



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Identificación y caracterización inmunomolecular de proteínas de
Babesia vogeli involucradas en el mecanismo de invasión a los
eritrocitos

TESIS

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

Presenta

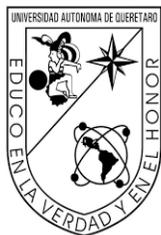
MVZ. Aldo Josué Pavón Rocha

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. A 18 de diciembre de 2020

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
(diciembre de 2020)
México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Identificación y caracterización inmunomolecular de proteínas de *Babesia vogeli* involucradas en el mecanismo de invasión a los eritrocitos

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. Aldo Josué Pavón Rocha

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía
Secretario

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Vocal

Dra. Xóchitl Zambrano Estrada
Suplente

M.C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
(diciembre de 2020)
México

Resumen

La babesiosis canina es una enfermedad infecciosa, transmitida por garrapatas, causada por protozoarios del género *Babesia*. *Babesia vogeli* es la especie de piroplasma con mayor distribución a nivel mundial y la que se ha descrito ocurriendo de manera natural en perros de México. El mecanismo de invasión de *Babesia* al eritrocito es muy similar al de otros microorganismos Apicomplexa; estos utilizan una serie de proteínas posicionadas en el polo apical para lograr ingresar a la célula blanco. Las proteínas AMA-1 (antígeno de membrana apical 1) y RAP-1 (proteína asociada a las roptrías 1) son secretadas durante la invasión del parásito a los eritrocitos y por ende, han sido objeto de estudio debido a su importancia biológica. Hasta ahora, no se ha descrito ninguna de estas proteínas en *B. vogeli*, agente causal de la babesiosis canina en México. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los antígenos AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli* y comprobar su expresión en la fase intraeritrocítica. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación automatizada de Sanger se obtuvo un fragmento de 407 pares de bases correspondiente a una secuencia de 86 aminoácidos de la proteína AMA-1 y el gen completo de 1,335 pares de bases correspondiente a una secuencia de 444 aminoácidos de la proteína RAP-1 de *B. vogeli*. La expresión de ambos genes se comprobó en las fases intraeritrocíticas mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR). Asimismo, utilizando herramientas bioinformáticas se diseñaron dos péptidos de cada proteína que contienen epítomos B predichos y se enviaron a sintetizar en sistema de dendrímeros de 8 ramas. Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda con cada uno de estos péptidos, 4 veces con intervalos de 21 días; posterior a esto, se determinó la generación de anticuerpos en suero sanguíneo obtenido de cada uno de los conejos durante cada una de las inmunizaciones mediante ensayo de ELISA indirecta. Por último, con los sueros hiperinmunes se realizaron inmunofluorescencias indirectas, comprobando que anticuerpos anti AMA-1 y anti RAP-1 reconocen los merozoítos de *B. vogeli* con un patrón de fluorescencia en el complejo apical, confirmando la expresión de ambas proteínas. Con este trabajo se concluye que las proteínas AMA-1 y RAP-1 son expresadas en las fases intraeritrocíticas de *B. vogeli* y contienen epítomos B capaces de desarrollar una respuesta inmunológica de tipo humoral en un modelo *in vivo*.

Palabras clave: Apicomplexa, Babesiosis canina, *Babesia vogeli*, eritrocito, mecanismo de invasión.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Summary

Canine babesiosis is an infectious, tick-borne disease, caused by protozoans of the genus *Babesia*. *Babesia vogeli* is the species of pyroplasm with the highest worldwide distribution and the one described to naturally occurring in dogs in Mexico. The *Babesia* invasion mechanism to the erythrocyte is very similar to other Apicomplexan microorganisms; they use a group of proteins located in the apical complex to enter into the host cell. The apical membrane antigen 1 (AMA-1) and the rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) are secreted during the parasite's invasion into erythrocytes, therefore were studied due to their biological importance. To date, none of these proteins have been described in *B. vogeli*, the causal agent of canine babesiosis in Mexico. The aim of this work was to characterize the antigens AMA-1 and RAP-1 of *B. vogeli*, and to demonstrate their expression in blood stages. A 407 base pairs fragment corresponding to an 86-amino acid sequence of the AMA-1 protein and the complete 1,335 base pairs gene corresponding to a 444-amino acid sequence of the RAP-1 protein of *B. vogeli* were both obtained through polymerase chain reaction and Sanger's automated sequencing. By retrotranscription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, the expression of both genes was demonstrated in *B. vogeli* blood stages. Likewise, using bioinformatic tools, two peptides of each protein containing predicted B-epitopes were designed and sent to be synthesized in an 8-branch dendrimer system. Two New Zealand rabbits were immunized with each one of these peptides, 4 times with 21 day intervals; and antibody's production was determined in blood serum obtained from each one of the rabbits during each one of the immunizations by indirect ELISA assay. Finally, indirect fluorescent antibody test was carried out with the hyperimmune sera, demonstrating that antibodies against AMA-1 and RAP-1 recognized *B. vogeli* merozoites with a fluorescent pattern in the apical complex. Thus, confirming the expression of both proteins. In this work, it is concluded that AMA-1 and RAP-1 proteins are expressed in *B. vogeli* blood stages and they contain B epitopes which are able to develop an immune response in an *in vivo* model, demonstrating their antigenicity and immunogenicity.

Key words: Apicomplexan, Canine babesiosis, *Babesia vogeli*, erythrocyte, invasion mechanism.

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado principalmente a la memoria de mi abuelita María Santos Rivera Sustaita (†) y a mi abuelo, Julio Rocha Velázquez (†), por confiar incondicionalmente en mí. Siempre estarán en mi corazón.

