óptima se obtuvieron antes de la determinación de anticuerpos específicos.

6.3.1 Estandarización de la concentración de los péptidos A, B y C de TCTP de *B. bigemina* y de los sueros de animales inmunizados.

La concentración de los péptidos se estandarizó realizando diluciones seriadas de 4, 2, 1, 0.5 µg/ml. Y la dilución de los sueros de conejos y bovinos inmunizados fue estandarizada usando diluciones seriadas de 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600.

El procedimiento fue realizado bajo el siguiente protocolo (Hernández-Silva *et al.*, 2018):

1. Las placas de poliestireno para ELISA de 96 pozos de la marca Corning™ se sensibilizaron con 100 µl de los péptidos diluidos en buffer de carbonatos, realizando las diluciones seriadas antes mencionadas. Las placas se cubrieron con plástico para alimentos y se dejaron incubar durante 12 a 16 horas a 4°C. El contenido de las placas se desechó pasado el tiempo de incubación.
2. Los pozos de las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS Tween 0.05% (pH 7.4) en cada pozo, secando entre cada lavado.
3. El bloqueo se realizó con leche descremada al 5% diluida en PBS Tween al 0.05% (pH 7.4). La solución de bloqueo fue colocada en volumen de 200 µl en cada pozo y fue incubada a 37°C durante 1 hora, con agitación orbital de 200 RPM, esta se desechó al finalizar la incubación y se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% (pH 7.4), secando entre cada uno.

4. Las diluciones seriadas de los sueros fueron colocadas en volumen de 100 µl por pozo, por triplicado. Este anticuerpo primario se incubó a 37°C durante 1 hora, con agitación orbital de 200 RPM. El contenido fue descartado al finalizar. Los pozos de las placas fueron lavados de la misma forma descrita anteriormente.
5. Una dilución de 1:6000 de anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo HRP (Peroxidase-conjugated affiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L). Código 711-035-152) fue colocado en volumen de 100 µl por pozo, este fue incubado a 37°C durante 1 hora, con agitación orbital de 200 RPM. El contenido se descartó al finalizar la incubación. Los pozos de las placas fueron lavados de la misma forma descrita anteriormente.
6. La solución de revelado fue colocada en volumen de 100 µl por pozo. La densidad óptica se detectó a 450 nm en un lector de absorbancia para placas de ELISA (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Biorad®) a los 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

6.3.2 Determinación de anticuerpos anti-péptidos de TCTP de *B. bigemina*

La determinación de la producción de anticuerpos anti-péptidos de TCTP se realizó por ELISA indirecta siguiendo el protocolo antes mencionado (6.3.1). La densidad óptica obtenida fue graficada para compararla entre los sueros pre y post inmunización de los animales tratados y los animales control.

Se realizó el análisis estadístico con la prueba T de Student para muestras pareadas ($P < 0.05$), con la finalidad de evaluar la diferencia estadísticamente significativa de los valores de la densidad óptica entre el suero pre inmunización y los sueros post inmunización de cada animal.

6.4 Reconocimiento de la proteína nativa por los anticuerpos anti-péptidos de TCTP

La especificidad de los anticuerpos generados en conejos contra la proteína nativa de *Babesia bigemina* se comprobó por medio de pruebas de Inmunofluorescencia indirecta, utilizando láminas con frotis de eritrocitos infectados

lavados, con *B. bigemina* como antígeno. Los sueros de los conejos y bovinos inmunizados como anticuerpo primario y anti IgG de conejo + Alexa 488 (Alexa fluor® 488-conjugated affiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch®) como anticuerpo secundario. El protocolo utilizado fue descrito por Hernández-Silva *et al.* (2018).

1. Las láminas, previamente preparadas, fueron sacadas del congelador y se dejaron secar al ventilador durante 30 minutos.
2. Las láminas fueron fijadas en acetona pura durante 30 minutos a temperatura de 4°C, y se dejaron secar al ventilador. En cada lámina se dibujaron 6 círculos con esmalte negro para formar los pozos.
3. El anticuerpo primario, en una dilución 1:50, fue distribuido en los pozos de las láminas y, se incubó a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
4. Los lavados se realizaron en tres ocasiones con PBS-Tween 1% en agitación durante 5 minutos cada uno y, al final, un lavado con agua destilada.
5. El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo + Alexa 488 con dilución 1:200 fue distribuido en los pozos de las láminas y se incubaron a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
6. Los lavados se realizaron en tres ocasiones, nuevamente, con PBS-Tween 1% en agitación durante 5 minutos cada uno y, al final, un lavado con agua destilada.
7. Las láminas se analizaron en microscopio con lámpara de fluorescencia.

6.5 Evaluación de la reacción cruzada de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP contra la proteína recombinante de *B. bovis*.

La capacidad de los anticuerpos anti-TCTP de reconocer la proteína se analizó realizando un Western blot, con la metodología descrita por Taylor (2008), utilizando una muestra de proteína TCTP recombinante de *B. bovis*.

6.5.1 Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE

Un sistema Mini-PROTEAN® Tetra-Cell Casting Module de BioRad fue montado para polimerizar el gel de acrilamida-bisacrilamida, seleccionando y limpiando los cristales necesarios previamente. El gel se preparó con 1 mm de grosor. El gel separador fue preparado al 15% y, una vez polimerizado, el gel concentrador fue preparado al 5%, utilizando un peine para formar 10 pozos.

El gel polimerizado se colocó en la cámara vertical de electroforesis y ésta se rellenó con el buffer de corrida descrito en el protocolo. Un total de 4 µl de marcador de peso molecular para Western Blot (Opti Protein Ultra Marker, No. De catálogo G623) se cargaron en el primer pozo. Un volumen de 10 µl de la muestra de proteína con buffer de carga Laemmli 2x, hervidas previamente a 95°C, se cargaron en los dos pozos siguientes. La cámara de electroforesis fue conectada a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a 60 Volts durante 30 minutos, posteriormente se elevó el voltaje a 180 durante 60 minutos.

6.5.2 Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas en el gel de acrilamida fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en cámara de transferencia húmeda, a 70 V durante 1 hora, utilizando buffer de transferencia descrito en el protocolo.

La membrana fue teñida con colorante rojo Ponceau para comprobar la transferencia de proteínas. Esta fue desteñida con TBS.

6.5.3 Inmunodetección de proteínas

El Western blot se realizó con el siguiente protocolo:

1. La membrana fue bloqueada incubando leche descremada al 5% con TBS (Tris-Buffered Saline), a 4°C con agitación orbital, durante 1 hora.
2. La membrana se incubó con los sueros de los conejos inmunizados, en una dilución de 1:1000 en TBS con leche descremada al 1%, durante 16 horas aproximadamente, a 4°C con agitación orbital.

3. El buffer conteniendo el anticuerpo primario fue retirado al finalizar la incubación. La membrana fue lavada dos veces con TBS durante 10 minutos, a 4°C con agitación orbital.
4. El anticuerpo anti-IgG de conejo HRP (Peroxidase-conjugated affiniPure donkey anti-rabbit IgG (H+L), código 711-035-152) se utilizó en dilución de 1:15 000 en leche descremada al 1% con TBS. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora, a 4°C, con agitación orbital.
5. El buffer conteniendo el anticuerpo secundario fue retirado al finalizar la incubación. La membrana fue lavada dos veces con TBS durante 10 minutos, a 4°C con agitación orbital.
6. La solución de revelado ECL fue preparada en proporción 1:1 de luminol con peróxido de hidrógeno. La membrana fue colocada en un acetato y se depositó en ella la solución de revelado, se cubrió con otro acetato y se expuso durante 10 segundos a la lámpara quimioluminescente utilizando un fotodocumentador para obtener la imagen.

El control del experimento se realizó utilizando una tira de la membrana incubada con anticuerpo monoclonal 6x-HIS (Invitrogen, IL, USA). Esta tira de la membrana se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (H+L) HRP (715-035-150, Jackson IR).

6.6 Determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP

La capacidad de neutralización de los anticuerpos anti-péptidos de TCTP de *B. bigemina* se estudió realizando un ensayo de neutralización *in vitro*, tomando como base el protocolo descrito por Hidalgo-Ruiz *et al.*, (2022).

Un cultivo de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* fue montado en placas de 96 pozos, incubados a 37°C, 5% CO₂. El porcentaje inicial de eritrocitos parasitados fue del 1%.

Los cultivos se incubaron con medio de inicio (60% medio 199 + 40% suero experimental). Los sueros de los bovinos inmunizados con los péptidos

A, B y la mezcla de péptidos fueron utilizados por triplicado. De igual forma, un triplicado se mantuvo con suero del bovino inmunizado con adyuvante. El cambio de medio se realizó cada 24 horas con medio de mantenimiento (60% medio 199 + 20% de suero de bovino no infectado + 20% de cada suero experimental). Los frotis de células de cada pozo experimental se realizaron en laminillas a las 72 horas del ensayo. Las laminillas fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa 1:4. El conteo representativo de 2000 eritrocitos en cada laminilla se realizó para calcular el porcentaje de eritrocitos parasitados.

Los resultados del conteo a las 72 horas fueron comparados entre tratamientos y con el control de cultivo, incubado con medio 199 + suero de bovino no infectado. La diferencia estadística fue analizada por ANOVA y la prueba de Tukey.

VII. RESULTADOS

7.1 Ensayo de transcripción

7.1.1 Diseño de oligonucleótidos internos específicos

Se obtuvo la secuencia del gen *tctp*, separada por exones e intrones (Figura 8), por medio de herramientas bioinformáticas, utilizando las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

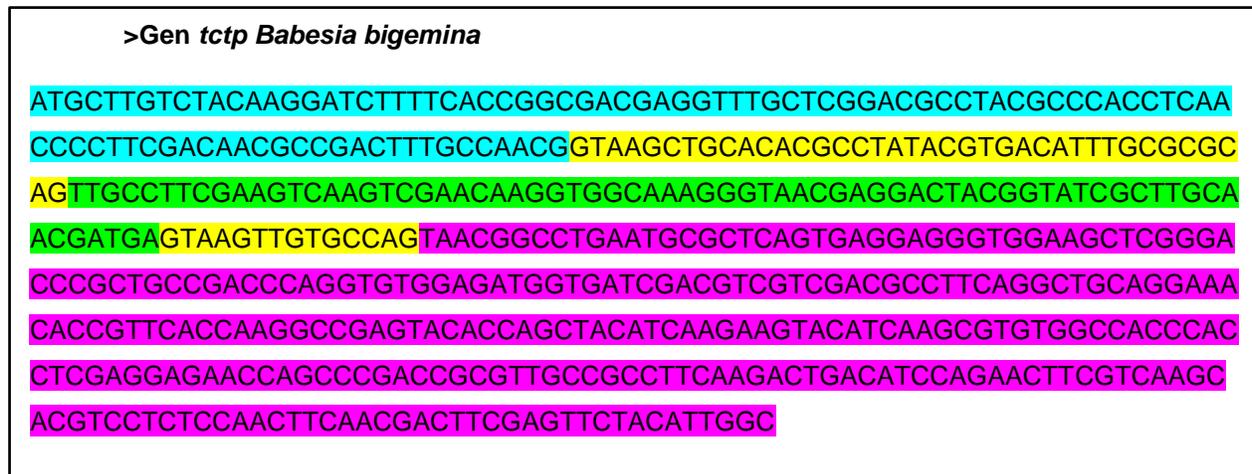


Figura 8. Secuencia del gen *tctp*. En color azul se señala el exón 1, en verde el exón 2, en magenta el exón 3 y en color amarillo los dos intrones del gen.

Las secuencias de los intrones fueron eliminadas para el diseño de oligonucleótidos internos del gen. El oligonucleótido sentido se diseñó en el exón 2 y el oligonucleótido antisentido en el exón 3 (Figura 9) bajo las características adecuadas (Cuadro 7). El amplicón esperado con los oligonucleótidos diseñados fue de 314 pares de bases en ADNc y de 328 pares de bases en ADN genómico.

>Exón 2

TTGCCTTCGAAGTCAAGT **CGAACAAGGTGGCAAAGGGTAAC** GAGGACTACGGTATCGCTTGCAAC
GATGA

>Exón 3

TAACGGCCTGAATGCGCTCAGTGAGGAGGGTGGGAAGCTCGGGACCCGCTGCCGACCCAGGTGT
GGAGATGGTGATCGACGTCGTTCGACGCCTTCAGGCTGCAGGAAACACCGTTCACCAAGGCCGAG
TACACCAGCTACATCAAGAAGTACATCAAGCGTGTGGCCACCCACCTCGAGGAGAACCAGCCGA
CCGCGTTGCCGCCTTCAAGACTGACATCCAGAACTTCGTCAAGCACGTCC **TCTCCA**ACTTCAACG
ACTTCGAGTTCTACATTGGCGAGTCGCTTGACCTTGAGGCCGGACTTGTCTACGCCTACTACAAC

Figura 9. Oligonucleótidos internos para la amplificación de un fragmento del gen *tctp*. El oligonucleótido en dirección sentido se encuentra señalado en color azul oscuro, y el oligonucleótido en dirección antisentido en color amarillo. El amplicón esperado se encuentra resaltado en letras color rojo.

Cuadro 7. Características específicas de los oligonucleótidos internos, sentido y antisentido, del gen *tctp* de *B. bigemina*.

Características específicas	Sentido	Antisentido
Longitud (pb)	23	20
GC (%)	52.2	45
Temperatura de alineamiento (°C)	53.2	54.2
Horquillas	-2.4	0.32
Homodímeros (kcal/mol)	-3.61	-3.61
Heterodímeros (kcal/mol)	-5.02	

7.1.2 Amplificación de un fragmento del gen *tctp* de *B. bigemina* por PCR.

Los resultados de la electroforesis de los productos de PCR presentan una banda entre las 200 y las 400 pb, correspondientes a la muestra de ADNc con la que se usó la enzima retrotranscriptasa y la muestra de ADN genómico. La banda en ADNc es de menor talla molecular comparada con la banda en ADN genómico. El carril correspondiente a la muestra de ADNc, sin retrotranscriptasa, no reveló bandas (Figura 10).

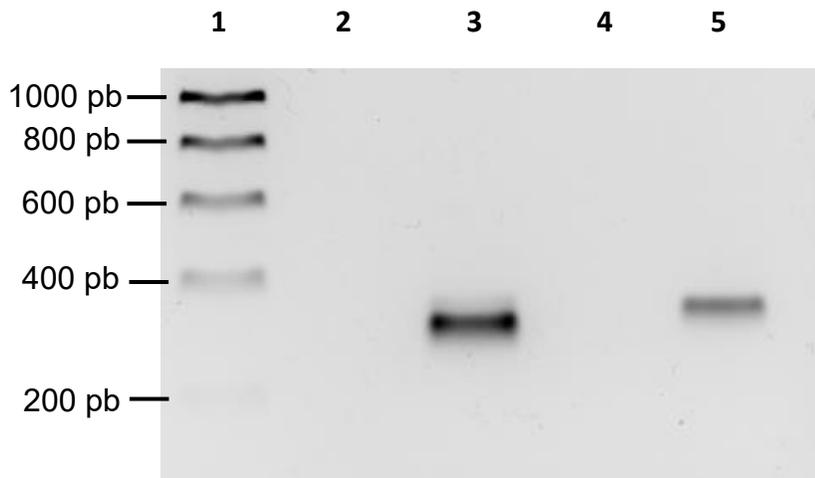


Figura 10. Resultado de transcripción de *tctp* mediante la visualización de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5%. **1:** Marcador de talla molecular. **2:** control negativo de la PCR. **3:** ADNc con enzima retrotranscriptasa. **4:** ADNc sin enzima retrotranscriptasa. **5:** ADN genómico.

7.2 Ensayo de inmunización

Se obtuvieron muestras de sueros de los conejos y bovinos inmunizados. Los días de muestreo de sueros corresponden con las inmunizaciones de la siguiente forma:

Conejos

- Día 0: Pre inmunización
- Día 20: primera inmunización
- Día 42: segunda inmunización
- Día 56: tercera inmunización

- Día 89: cuarta inmunización
- Día 100: Quinta inmunización (final)

Bovinos

- Día 0: Pre inmunización
- Día 21: primera inmunización
- Día 42: segunda inmunización
- Día 63: tercera inmunización
- Día 84: cuarta inmunización

7.3 Determinación del reconocimiento de los péptidos de TCTP de *B. bigemina* por los anticuerpos específicos

7.3.1 Estandarización de la concentración de los péptidos A, B, C y de la dilución de los sueros de los conejos y bovinos inmunizados.

La concentración adecuada de cada péptido para la prueba de ELISA indirecta fue determinada en 0.5 µg/ml, ya que, a esta, existe mayor diferencia entre los valores de la densidad óptica de los sueros pre y sueros finales, como se muestra en las Figuras 11, 12 y 13.