A mis padres y hermana, ya que ellos son mi motor para seguir superándome, así como a todos mis amigos que se volvieron mi familia y que en algún momento me brindaron su apoyo para no desistirme de cumplir mi meta a lo largo de estos dos años.

Por último, dedico este trabajo a la comunidad científica y al gremio veterinario, ya que las enseñanzas y experiencias que he adquirido de todos ellos han contribuido a forjarme un criterio basado en ciencia, el cual tengan por seguro, aplicaré y defenderé durante toda mi vida académica.

Agradecimientos

Agradezco primero que nada, a Dios, por mantenerme siempre con una fé positiva pese a las adversidades.

A mis padres, hermana y demás familia, por siempre creer en mí y apoyarme en mis decisiones. Sepan que cada esfuerzo y sacrificio estan valiendo toda la pena.

A mi director de tesis, mentor científico y amigo, el Dr. Juan Mosqueda. Desde que lo conocí me ha enseñado el camino correcto en la vida académica y siempre ha tenido un momento de su tiempo para brindarnos un consejo, un regaño o unas palabras de aliento. Definitivamente formar parte de su laboratorio aportó y contribuyó de manera significativa a ser la persona y profesionista que ahora soy.

A mi comité de asesores, Dr. Carlos Vega, Dra. Bertha Carvajal, Dra. Xóchitl Zambrano y al M.C Miguel Mercado, por su valioso tiempo en la revisión de mi trabajo, por siempre motivarme a dar más de mi y apoyarme en su momento, en todo lo que estuvo a su alcance. De igual manera agradezco al Dr. Diego Hernández , por siempre apoyarme en cada uno de los experimentos en los que requería de su apoyo y asesoría.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que durante dos años compartimos experiencias buenas y malas, formando un lazo muy fuerte, que estoy seguro durará para la posteridad. Gracias por hacer más ameno estos dos años.

Al área de cunicultura de la Facultad de Ciencias Naturales, campus Amazcala por permitirnos realizar parte de los ensayos de inmunización en sus instalaciones.

A mi país (Estados Unidos Mexicanos), la Universidad Autónoma de Querétaro y al CONACyT por la beca otorgada durante estos dos años y todas las facilidades dadas, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible realizar mis estudios de maestría.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Summary.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Antecedentes históricos de la babesiosis en animales domésticos	2
2.2 Babesiosis canina.....	2
2.2.1 Definición, historia y reclasificación	2
2.3 <i>Babesia vogeli</i>	3
2.3.1 Morfología.....	3
2.3.2 Taxonomía	5
2.3.3 Ciclo biológico	6
2.3.4 Patogenia	8
2.3.5 Epidemiología.....	9
2.3.6 Diagnóstico.....	11
2.3.7 Tratamiento.....	12
2.3.8 Control y prevención	14
2.4 Mecanismo de invasión de <i>Babesia</i> al eritrocito	17
2.5 Antígeno de membrana apical 1 (AMA-1).....	18
2.6 Proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1)	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS.....	23

5.1	Objetivo general.....	23
5.2	Objetivos específicos	23
VI.	METODOLOGÍA.....	24
6.1	Material biológico utilizado.....	24
6.2	Cirugía e infección experimental	24
6.3	Procesamiento de la sangre infectada	25
6.4	Obtención de las secuencias predichas de RAP-1 y AMA-1 de <i>B. vogeli</i>	26
6.4.1	Extracción de ADN	26
6.4.2	Diseño de iniciadores	27
6.4.3	Amplificación de los genes <i>rap-1</i> y <i>ama-1</i> de <i>B. vogeli</i>	30
6.4.4	Clonación, transformación de células competentes y secuenciación	31
6.4.5	Análisis de las secuencias obtenidas	32
6.5	Análisis de la transcripción de los genes <i>rap-1</i> y <i>ama-1</i> de <i>B. vogeli</i>	33
6.5.1	Extracción de ARN total	33
6.5.2	RT-PCR.....	35
6.6	Obtención de anticuerpos contra las proteínas RAP-1 y AMA-1 de <i>B. vogeli</i>	36
6.6.1	Síntesis de péptidos	36
6.6.2	Inmunizaciones.....	36
6.6.3	Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta	37
6.7	Análisis de expresión de las proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta ..	39
7	RESULTADOS	41
7.1	Amplificación de los genes <i>ama-1</i> y <i>rap-1</i> de <i>B. vogeli</i>	41
7.2	Clonación de los amplicones y transformación en células competentes	43
7.3	Secuenciación y análisis de las secuencias nucleotídicas	44
7.3.1	Gen <i>ama-1</i>	44
7.3.2	Gen <i>rap-1</i>	45
7.4	Análisis de las secuencias de aminoácidos y de la estructura secundaria de las proteínas	46
7.4.1	Proteína AMA-1	46
7.4.2	Proteína RAP-1.....	49
7.5	Análisis de la transcripción de los genes	52