Al igual que la concentración de péptido, la dilución de los sueros se determinó tomando en cuenta mayor diferencia entre los valores de densidad óptica entre los sueros pre y post inmunización. La dilución de sueros de todos los conejos inmunizados se determinó en 1:200, como se muestra en las Figuras 14, 15 y 16. La dilución de los sueros de los bovinos se determinó en 1:400 tomando en cuenta las diferencias entre valores de densidad óptica que, como se muestra en las Figuras 17, 18 y 19, fue mayor a esta dilución.

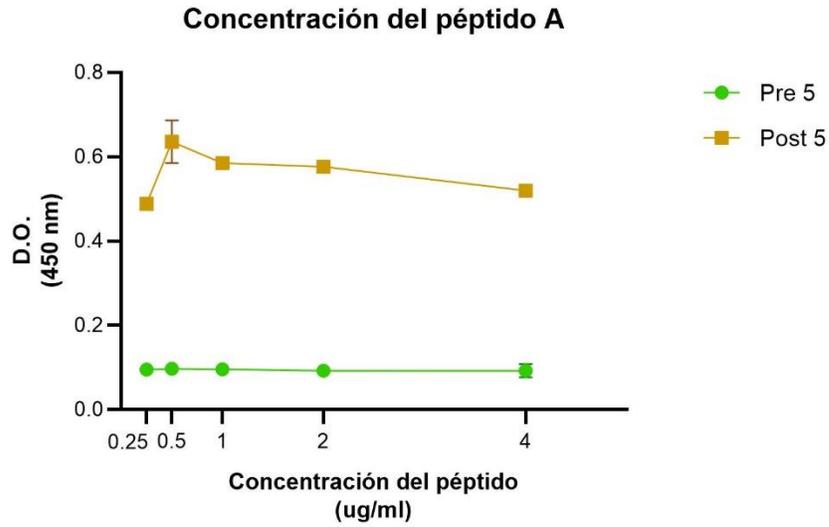


Figura 11. Estandarización de la concentración del péptido A. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

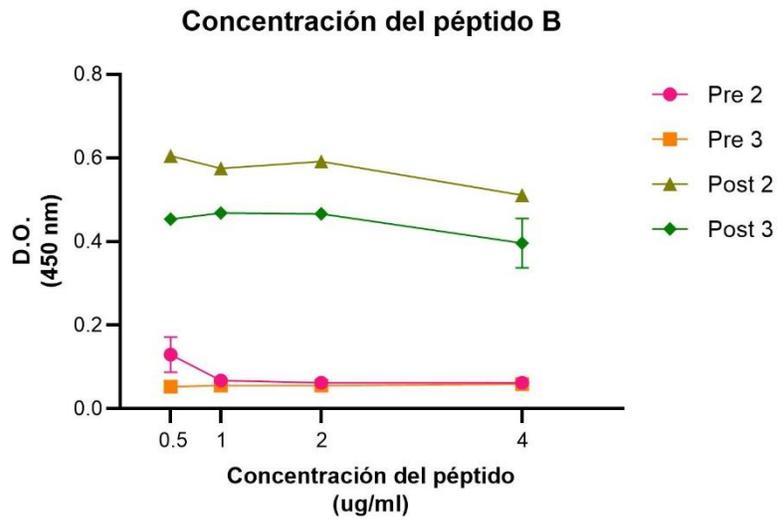


Figura 12. Estandarización de la concentración del péptido B. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

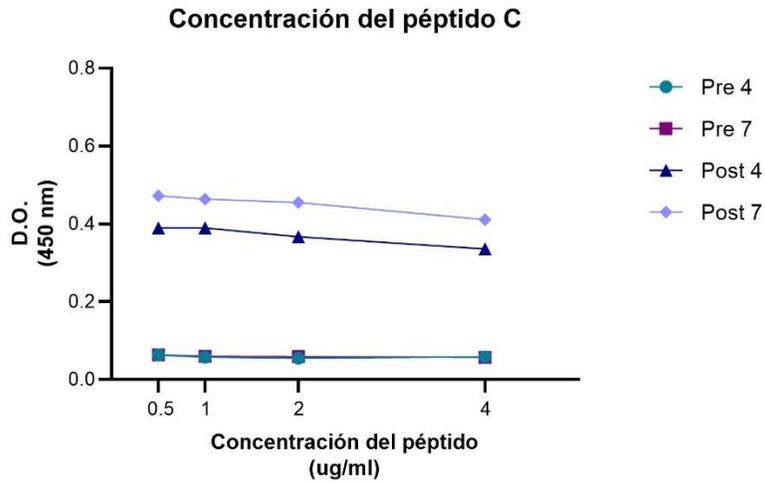


Figura 13. Estandarización de la concentración del péptido C. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

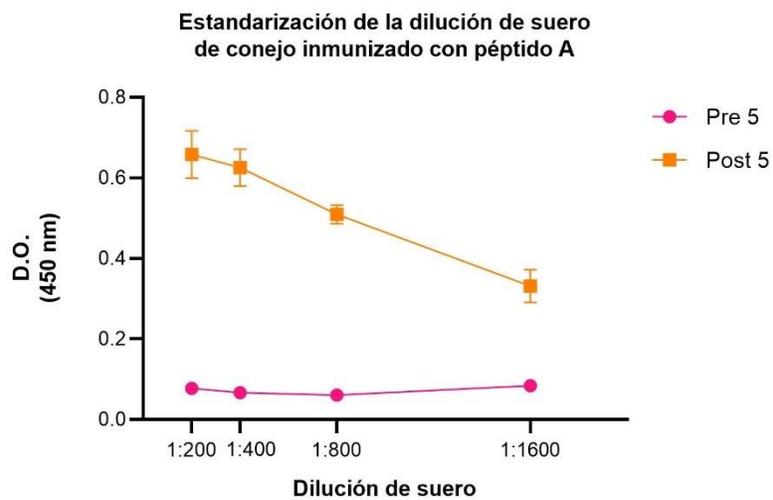


Figura 14. Estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con el péptido A. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

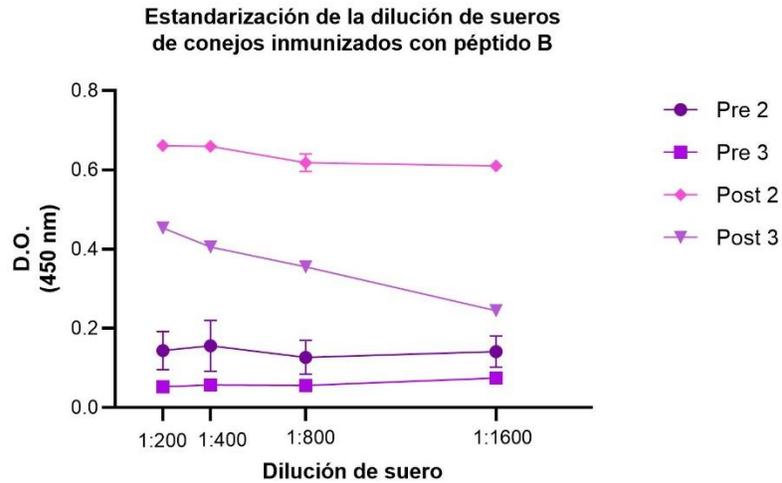


Figura 15. Estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con el péptido B. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

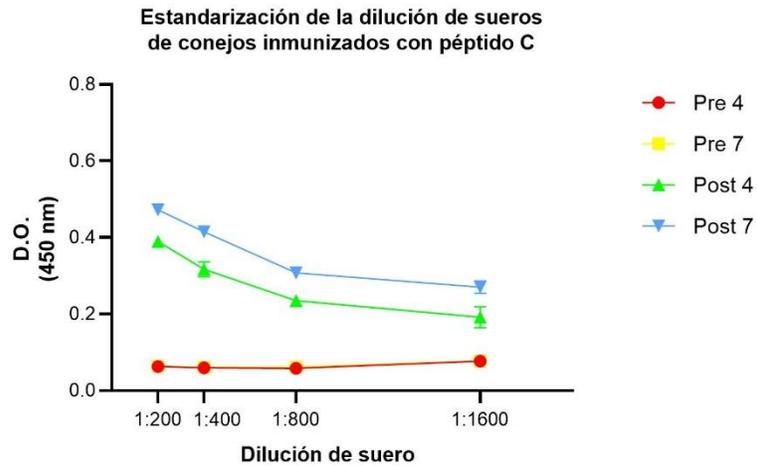


Figura 16. Estandarización de la dilución de sueros de conejos inmunizados con el péptido C. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

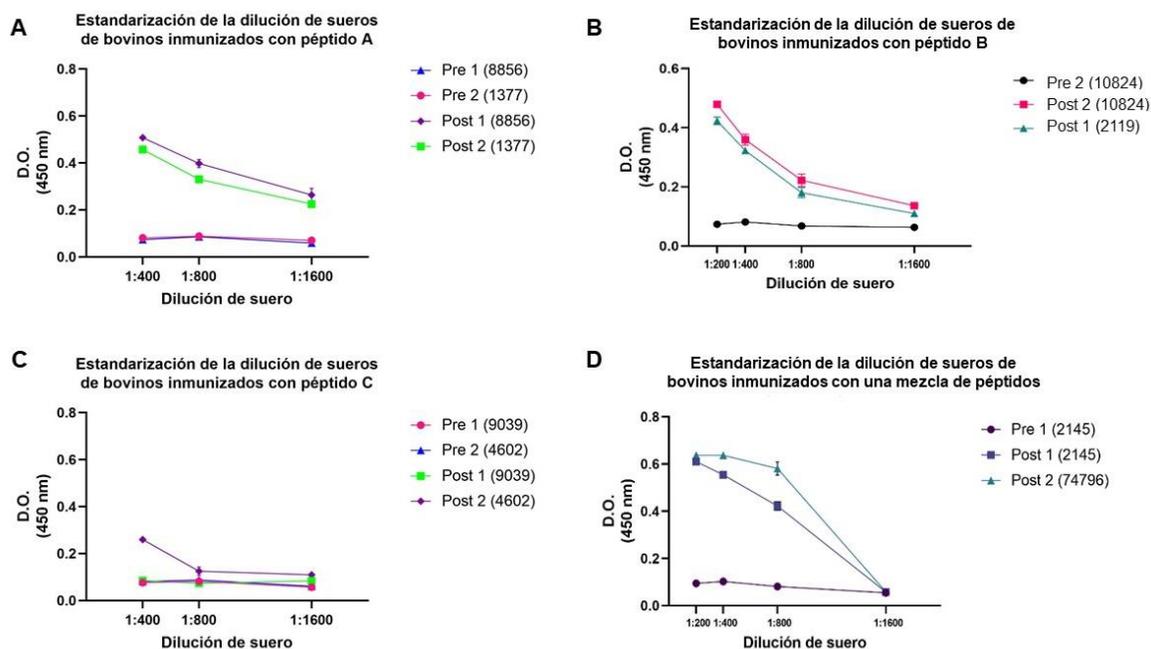


Figura 17. Estandarización de la dilución de sueros de bovinos. **A:** inmunizados con péptido A. **B:** inmunizados con péptido B. **C:** inmunizados con péptido C. **D:** inmunizados con una mezcla de péptidos. Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos.

7.3.2 Determinación de anticuerpos anti-péptidos de TCTP de *B. bigemina*

Los resultados muestran respuestas variadas en los valores de la densidad óptica entre los animales y entre los diferentes péptidos utilizados. Los sueros del conejo 8 (control) se incubaron con los diferentes péptidos para confirmar que no hubo producción de anticuerpos ante ninguno de ellos. Los valores de la densidad óptica tienen una correlación positiva con la presencia de anticuerpos específicos.

En el gráfico correspondiente al conejo inmunizado con el péptido A (Figura 18) se observa diferencia estadísticamente significativa a partir del día 20, sin embargo, el aumento marcado de la densidad óptica se observa a partir del día 89 y se mantiene así hasta el día 100.

En el gráfico correspondiente para los conejos inmunizados con el péptido B (Figura 19), la diferencia estadísticamente significativa se produce desde el día 20

para ambos conejos. Los valores de la densidad óptica, por su parte, varían entre cada animal. El conejo dos generó un aumento de la densidad óptica con el suero del día 42, y se mantuvo en aumento en los sueros restantes. El conejo tres, marca un aumento de la densidad óptica con el suero del día 20, sin embargo, este valor disminuye con el suero del día 42 y se mantiene en aumento a partir del día 56.

Finalmente, el gráfico correspondiente para los conejos inmunizados con el péptido C (Figura 20) muestra diferencia estadísticamente significativa desde el día 20 para ambos conejos. Los valores de la densidad óptica se mantienen en aumento desde el día 20, disminuyen en el día 89 y aumentan nuevamente en el día 100.

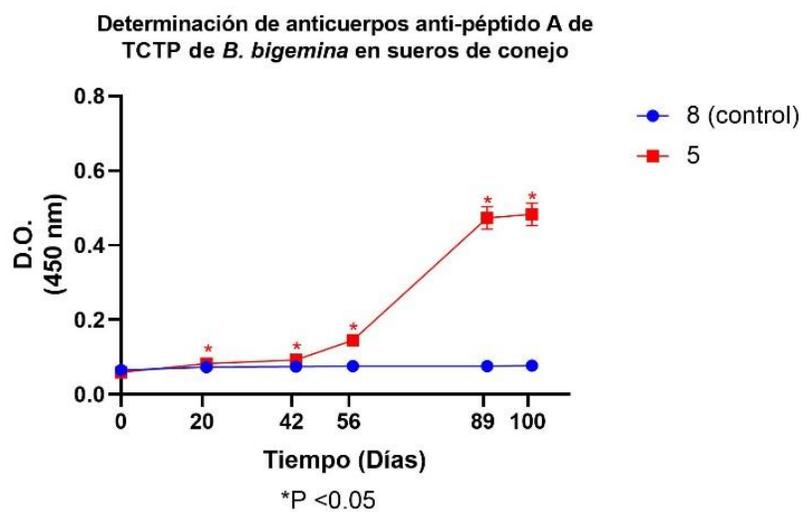


Figura 18. Determinación de anticuerpos específicos en suero de conejo inmunizado con el péptido A (5), comparado con el conejo control (8). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

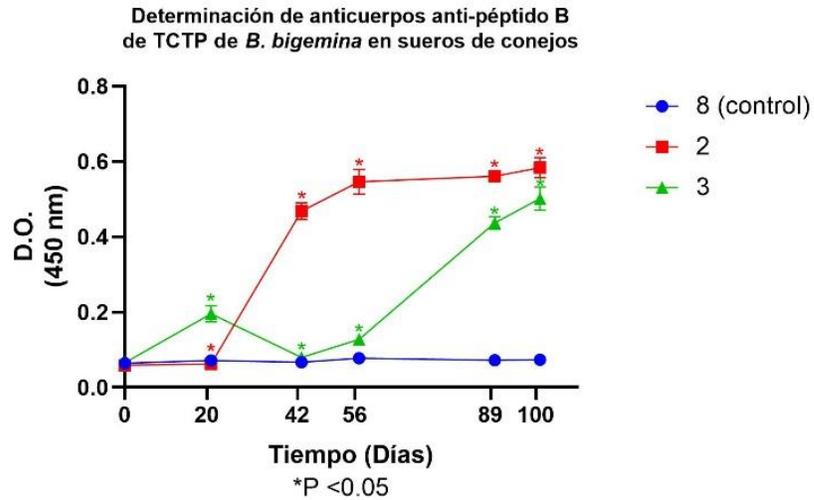


Figura 19. Determinación de anticuerpos específicos en suero de conejos inmunizados con el péptido B (2 y 3), comparado con el conejo control (8). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

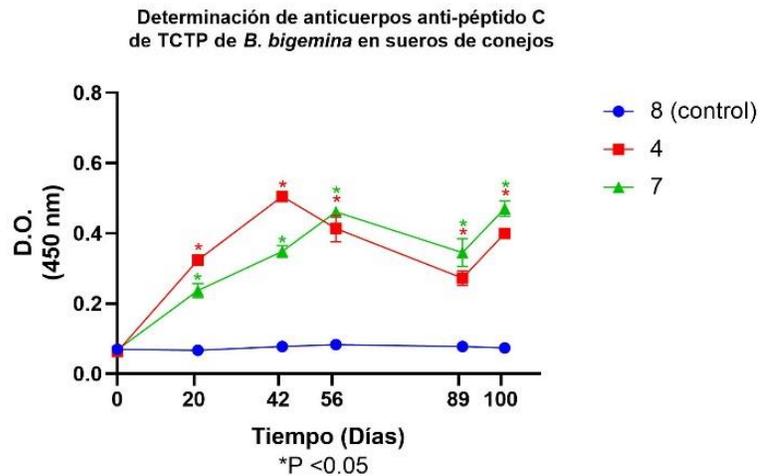


Figura 20. Determinación de anticuerpos específicos en suero de conejos inmunizados con el péptido C (4 y 7), comparado con el conejo control (8). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparada con el suero pre inmunización.