7.5.1	Gen <i>ama-1</i>	52
7.5.2	Gen <i>rap-1</i>	53
7.6	Identificación y selección de péptidos con epítopos B predichos.....	54
7.7	Resultados de la evaluación de los anticuerpos contra las proteínas AMA-1 y RAP-1 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA indirecta)	55
7.7.1	Determinación de anticuerpos anti RAP-1 de <i>B. vogeli</i>	55
7.7.2	Determinación de anticuerpos anti AMA-1 de <i>B. vogeli</i>	57
7.8	Análisis de expresión de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de <i>B. vogeli</i> mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)	60
8	DISCUSIÓN.....	66
9	CONCLUSIONES.....	69
10.	LITERATURA CITADA.....	70
11.	ANEXO 1	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Denominación actual de las 3 principales especies de <i>Babesia</i> (<i>sensu lato</i>) que afectan a caninos.	4
2	Principales signos clínicos y alteraciones sanguíneas en caninos que cursan con infección por <i>B. vogeli</i> .	9
3	Estudios epidemiológicos realizados en países donde la garrapata <i>R. sanguineus</i> s.l. es endémica.	10
4	Fármacos utilizados en el tratamiento de babesiosis canina.	13
5	Fármacos utilizados para evitar la infestación de garrapatas en caninos.	16
6	Iniciadores diseñados para la amplificación de los genes <i>ama-1</i> y <i>rap-1</i> .	29
7	Análisis BLAST de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a AMA-1 de <i>B. vogeli</i> .	44
8	Análisis BLAST de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a RAP-1 de <i>B. vogeli</i> .	45
9	Péptidos diseñados en sistema MAP-8 de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de <i>Babesia vogeli</i> .	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Frotis de sangre periférica de un canino infectado por <i>B. vogeli</i> .	4
2	Ciclo biológico de <i>Babesia</i> .	7
3	Esquema gráfico de eritrocito infectado por merozoitos de <i>Babesia</i> spp.	20
4	Calendario de vacunación utilizado para la generación de anticuerpos contra las proteínas RAP-1 y AMA-1 de <i>B. vogeli</i> .	37
5	Amplificación parcial del gen <i>ama-1</i> de <i>B. vogeli</i> .	41
6	Amplificación del gen <i>rap-1</i> de <i>B. vogeli</i> .	42
7	Amplificación del gen <i>rap-1</i> de <i>B. vogeli</i> mediante un PCR de colonia.	43
8	Alineamiento múltiple de la secuencia parcial de aminoácidos correspondiente a la proteína AMA-1 de <i>B. vogeli</i>	46
9	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína AMA-1 de <i>B. vogeli</i> con el programa Protscale del servidor Expasy.	47
10	Análisis bioinformático de predicción de hélices transmembranales en la proteína AMA-1 con el programa TMHMM Server v.2.0.	48
11	Análisis de la predicción de péptido señal en la proteína AMA-1 con el programa SignalP 5.0.	48

12	Análisis de dominios funcionales en la proteína AMA-1 mediante el programa Pfam.	49
13	Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de RAP-1 de <i>B. vogeli</i> .	50
14	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína RAP-1 de <i>B. vogeli</i> con el programa Protscale del servidor Expasy.	50
15	Análisis bioinformático de predicción de hélices transmembranales en la proteína RAP-1 con el programa TMHMM Server v.2.0.	51
16	Análisis de la predicción de péptido señal en la proteína RAP-1 con el programa SignalP 5.0.	51
17	Análisis de dominios funcionales en la proteína RAP-1 mediante el programa Pfam.	52
18	RT-PCR para comprobar la transcripción del gen <i>ama-1</i> .	52
19	RT-PCR para comprobar la transcripción del gen <i>rap-1</i> .	53
20	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 3) inmunizado con el péptido RAP-1.1.	55
21	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 4) inmunizado con el péptido RAP-1.1.	56
22	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 11) inmunizado con el péptido RAP-1.2.	56

23	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 13) inmunizado con el péptido RAP-1.2.	57
24	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 1) inmunizado con el péptido AMA-1.1.	58
25	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 17) inmunizado con el péptido AMA-1.1.	58
26	Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 21) inmunizado con el péptido AMA-1.2.	59
27	Los anticuerpos anti péptido RAP-1.1 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de <i>B. vogeli</i> mediante inmunofluorescencia indirecta.	62
28	Los anticuerpos anti péptido RAP-1.2 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de <i>B. vogeli</i> mediante inmunofluorescencia indirecta.	63
29	Los anticuerpos anti péptido AMA-1.1 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de <i>B. vogeli</i> mediante inmunofluorescencia indirecta.	64
30	Los anticuerpos anti péptido AMA-1.2 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de <i>B. vogeli</i> mediante inmunofluorescencia indirecta.	65

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis canina es una enfermedad infecciosa de caninos domésticos y silvestres (Penzhorn, 2020). La principal especie causante de la babesiosis canina en México es *B. vogeli*, contando con una distribución a nivel mundial (Irwin, 2010; Panti-May y Rodríguez-Vivas, 2020). Sin embargo, la investigación sobre esta especie se ha limitado a realizar análisis epidemiológicos y reportes de caso. Actualmente con el desarrollo y apoyo de las herramientas bioinformáticas es posible desarrollar estrategias de caracterización inmunológicas y moleculares de proteínas antigénicas de varios microorganismos, incluyendo las especies de *Babesia* (Hernández-Silva *et al.*, 2018; Mosqueda *et al.*, 2019).

Los parásitos de *Babesia* deben ingresar al eritrocito para su replicación dentro del hospedante vertebrado; el mecanismo de invasión depende de una maquinaria de proteínas que son secretadas por orgánulos ubicados en el complejo apical, y que al estar expuestas al sistema inmunitario, se genera una respuesta inmunitaria contra ellas (Yokoyama *et al.*, 2006). Por lo tanto, estas proteínas se han investigado con el fin de generar estrategias de control basadas en la obtención de candidatos vacunales o antígenos para diagnóstico.