Los gráficos que muestran los resultados obtenidos de la determinación de anticuerpos anti-péptidos de TCTP en sueros de bovinos inmunizados, analizados por ELISA indirecta, se muestran a continuación.

En la Figura 21, observamos los resultados de la densidad óptica correspondiente a los sueros de bovinos inmunizados con péptido A, que presentan diferencia estadísticamente significativa a partir del día 21 para el bovino 1 y a partir del día 42 para el bovino 2. No obstante, el incremento notable en los valores de la densidad óptica se observa hasta el día 84.

Por otro lado, la Figura 22 representa los resultados de los valores de la densidad óptica de los sueros de los animales inmunizados con el péptido B. En el gráfico se genera diferencia estadísticamente significativa a partir del día 63 y una mayor densidad óptica en el día 84 para el bovino 1, mientras que para el bovino 2 la diferencia estadísticamente significativa se produce en el día 21, 63 y 84, y el aumento de la densidad óptica es a partir del día 21.

En el gráfico correspondiente a los sueros de los animales inmunizados con el péptido C (Figura 19) existe diferencia estadísticamente significativa desde el día 23 pero se evidencia baja densidad óptica en el caso de los dos bovinos, similar a la que se observa en el bovino control.

Finalmente, el gráfico correspondiente a los bovinos inmunizados con la mezcla de péptidos (Figura 24) muestra diferencia estadísticamente significativa y el aumento de la densidad óptica a partir del día 42 para el bovino 1, mientras que, para el bovino 2 tanto la diferencia estadísticamente significativa como el aumento de la densidad óptica están desde el día 21.

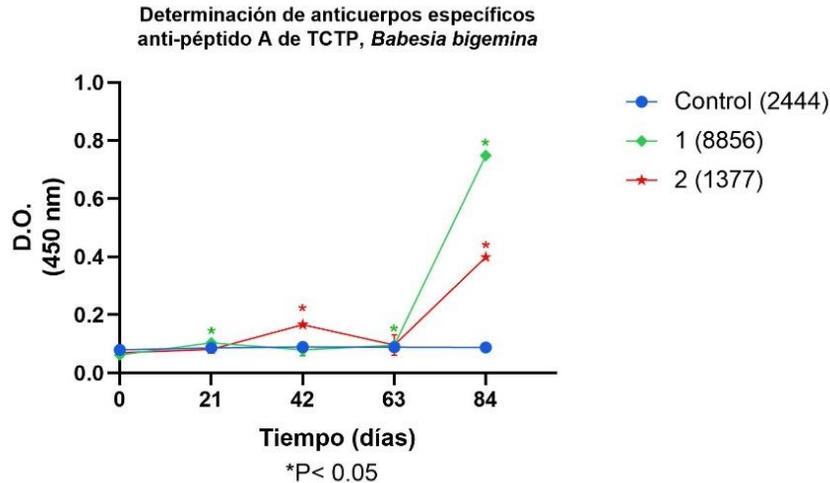


Figura 21. Determinación de anticuerpos específicos en suero de bovinos inmunizados con el péptido A, comparado con el bovino control (línea azul). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

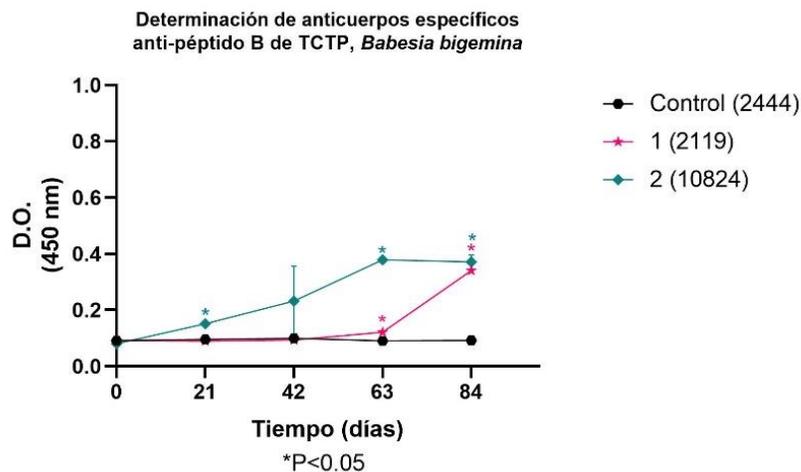


Figura 22. Determinación de anticuerpos específicos en suero de bovinos inmunizados con el péptido B, comparado con el bovino control (línea negra). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

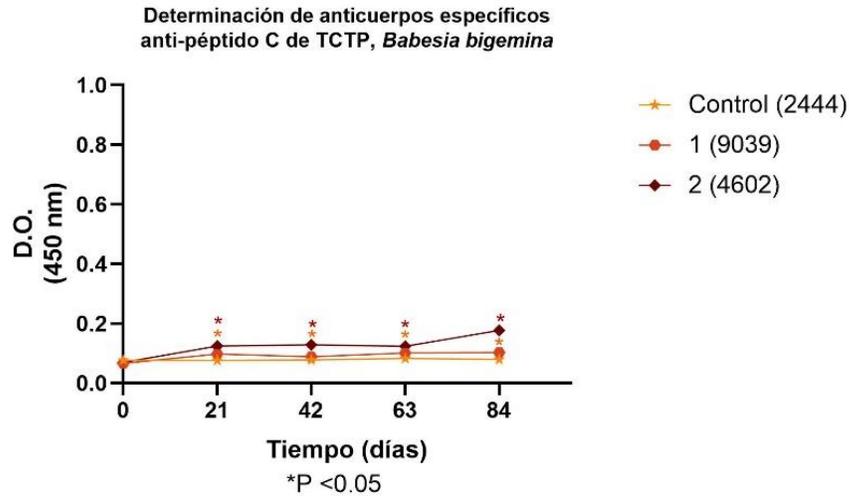


Figura 23. Determinación de anticuerpos específicos en suero de bovinos inmunizados con el péptido C, comparado con el bovino control (línea amarilla). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

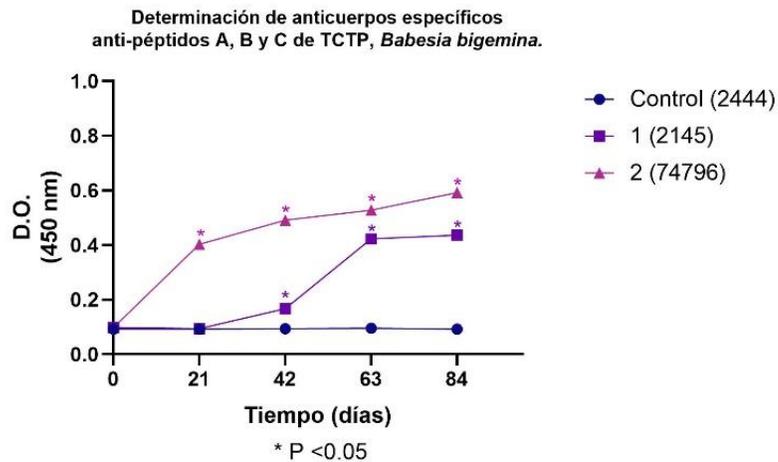


Figura 24. Determinación de anticuerpos específicos en suero de bovinos inmunizados con la mezcla de péptidos, comparado con el bovino control (línea azul). Resultados obtenidos de densidad óptica en una ELISA indirecta con lectura a los 20 minutos. *Diferencia estadísticamente significativa comparado con el suero pre inmunización.

7.4 Reconocimiento de la proteína nativa por los anticuerpos anti-péptidos de TCTP.

La unión de los anticuerpos específicos anti-péptidos TCTP con la proteína nativa del parásito fue demostrada. Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta (Figura 25) muestran señal negativa tanto en el antígeno incubado con sueros pre inmunización como en el control negativo, y muestra fluorescencia en las imágenes del antígeno incubado con sueros post inmunización y en el control positivo.

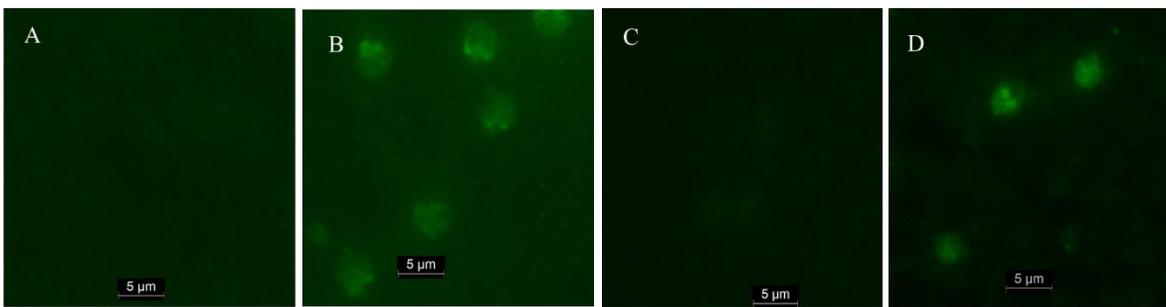


Figura 25. Reconocimiento de la proteína nativa por anticuerpos anti-TCTP en suero de conejo. Panel A: incubación del antígeno con suero pre inmunización. Panel B: Incubación con suero post inmunización. Panel C: Control negativo. Panel D: Control positivo.

7.5 Determinación del reconocimiento de TCTP de *B. bovis* por anticuerpos anti-péptidos de TCTP de *B. bigemina*

Los resultados del Western Blot (Figura 26) revelan una banda en la tira 1, incubada con sueros post inmunización cerca de los 30 kDa, que corresponde al peso de la proteína (19.7 kDa) con la cola de histidinas. La tira 2, incubada con los sueros pre inmunización, no revela ninguna banda. Finalmente, la tira 3, incubada

con anticuerpo anti-His revela una banda de mayor grosor, a la misma altura que en la tira 1.

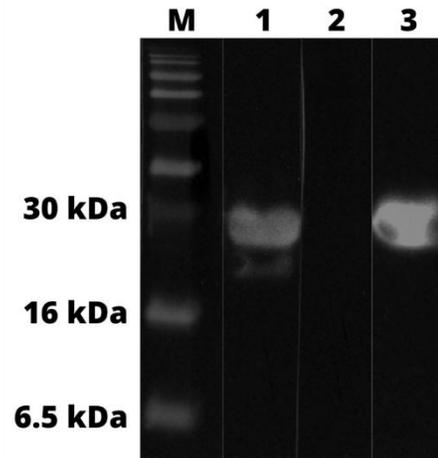


Figura 26. Resultado del western blot incubando una muestra de TCTP de *B. bovis* expresada en *E. coli*, con sueros de conejos inmunizados con péptidos de TCTP de *B. bigemina*. **M**: Marcador de peso molecular. **1**: suero post inmunización. **2**: suero pre inmunización. **3**: control con anticuerpo monoclonal 6x-His.

7.6 Ensayo de neutralización con los anticuerpos anti-péptidos de TCTP de bovinos

El resultado del promedio del porcentaje de eritrocitos parasitados, en 2000 células, para cada tratamiento, se muestra en la Figura 27.

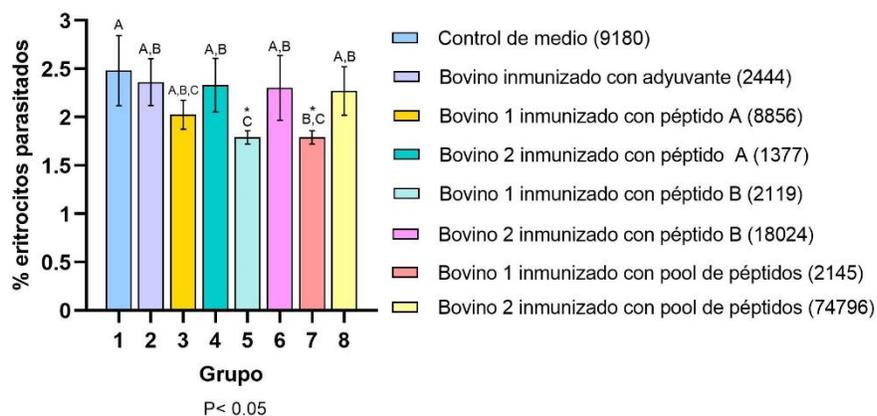


Figura 27. Gráfico del porcentaje de eritrocitos parasitados en 2000 células. **1:** Control de medio. **2:** Bovino inmunizado con adyuvante. **3 y 4:** Bovinos inmunizados con el péptido A. **5 y 6:** Bovinos inmunizados con péptido B. **7 y 8:** Bovinos inmunizados con la mezcla de péptidos. Las letras A, B y C corresponden a la diferencia estadística entre grupos. Aquellos grupos que comparten una letra no tienen diferencia estadísticamente significativa.

El análisis estadístico determina que el grupo 5 (correspondiente a un bovino inmunizado con péptido B) y el grupo 7 (correspondiente a un bovino inmunizado con la mezcla de péptidos), presentan diferencia estadísticamente significativa comparados con los grupos controles (1 y 2). El porcentaje de inhibición calculado para los grupos con diferencia estadísticamente significativa (5 y 7) con respecto al grupo control (1) fue de 28-45%.

VIII. DISCUSIÓN

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) ha sido descrita en múltiples modelos de organismos eucariontes, y, está relacionada con diversas funciones importantes. Lagunas-Rangel (2022), realizó la comparación de las secuencias de TCTP de los diferentes parásitos pertenecientes al filo Apicomplexa, determinando que son proteínas conservadas entre ellos.

La proteína se ha estudiado en parásitos Apicomplexos como *Plasmodium* spp., modelo en el cual se ha demostrado que TCTP exhibe diferencias tanto estructural como funcionalmente en comparación con homólogos presentes en otros eucariontes. Se estableció un papel crucial, especialmente en los estadios pre eritrocíticos del parásito (Mathieu *et al.*, 2015).

Un ensayo de transcripción del gen *tctp* fue realizado para este estudio, amplificando mediante PCR un fragmento de ADNc obtenido a partir de una muestra de ARN total extraída de cultivo *in vitro* de *B. bigemina*. Con estos resultados logramos demostrar la presencia de ARNm que se transcribe en estadios intraeritrocíticos de *B. bigemina*. El gen de TCTP de *B. bigemina* reportado, sin intrones, tiene una longitud de 549 pb.

La transcripción se demostró al obtener el amplicón esperado (314 pb) en la muestra de ADNc, comparado con el amplicón en la muestra de ADN genómico (328 pb). Esta diferencia de tamaño se atribuye a la presencia de un intrón intermedio en el ADN, el cual está ausente en el ADNc debido al proceso de eliminación de intrones durante la transcripción.

Esta metodología para el análisis de transcripción ha sido reportada previamente en estudios con otros genes de *Babesia bovis* (Hussein *et al.*, 2017) y *B. bigemina* (Camacho-Nuez *et al.*, 2017) como *Hap2*. En ellos llevaron a cabo la extracción de ARNm para la síntesis de ADNc y posterior amplificación con oligonucleótidos específicos.

Taylor (2008), realizó un estudio en el cual sintetizó el ANDc a partir de una muestra de ARNm de *Plasmodium yoelii*, realizó la amplificación con

oligonucleótidos específicos para TCTP por medio de PCR y evaluó los productos en un gel de agarosa al 1%. Sus resultados muestran la amplificación de un producto arriba de las 500 pb con respecto al marcador de talla molecular, siendo su amplicón esperado de 516 pb, que corresponde a la longitud de la secuencia sin intrones. También ha sido reportada la transcripción del gen *tctp* de *B. bovis* por medio de RT-PCR (Pérez-Almeida *et al.*, 2023).

Se determinó la capacidad de los péptidos para inducir la producción de anticuerpos específicos. La presencia de anticuerpos anti-péptidos de TCTP se identificó, mediante análisis de ELISA indirecta, que muestran resultados positivos a la unión antígeno anticuerpo en todas las muestras de sueros obtenidas de conejos y en ocho de diez muestras de suero bovino, en las dos muestras restantes el aumento de la densidad óptica fue mínimo. El reconocimiento de la proteína nativa en los merozoítos de *B. bigemina* por los anticuerpos específicos en suero de conejos también fue determinado, por medio Inmunofluorescencia indirecta, con distribución citoplasmática, lo que demuestra la expresión de la proteína en estadios intraeritrocíticos del parásito.