Hasta la fecha, *B. vogeli* no tiene caracterizada ninguna proteína involucrada en el mecanismo de invasión, por lo que, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar, mediante técnicas inmunológicas y moleculares, al antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) y a la proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes históricos de la babesiosis en animales domésticos

El protozooario *Babesia* fue descrito por primera vez en 1888 por Viktor Babes en un brote epidémico que ocasionó una mortandad importante en bovinos de Rumania (Babes, 1888). Babes reportó la presencia de unos microorganismos intraeritrocíticos que pudo identificar mediante microscopía óptica, atribuyéndolos como los agentes etiológicos de esta enfermedad. Debido a que los principales signos clínicos presentes en estos animales eran la presencia de orina color roja y la fiebre, a esta enfermedad se le acuñó el nombre de hemoglobinuria bovina o fiebre de agua roja (Babes, 1888; Homer *et al.*, 2000).

Cinco años después del reporte de Babes, Smith y Kilborne denominan por primera vez con el nombre de *Pyrosoma bigeminum* a este parásito intraeritrocítico, principalmente por tener un aspecto morfológico en forma de pera (Smith y Kilborne, 1893). En la actualidad este microorganismo es llamado *Babesia bigemina* y es el agente causal de la fiebre del ganado de Texas, además cabe recalcar que este fue el primer reporte de caso en el que se asociaba la diseminación de una enfermedad a causa de la picadura de un vector artrópodo como las garrapatas (Homer *et al.*, 2000; Schnittger *et al.*, 2012). En la actualidad el protozooario *Babesia* es considerado el parásito más frecuente en animales silvestres y domésticos (Jalovecka *et al.*, 2019).

2.2 Babesiosis canina

2.2.1 Definición, historia y reclasificación

La babesiosis canina es una enfermedad de canideos domésticos y silvestres causada por hemoprotozoarios del género *Babesia* (Irwin, 2010; Penzhorn, 2020). Esta enfermedad es transmitida por las garrapatas de la familia Ixodidae (Irwin, 2010; Gray *et al.*, 2019), y origina un cuadro infeccioso caracterizado por alteraciones hematológicas, fallas multiórganicas y en ocasiones la muerte (Matijatko *et al.*, 2007, 2009; Zygner *et al.*, 2007).

El primer caso reportado de babesiosis canina en el mundo ocurrió en Colonia del Cabo, Sudáfrica y data de 1893 (Hutcheon, 1983). En 1974, Osorno y Ristic confirmaron la

presencia de este parásito en México mediante la aplicación de los postulados de Koch (infección experimental en perros esplenectomizados) y de la técnica de inmunofluorescencia directa (Osorno y Ristic, 1974). En la actualidad escasos reportes han sido documentados en México, en donde se ha encontrado que la única especie de *Babesia* presente en perros es *B. vogeli* (Panti-May y Rodríguez-Vivas, 2020).

Hasta la década de 1980 se consideraba que solo una especie de *Babesia* era la que infectaba a los perros, por lo cual, de manera general, al agente causal de esta enfermedad se le denominaba como *Babesia canis* (*sensu lato*). Sin embargo, en 1989 el equipo de trabajo de Uilenberg realizó la primera división entre especies de *Babesia* propias de caninos (Uilenberg *et al.*, 1989); esto debido a que observaron que las cepas que afectaban a perros variaban en antigenicidad, patogenicidad, especificidad del vector y distribución geográfica, postulando una clasificación de tres subespecies; *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* y *Babesia canis vogeli*. En la actualidad las subespecies de *Babesia canis* (*sensu lato*) fueron reclasificadas, como especies por separado (Cuadro 1), tomando como referencia una perspectiva biológica y evolutiva, en vez de una de diagnóstico y con base en análisis moleculares y serológicos (Zahler *et al.*, 1998; Uilenberg, 2006).

Anteriormente, *B. vogeli* era denominada como *Babesia major*, nombre actual de una especie de *Babesia* de bovinos, por lo tanto, confusiones en la literatura publicada anterior a la década de 1990 son comunes. Actualmente, se especula que el nombre de *B. vogeli* fue puesto en honor a Hans Vogel, parasitólogo alemán que dedicó su vida a la investigación de helmintos, sin embargo, el motivo aún es desconocido (Penzhorn, 2020).

2.3 *Babesia vogeli*

2.3.1 Morfología

B. vogeli es considerada un piroplasma grande, con base en el análisis y caracterización de la subunidad ribosomal pequeña del gen 18S rRNA (18S rDNA), el cual, al estar muy conservado entre especies de *Babesia*, ha servido para discernir genéticamente entre éstas, debido a algunas variaciones en las secuencias nucleotídicas (Birkenheuer *et al.*, 2004; Hunfeld *et al.*, 2008).

Su morfología dentro del eritrocito puede ser piriforme o ameboidea y sus medidas son de 4 a 5 μm de largo y 2 a 4 μm de diámetro (Birkenheuer *et al.*, 2004; Matjila *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando está en fase de merozoíto puede haber de dos a cuatro microorganismos en cada eritrocito infectado (Schnittger *et al.*, 2012), como se muestra en la Figura 1.

Cuadro 1. Denominación actual de las 3 principales especies de *Babesia* (*sensu lato*) que afectan a caninos.

Nombre anterior	Nombre actual	Principal garrapata vector	Distribución geográfica
<i>Babesia canis canis</i>	<i>Babesia canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Europa y Asia
<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mundial
<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Babesia rossi</i>	<i>Haemaphysalis leachii</i>	África y un caso en USA

Fuente: Uilenberg *et al.*, 1989; Irwin, 2010; Matijatko *et al.*, 2012.