La proteína de estos parásitos ya se ha evaluado como inmunógeno en estudios anteriores. Por ejemplo, Taylor y colaboradores (2014), expresaron TCTP de *P. falciparum* y *P. yoelii* para inmunizar a dos grupos de ratones. Utilizando ELISA indirecta determinaron la presencia de anticuerpos específicos anti-TCTP. Estos resultados coinciden con un estudio similar realizado con la proteína de *Babesia bovis*. En dicho estudio, péptidos predichos como epítomos B fueron identificados, y la presencia de anticuerpos específicos se demostró mediante técnicas como ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el suero de conejos y bovinos inmunizados con los péptidos de la proteína (Pérez-Almeida, 2020).

Zheng y colaboradores (2017), demostraron, por Inmunofluorescencia indirecta, que la distribución de TCTP es citoplasmática en *Toxoplasma gondii*. Lo anterior coincide con lo reportado por Bhisutthibhan y colaboradores (1999), que demostró, por medio de Inmunofluorescencia, que la distribución PftCTP es citoplasmática. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en este estudio.

La reacción cruzada por los anticuerpos anti-péptidos de TCTP de *B. bigemina* con TCTP de *B. bovis* también fue determinada, es decir, al ser secuencias conservadas los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer a la proteína de esta otra especie. Pérez-Almeida (2020), menciona que al hacer el alineamiento de las secuencias de TCTP de *B. bovis* y *B. bigemina* el porcentaje de similitud es de 86.26%, motivo por el cual se consideró posible que los anticuerpos anti-péptidos de *B. bigemina* podrían unirse a la proteína de *B. bovis*.

El uso de TCTP de *Plasmodium falciparum* (PfTCTP) expresada en *E. coli* como vacuna en ratones, esto fue descrito en estudios por Taylor y colaboradores en el 2015. Un efecto protector leve fue observado en ratones inmunizados con la PfTCTP y desafiados contra *P. yoelii*, evidenciado por una disminución significativa de la parasitemia media. Por el grado de conservación de TCTP entre estas dos especies, se podría hipotetizar que los anticuerpos anti-PfTCTP generan reacción cruzada con la proteína de *P. yoelii*.

Finalmente, en el ensayo de neutralización realizado en este estudio utilizando un cultivo *in vitro* de *B. bigemina*, los resultados obtenidos del porcentaje de eritrocitos parasitados muestran disminución en los tratamientos con dos sueros de los bovinos inmunizados. El porcentaje de inhibición calculado fue de 28 a 45%.

Anteriormente, un ensayo de neutralización había sido realizado, en este se utilizó un cultivo *in vitro* de *B. bovis*, donde se obtuvo como resultado un porcentaje de inhibición del 32-34% al tratarlo con el suero de animales inmunizados con una mezcla de péptidos de TCTP de esta especie (Pérez-Almeida *et al.*, 2023), estos resultados son similares a los obtenidos en el ensayo de este proyecto.

En los ensayos de neutralización realizados con anti-sueros contra antígenos de *B. bigemina*, se ha demostrado que los anticuerpos tienen capacidad neutralizante. Un ejemplo de lo anterior es lo descrito por Mercado-Uriostegui *et al.*, (2022), quienes demostraron la capacidad neutralizante *in vitro* de anticuerpos anti-péptidos de GP-45, una proteína de la membrana de los merozoítos del parásito. Mientras que Mosqueda *et al.*, (2019), estudiaron la neutralización de los merozoítos *in vitro* por anticuerpos anti-péptidos de RON2, proteína que es secretada y participa

en el proceso de invasión del parásito por medio de la unión a la célula blanco, alcanzando porcentajes de inhibición entre 45 – 63%.

Zheng y colaboradores (2017) llevaron a cabo una serie de experimentos centrados en la unión, invasión y replicación de *Toxoplasma gondii* en células del hospedante, utilizando una cepa knock out (KO) del gen *tctp*. Parte de los resultados revelaron una tasa de invasión del parásito KO de 19.7%, en comparación con el del control, que alcanzó el 42.9%. Estos hallazgos sugieren que la ausencia del gen *tctp* puede provocar una inhibición significativa en la capacidad de invasión del parásito.

Aunque este estudio no constituye un ensayo de neutralización, sus resultados pueden ser contrastados con los de este proyecto y otras investigaciones, donde la inhibición de la acción de la proteína TCTP mediante anticuerpos anti-péptidos ha demostrado reducir el porcentaje de parásitos en las células blanco.

La TCTP de *B. bigemina* es una proteína cuyo receptor está en células diferentes a las que son invadidas por el parásito, por esto se podría considerar que la función principal de los anticuerpos no es la neutralización de los merozoítos, motivo por el cual se puede hipotetizar que no alcanza porcentajes de inhibición tan altos comparados con RON2, y tampoco se presenta diferencia estadística significativa entre la mayoría de los tratamientos con respecto al grupo control en el ensayo realizado en esta tesis.

La TCTP es una proteína poco estudiada en modelos como *Babesia* spp., por la importancia que se ha descrito de esta proteína en otros parásitos en los que se ha estudiado es recomendable continuar con la caracterización de su estructura y de sus funciones. Se propone la evaluación de la respuesta de animales inmunizados ante un desafío con el parásito, el estudio de los patrones de expresión de la proteína en cepas con mayor y menor virulencia, así como las posibles interacciones que tenga con otras proteínas y con las células del hospedante. Esto permitiría comprobar que se trata de un importante candidato vacunal.

XI. CONCLUSIONES

Se logró evidenciar la transcripción del gen *tctp* y la expresión de la proteína en estadios intraeritrocíticos de *B. bigemina*. Los péptidos de TCTP demostraron ser inmunogénicos, induciendo la producción de anticuerpos específicos tanto en conejos como en bovinos. Además, se comprobó que estos anticuerpos muestran reactividad cruzada con la TCTP de *B. bovis* y la capacidad de reducir el crecimiento de los parásitos *in vitro*.

X. REFERENCIAS

- Bhisutthibhan, J., Philbert, M., Fujioka, H., Aikawa, M. and Meshnick, S. (1999). The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *European Journal of Cell Biology*. 78. 665-670.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, S247-S269.
- Boomer & Thiele B. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell. B.* 36, 379-385.
- Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., Ruíz-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(1), 1-6.
- Camacho Nuez, M., Hernández Silva, D. J., Castañeda Ortiz, E. J., Paredes Martínez, M. E., Rocha Martínez, M. K., Álvarez Sánchez, M. E., Mercado Curiel, R. F., Aguilar Tipacamú, G., Mosqueda, J. (2017). *Hap2*, a novel gene in *Babesia bigemina* is expressed in tick stages, and specific antibodies block zygote formation. *Parasite Vector*, 10(568), 1-9.
- Cantó Alarcón, G. J., Álvarez, Martínez, J. A., Rojas Ramírez, E. E., Ramos Aragón, J.A., Mosqueda Gualito, J. J., Vega y Murguía, C. A., Figueroa Millán, J. V. (2003). Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. Inmunización en un área libre de enfermedad. *Vet México*, 34(4), 323-332.
- Chaudhry, Z. I., Suleman, M., Younus, M., Aslim, A. (2010). Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. *Pakistan J. Zool.* 42(2), 201-204.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. (2009). Babesia and its host: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.*, 40: 37.

- Chen, S. H., Wu, P. S., Chou, C. H., Yan, Y. T., Liu, H., Weng, S. Y., Yang-Yen, H. F. (2007). A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol. Biol. Cell.*, 18, 2525-2532.
- Demarta-Gatsi, C., Peronet, R., Smith, L., Thiberge, S., Ménard, R., Mécheri, S. (2017). Immunological memory to blood-stage malaria infection is controlled by the histamine releasing factor (HRF) of the parasite. *Sci Rep-Uk*, 7(9129).
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., Buening, G. M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol*, 30(10), 2576-2582.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C., Rodriguez, A., Flores, D. and Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*. 141. 1563-1592.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. and Boomer, U. (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.
- Genchi, C. (2007). Human babesiosis, an emerging zoonosis. *Parassitologia*, 49(1), 23-31.
- 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-g inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol*. 23, 463-471.
- Hernández Silva, D. J., Valdez Espinoza, U. M., Mercado Uriostegui, M. A., Aguilar Tipacamú, G., Ramos Aragón, J.A., Hernández Ortiz, R., Ueti, M., 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. *Vet. Sci*. 5(32), 1-12.
- Hidalgo Ruíz, M., Suarez, C. E., Mercado Uriostegui, M. A., Hernández Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo Velasco, E., León Ávila, G., Hernández, J. M., Mosqueda, J. (2018). *Babesia bovis* RON2 contains conserved B-cell

- epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasite Vector*, 11(575), 1-11.
- 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. *J. Mol. Evol.* 66, 472-483.
- Hsu, Y. C., Chern, J. J., Cai, Y., Mingyao, L., Choi, K. W. (2007). *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature*, 445, 785-788.
- Hunfeld, K. P., Hildebrant, A., Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219-1237.
- Hussein, H., Bastos, R., Schneider, D., Johnson, W., Adham, F., Davis, W., Laughery, J., Herndon, D., Ueti, M. and Suarez, C. (2017). The *Babesia bovis* *hap2* gene is not required for blood stage replication, but expressed upon *in vitro* sexual stage induction. *PLoS Negl Trop Dis.* 11 (10).
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., Schnittger, L. (2019). *Babesia* life cycle – when phylogeny meets biology. *Trends. Parasitol.* 35(5), 356-368.
- Kim, C., Iseki, H., Herbas, M. S., Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K. and Igarashi, I. (2007). Development of a Taqman-Based Real-Time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am J Trop Med Hyg.* 77 (5). 837-841.
- Lagunas-Rangel, F. A. (2022). Sequence analysis and comparison of TCTP proteins from human protozoan parasites. *Acta Parasitol.* 67 (2). 1024-1031.
- Levy, M., Clabaugh, G. y Ristic, M. (1982). Age Resistance in bovine babesiosis: role of the blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 37(3), 1127-1131.
- Mathieu, C., Demarta-Gatsi, C., Porcherie, A., Brega, S., Thiberge, S., Ronce, K., Smith, L., Peronet, R., Amino, R., Ménard, R. and Mécheri, S. (2015). *Plasmodium berghei* histamine-releasing factor favour liver-stage development via inhibition of IL-6 production and associates with a severe outcome of disease. *Cell. Microbiol.* 17(4), 542-558.

- Mercado-Uriostegui, M. A., Castro-Sánchez, L. A., El-Saber, G., Valdez-Espinoza, U. M., Falcón-Neri, A., Ramos-Aragon, J. A., Hernández-Ortiz, R., Kawazu, S., Igarashi, I. and Mosqueda, J. (2022). The GP-45 Protein, a highly variable antigen from *Babesia bigemina*, contains conserved B-cell epitopes in geographically distant isolates. *Patogens*. 11. 591.
- Mosqueda Gualito, J. J., Falcón Neri, A., Ramos Aragón, J. A., Cantó Alarcón, G. J., Camacho-Nuez, M. (2012a). Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(1), 51-59.
- Mosqueda, J., Hidalgo-Ruiz, M., Calvo-Olvera, D. A., Hernández-Silva, D. J., Ueti, M., Mercado-Uriostegui, M. A., Rodriguez, A., Ramos-Aragon, J. A., Hernandez-Ortiz, R., Kawazu, S. and Igarashi, I. (2019). RON2, a novel gene in *Babesia bigemina*, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasión. *Parasitol.* 146. 1646-1654.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamú, G., Cantó, G. J. (2012b). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19, 1504-1518.
- Muñoz, T. (2016). Babesiosis bovina (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*), una enfermedad hematozoárica de importancia económica en el mundo. *Centro de Biotecnología*, 5(1): 21-30.
- Perez Almeida, C. Q., Hernández Silva, D. J., Hernández Arvizu, E. E., Velasco Elizondo, M. A., Gómez Soto, J. G., Vega y Murguía, C. A., Dávila Montero, U. M., Asada, M., Kawazu, S. I. y Mosqueda, J. (2023). Evaluación de la Proteína Tumoral Traduccionalmente Controlada como vacuna contra *Babesia bovis*. (Ed.), *XII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. La parasitología post-COVID*. (pp. 55). Veracruz, Veracruz.
- Pérez Almeida, C., Q. (2020). Identificación de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (*TCTP*) en *Babesia bovis* y evaluación de su participación en el establecimiento de la infección. Tesis para obtener el grado de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable. Universidad Autónoma de Querétaro.

- Pérez de León, A. A., Strickman, D. A., Knowles, D. P., Fish, D., Thacker, E., de la Fuente, J., Krause, P. J., Wikel, S. K., Miller, R. S., Wagner, G. G., Almazán, C., Hillman, R., Messenger, M. T., Ugstad, P. O., Duhaime, R. A., Teel, P. D., Ortega-Santos, A., Hewitt, D. G., Bowers, E. J., Bent, S. J., Cochran, M. H., McElwain, T. F., Scoles, G. A., Suárez, C. E., Davey, R., Howell Freeman, J. M., Lohmeyer, K., Y Li, A., D Guerrero, F., Kammlah, D. M., Phillips, P., Pound, J. M. (2010). One health approach to identify research needs in bovine and human babesiosis: workshop report. *Parasite Vector*, 3, 36.
- Ramos Aragón, J. A., Mosqueda Gualito, J. J., Hernández Ortiz, R. y Milián Suazo, F. (2015). Babesiosis bovina en las cuencas lecheras de México. En Milán Suazo, F., Hernández Andrade, L., Hernández Ortiz, R. (Ed.), *Situación económica de la ganadería lechera en México* (1era ed., Vol. 2, pp. 73-100).
- Rojas, E., Domínguez, P., García, M., Cruz-Vázquez, C., Figueroa, J., Ramos, J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8(2).
- Rojas, E., Mosqueda, J., Álvarez, J., Hernández, R., Ramos, J., Rojas, C., Cantó, G., Vega, C. y Figueroa, J. (2011). Transmisión de cepas atenuadas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2 (3), 267-281.
- Sachman-Ruiz, B., Lozano, L., Lira, J. J., Martínez, G., Rojas, C., Álvarez, J. A., Figueroa, J. V. (2021). A comparative genomic study of attenuated and virulent strains of *Babesia bigemina*. *Pathogens*, 10, 318.
- Suarez, C. and Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*. 180. 109-125.
- Taylor, K. J. (2008). Evaluation of the vaccine potential of malarial TCTP. A thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. RMIT University.
- Taylor, K. J., Van, T.T., MacDonald, S.M., Meshnick, S.R., Fernley, R. T., MacReadie, I. G., Smooker, P.M. (2015). Immunization of mice with

- Plasmodium* TCTP delays establishment of *Plasmodium* infection. *Parasite Immunol.* 37, 23-31.
- Terkawi, M. A., Seuseu, F. J., Wibowo, P. E., Huyen, N. X., Minoda, Y., AbouLaila, M., Kawai, S., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I. (2011). Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 178, 40-45.
- Thaw, P., Baxter, N., Hounslow, A., Price, C., Waltho, J. and Craven, J. (2001). Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nature Estructure Biology.* 8 (8). 701-704.
- TriReagent® -Manufacturer's protocol. (1995). Molecular Research Center. Cincinnati, OH.
- Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Mamoun, C. B., Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 29, 357-370.
- Vega, C. A., Buening, G. M., Green, T. J. and Carson, C. A. (1985). *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am J Vets Res.* 46 (2). 416-420.
- Vignau, M. L., Venturini, L. M., Romero, J. R., Eiras, D. F., Basso, W. U. (2005). *Parasitología Práctica y Modelo de Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos.* Argentina. DIAP.
- Wu, P. S., Yang, C. Y., Young Yen, J. J., Chou, C. H., Cheng, S. H., Leo Wang, C. K., Lai, Y. G., Liao, N. S., Yang-Yen, H. F. (2009). Critical roles of Translationally Controlled Tumor Protein in the homeostasis and TCR mediated proliferation of peripheral T cells. *J. Immunol.* 183, 2373-2381.
- Xoconostle-Cazáres, B. and Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-function relationship of TCTP. En A. Telerman, and R. Amson, *TCTP/tpt1-remodeling signaling from stem disease* (Vol. 64, pág. 309). Switzerland: Springer.
- Young, A. S. and Morzaria, S. P. (1986). Biology of *Babesia*. *Parasitol Today*, 2(8), 211-219.
- Zheng, J., Chen, Y., Li, Z., Cao, S., Zhang, Z. and Jia, H. (2017). Translationally controlled tumor protein is required for the fast growth of *Toxoplasma gondii* and maintenance of its intracellular development. *The fASEB journal.* 32.

Zintl, A., Gray, J., Skerret, H. (2005). Possible mechanism underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite. Immunol.* 27, 115-120.