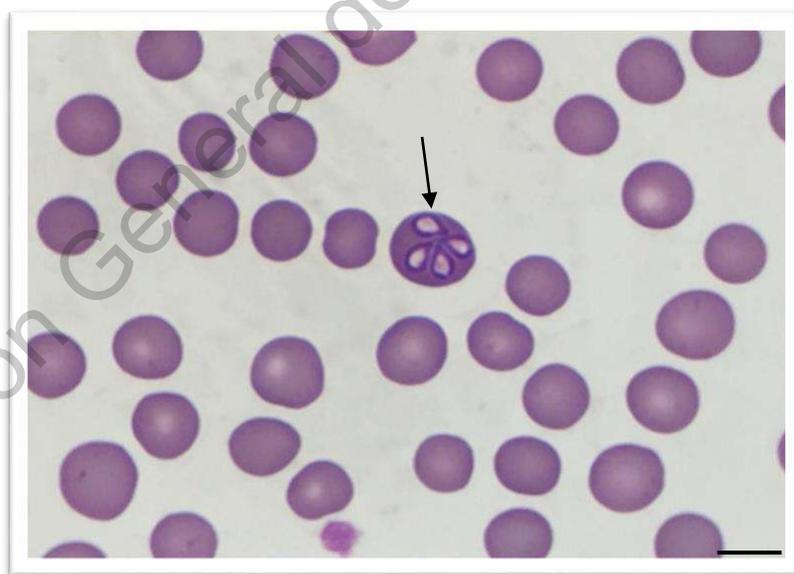


Figura 1. Frotis de sangre periférica de un canino infectado por *B. vogeli* (flecha negra). Eritrocito conteniendo cuatro merozoítos, Barra negra: 5 μm . Tinción de Diff Quick, 1000 \times . (Fotografía: Aldo J. Pavón-Rocha).

2.3.2 Taxonomía

La taxonomía del parásito *B. vogeli* se describe según Levine *et al.* (1980), modificada por Zahler *et al.* (1998) en donde se substituye: especie *canis* subespecie *vogeli*, por únicamente especie *vogeli*.

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoa

Subclase: Piroplasmia

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Especie: *vogeli*

2.3.3 Ciclo biológico

El ciclo biológico de *B. vogeli* en el hospedante vertebrado, el canino doméstico y en el hospedante invertebrado, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* se muestra en la Figura 2; el ciclo en general esta conformado por tres ciclos reproductivos diferentes: dos asexuales que se desarrollan en las glándulas salivales de la garrapata (esporogonia) y en los eritrocitos del canino (merogonia) y uno sexual que se lleva a cabo en el intestino de la garrapata (gamogonia) (Homer *et al.*, 2000; Schnittger *et al.*, 2012; Jalovecka *et al.*, 2019). En el caso exclusivo de *Rhipicephalus sanguineus s.l.*, sus tres estadios: larva, ninfa y adulto tienen la capacidad de transmitir la infección a su hospedante (Shortt, 1973).

El ciclo biológico de *B. vogeli* comienza cuando una garrapata *R. sanguineus s.l.* infectada con esporozoítos de *B. vogeli* se alimenta de la sangre de un canino doméstico y los inocula al expulsarlos mediante su saliva en el sitio de alimentación; de esta manera al ingresar al torrente sanguíneo los esporozoítos utilizan algunas proteínas secretadas por orgánulos ubicados en el complejo apical, logrando de esta manera adherirse, posicionarse y penetrar al eritrocito (Mosqueda *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2006). Estos esporozoítos provienen de las glándulas salivales de la garrapata donde se lleva a cabo el proceso de esporogonia (Jalovecka *et al.*, 2019), sin embargo, para que la infección natural tenga éxito, la garrapata debe permanecer adherida, alimentándose del canino por varios días; esto debido a que la garrapata infectada, al momento de subirse al hospedante, tiene los esporoblastos latentes encapsulados en sus tejidos y células adyacentes, debido a esto, Shortt (1973) hipotetizó que la garrapata al iniciar su alimentación comienza a emitir un componente hormonal, haciendo que los esporoblastos se activen y se movilicen, para dar inicio la replicación asexual (esporogonia), generando miles de esporozoítos y haciendo que la infección sea exitosa algunos días después del inicio de la alimentación (Shortt, 1973). Posterior a la inoculación, el esporozoíto ingresa al eritrocito y e inicia su transformación a trofozoíto; este último, se divide mediante fisión binaria y logra desarrollar de 2 a 4 merozoítos. Este proceso recibe el nombre de merogonia (Jalovecka *et al.*, 2019). Posteriormente, los merozoítos pueden lisar el eritrocito donde se encuentra e invadir otros eritrocitos, o detener su división y transformarse en pre-gametocitos para ser ingeridos por una garrapata e iniciar así su reproducción sexual; en el intestino de la garrapata, los pre-gametocitos se diferencian a gametocitos y ocurre la fusión sexual resultando en la formación

de un cigoto móvil; este proceso recibe el nombre de gametogonia (Jalovecka *et al.*, 2019). Los cigotos, a su vez, invadirán las células intestinales de la garrapata y mediante el mecanismo de meiosis se formarán los quinetos. Estos quinetos se diseminaran a través de la hemolinfa hacia los tejidos de la garrapata, incluyendo ovarios, glándula salival y tejidos adyacentes. En este punto el ciclo se reinicia con el proceso de la esporogonia, la cual finalizará en la producción de esporoblastos en la glándula salival, que a su vez, al ser activados por la alimentación de la garrapata, generaran de nuevo esporozoítos infectivos, asegurando la perpetuación del parásito en el ambiente (Shortt, 1973; Irwin, 2010).

Por último, otros mecanismos de infección pocos abordados pero que de igual manera se ha comprobado la factibilidad de la transmisión de *B. vogeli*, es la transmisión mecánica mediante la aplicación de transfusiones sanguíneas a caninos sanos con sangre infectada por este protozooario (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

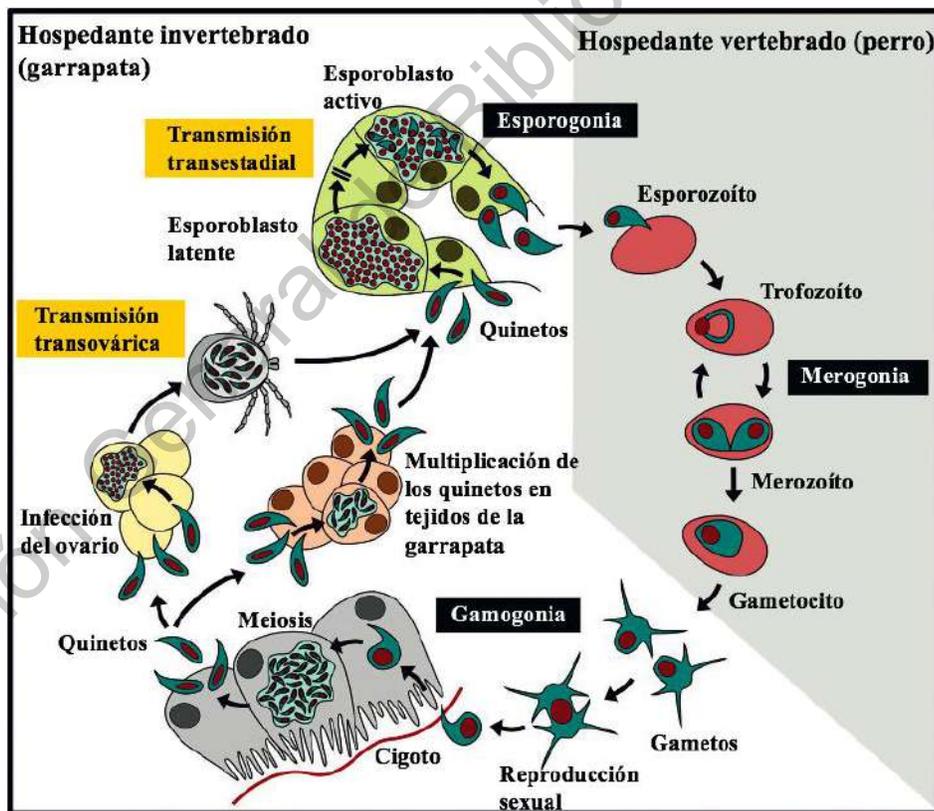


Figura 2. Ciclo biológico de *Babesia*. Se observan las fases del ciclo en el hospedante vertebrado (perro) y en el hospedante invertebrado (garrapata) (Modificado de Jalovecka *et al.*, 2019).

2.3.4 Patogenia

La babesiosis canina es una enfermedad que puede clasificarse según su curso en subclínico, agudo y crónico, incluyendo también la severidad de los signos clínicos en este criterio (Irwin, 2010). Las infecciones por *B. vogeli* en la mayoría de los casos cursan de manera subclínica y/o con manifestación de signos clínicos de leves a moderados (Köster *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Los principales signos clínicos y alteraciones sanguíneas se describen en el Cuadro 2.

Estudios han descrito, como mecanismos de enfermedad, la lisis eritrocítica y la respuesta inmunitaria por parte del hospedante. La lisis eritrocítica da origen a una anemia, la principal manifestación clínica de la babesiosis (Bilíc *et al.*, 2018). Esta anemia puede ser de origen intravascular (lisis de eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos) y se sugiere que los mecanismos que la preceden, pueden ser debido a la multiplicación parasitaria, hemodilución, eritrofagocitosis, falla en la eritropoyesis (Matijatko *et al.*, 2012), así como hemólisis inmunomediada, la cual ha sido descrita en casos de babesiosis causada por *B. vogeli*, observando una mayor probabilidad de que se desencadene por la acumulación de anticuerpos en la superficie del eritrocito (Carli *et al.*, 2009).

En cuanto a la respuesta inmunitaria por parte del hospedante, se ha documentado que las condiciones llamadas MODS (síndrome de disfunción orgánica múltiple), SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) y choque séptico son las principales causas de muerte en los casos agudos de babesiosis canina (Welz *et al.*, 2001; Matijatko *et al.*, 2009; Schetters *et al.*, 2009). Estas manifestaciones son originadas por una elevada expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-8, *TNF α* , *KC-like* (proteína quimiotáctica de queratinocitos) y *MCP 1* (proteína quimiotáctica de monocitos) (Zygner *et al.*, 2014; Galán *et al.*, 2018). Pese a que estos mecanismos de patogenicidad se encuentran mejor descritos en *B. canis* (Matijatko *et al.*, 2012) ya se ha documentado que en la infección causada por *B. vogeli* ocurre algo similar, sobretodo en cachorros y animales inmunodeprimidos donde los signos clínicos pueden desencadenar complicaciones clínicas como las antes mencionadas (Irwin, 2010; Wang *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Principales signos clínicos y alteraciones sanguíneas en caninos que cursan con infección por *B. vogeli*.

Babesiosis canina por <i>B. vogeli</i>	
Signos clínicos	Anormalidades en pruebas de laboratorio
-Membranas mucosas pálidas	-Anemia moderada (hemolítica)
-Hemoglobinuria	-Trombocitopenia (más del 95% de los casos)
-Fiebre (> 39.5 °C)	-Hiperfibrinogenemia
-Anorexia	-Leucopenia con neutropenia
-Letargia	-Incremento moderado de ALT, AST, ALP y
-Ictericia	Bilirrubina total en sangre
-Esplenomegalia	-Ligero Incremento de urea y creatinina en sangre

Fuente: Furlanello *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2018.

ALT: Alanino amino transferasa; AST: Aspartato amino transferasa; ALP: Fosfatasa alcalina.

2.3.5 Epidemiología

La babesiosis canina, causada por *B. vogeli* es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida por el mundo, con una importancia veterinaria globalizada (Solano-Gallego y Baneth, 2011; Penzhorn, 2020).

Anteriormente se consideraba que *B. vogeli* solo era endémica de las regiones tropicales y subtropicales del continente Americano (Dantas-Torres, 2008a), sin embargo, actualmente se ha reportado la presencia de esta especie de piroplasma en todos los continentes del mundo incluyendo zonas geográficas poco favorables para el mantenimiento del vector como el Norte de Europa (Irwin, 2010; Johnson *et al.*, 2013; Johnson, 2016).

La garrapata *R. sanguineus s.l.* es el vector de *B. vogeli* (Irwin, 2010). Esta garrapata ha sido identificada en México, mostrando incidencias altas y una amplia distribución (Cruz-Vazquez y Garcia-Vazquez, 1999; Tinoco-Gracia *et al.*, 2009). Al ser la garrapata con mayor incidencia en caninos del país y tener la capacidad de transmitir diversos patógenos, entre ellos *B. vogeli* (Dantas-Torres, 2008b), la probabilidad de que exista una prevalencia alta de este protozooario en caninos de México es posible, sin embargo esto aún no ha sido investigado.

Dentro de los estudios epidemiológicos publicados a nivel mundial acerca de la presencia de *B. vogeli*, resaltan los llevados a cabo en países sudamericanos donde la presencia de la garrapata vector *R. sanguineus s.l.* es endémica y las condiciones climatológicas y geográficas son similares a las de México (Cuadro 3).

La situación epidemiológica actual de la babesiosis canina en México es parcialmente conocida, desde la primera documentación en 1974 por Osorno y Ristic han surgido reportes esporádicos en distintos estados de la República Mexicana en donde, para el diagnóstico han sido utilizadas técnicas de microscopía óptica (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2000) y moleculares (Panti-May y Rodríguez-Vivas, 2020), quedando de manifiesto la presencia de este parásito en caninos y demostrando la presencia en México de *B. vogeli*; hasta el momento no ha habido reporte de la presencia de *Babesia canis*, *Babesia rossi* y/o alguna otra especie de piroplasma que infecta caninos en México. Sin embargo, estudios epidemiológicos más completos se requieren para comprender el estatus de la enfermedad y por ende la magnitud del problema en el país, similar al caso de Brasil en donde la investigación que se lleva a cabo ha logrado crear una perspectiva propia frente a esta enfermedad y la manera de lidiar con ella (Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Paulino *et al.*, 2018).

Cuadro 3. Estudios epidemiológicos realizados en países donde la garrapata *R. sanguineus s.l.* es endémica.

País	Prevalencia reportada para <i>B. vogeli</i>	Prueba de diagnóstico	Referencias
Costa Rica	8%	PCR	Rojas <i>et al.</i> , 2014
Brasil	15.66% a 28.7%	PCR e IFI	Costa-Júnior <i>et al.</i> , 2009 Pereira da Costa <i>et al.</i> , 2015 Paulino <i>et al.</i> , 2018
Colombia	51.6%	IFI	Vargas-Hernández <i>et al.</i> , 2012

(PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; IFI: Inmunofluorescencia indirecta)

2.3.6 Diagnóstico

El abordaje diagnóstico de la babesiosis canina inicia con una examinación física y una anamnesis completa (Dantas-Torres y Figueredo, 2006). La principal sospecha clínica se debe a la presencia previa o actual de garrapatas (vector), así como a la manifestación de signología sugestiva como ictericia, letargia y fiebre (Irwin, 2010).

La prueba de diagnóstico más utilizada para la detección de *B. vogeli* siempre ha sido el frotis de sangre periférica teñido con Giemsa u otra tinción policromática de tipo Romanowsky (Figura 1), por ser una prueba muy simple, económica y sensible. Sin embargo, es muy poco específica ya que solo nos brinda el diagnóstico oportuno durante la fase aguda de la enfermedad. De la misma manera una de las limitantes es que la microscopía óptica no brinda una caracterización a nivel de especie (Dantas-Torres y Figueredo, 2006). En las fases crónica y subclínica de la enfermedad, el diagnóstico de *B. vogeli* se vuelve más complicado debido a la poca parasitemia presente y la baja sensibilidad del frotis, por lo que, la implementación de técnicas moleculares e inmunológicas son necesarias para confirmar la presencia del material genético (ADN) del parásito en muestras de sangre o tejidos y de anticuerpos anti-*B. vogeli* en suero o plasma sanguíneo (Osorno y Ristic, 1974; Irwin, 2010).

Los métodos de diagnóstico inmunológicos para la detección de anticuerpos anti-*B. vogeli* son muy variados, entre ellos, los más comunes son la técnica de hemoaglutinación indirecta (Osorno y Ristic, 1974) (no utilizada en la actualidad para el diagnóstico de *B. vogeli*) y la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Furuta *et al.*, 2009; Costa-Júnior *et al.*, 2009; Vargas-Hernández *et al.*, 2012; Pereira da Costa *et al.*, 2015); es importante hacer énfasis en que la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de *B. vogeli* no se encuentra validada como un método de diagnóstico oficial, por lo que, los estudios que utilizaron este método de diagnóstico deben tomarse con precaución. Una gran desventaja de las técnicas inmunológicas es que los anticuerpos no se hacen presentes hasta fases crónicas de la enfermedad, por lo que, el abordaje diagnóstico con estas técnicas no es relevante en infecciones agudas.

También existe la prueba de ELISA tipo sandwich que se desarrolló utilizando un anticuerpo monoclonal, la cual detecta antígenos circulantes de *B. canis* en los primeros 4 días de la infección, con una sensibilidad del 100%, sin embargo, en esta técnica existe

reacción cruzada con antígeno de *B. vogeli* mostrando una sensibilidad reducida del 53.8% para esta especie y una especificidad del 86.4% (Eichenberger *et al.*, 2017). Pese que este método de ELISA es de los pocos publicados con una posible función para el diagnóstico de *B. vogeli*, la sensibilidad es muy baja y además es necesario contar con equipo especializado haciendo muy costoso y poco rentable su aplicación en el ámbito clínico.

Por otro lado, el diagnóstico molecular ha sido aplicado con más frecuencia en diversos estudios. El principal método de diagnóstico estandarizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en la amplificación de fragmentos de genes de *B. vogeli* como el *18S rRNA* y el *citocromo c oxidasa 1 (cox-1)*. Dentro de este método molecular destacan algunos estudios publicados debido a la capacidad de discernir entre especies de *Babesia* de caninos (Duarte *et al.*, 2008; Costa-Júnior *et al.*, 2012; Annoscia *et al.*, 2017; Troskie *et al.*, 2019). Otros métodos moleculares utilizados son la hibridación reversa de ADN (RLBH) (Yisaschar-Mekuzas *et al.*, 2013), el análisis de polimorfismos mediante fragmentos de restricción (RLFP) (Jefferies *et al.*, 2007) y la amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) (Müller *et al.*, 2010), la cual, en este caso en particular tuvo la desventaja de no ser específica de especie, por lo que tiene sus limitantes para el uso en investigación. Estos métodos moleculares tienen muchas ventajas como alta sensibilidad y especificidad analíticas, sin embargo, se requiere de equipo de laboratorio costoso como termociclador, cámara de electroforesis y equipos de quimioluminiscencia. Debido a esto, su aplicación no lo hace estar al alcance de todos los clínicos y laboratorios, por lo tanto, sigue habiendo muchas limitantes y brechas en cuanto al diagnóstico específico de *B. vogeli* en la actualidad.

2.3.7 Tratamiento

El tratamiento consiste en el uso de fármacos antiprotozoarios, antimicrobianos (Cuadro 4), y terapia de sostén (Bilic *et al.*, 2018). Los principales antiprotozoarios utilizados en el tratamiento de la babesiosis canina son las diamidinas aromáticas como el dipropionato de imidocarb y el acetato de diaminaceno, los cuales a lo largo del tiempo han tenido un buen efecto terapéutico contra las especies de *Babesia* grandes como *B. canis*, *B. vogeli* y *B. rossi* (Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Baneth, 2018).

Cuadro 4. Fármacos utilizados en el tratamiento de babesiosis canina.

Fármaco	Dosis	Vía de administración
Dipropionato de imidocarb	5-7 mg/kg. 2 dosis con intervalo de 15 días entre cada una.	Subcutánea o intramuscular
Aceturato de diaminaceno	3.5 mg/kg. Única dosis	Intramuscular
Azitromicina	10 mg/kg, c/ 24 h por 10 días.	Oral
Clindamicina	10 mg/kg c/12 h por 14 días.	Oral
Atovaquone	13.3 mg/kg, c/24 h por 10 días.	Oral

Fuente: Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Baneth, 2018.

El mecanismo de acción sugerido del dipropionato de imidocarb consiste en la interferencia con la producción o uso de poliaminas y la restricción en la entrada del inositol en el eritrocito infectado, causando la muerte del parásito por falta de nutrientes, por lo que, se considera que es el único fármaco babesiacida capaz de acabar con la parasitemia en el hospedante (Mosqueda *et al.*, 2012). Por su contraparte, el aceturato de diaminaceno actúa sobre la cadena de ADN, uniéndose en zonas ricas en adeninas y timinas, así como la inhibición de la topoisomerasa mitocondrial tipo II, causando la muerte del parásito por una falta de replicación y de oxigenación debido al daño mitocondrial. El atovaquone es otro antiprotozoario cuya función es bloquear el canal de transporte de electrones, causando una inhibición de las pirimidinas y la síntesis de ATP, disminuyendo el rango de consumo de oxígeno y el metabolismo celular del parásito (Mosqueda *et al.*, 2012; Baneth, 2018). Los antimicrobianos con acción comprobada contra *Babesia* en caninos son la azitromicina y la clindamicina; estos fármacos pertenecen a los macrólidos y su función es la inhibición de la transcripción y síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 50S de los ribosomas

(Baneth, 2018), los cuales, al no ser completamente eficientes en la eliminación de la parasitemia, se utilizan en combinación con atovaquone (Vial y Gorenflot, 2006; Baneth, 2018). Por último, el tratamiento de sostén consiste en mantener al paciente con un equilibrio electrolítico y ácido-base correcto, así como garantizar una buena perfusión sanguínea a los órganos vitales mediante transfusiones sanguíneas en caso de tener un volumen celular aglomerado igual o menor a 15% (Dantas-Torres y Figueredo, 2006).

2.3.8 Control y prevención

Actualmente las medidas de control y prevención contra la infección por *B. vogeli*, han sido enfocadas hacia la eliminación de la garrapata vector *R. sanguineus* s.l. del hospedante mediante la utilización de productos químicos (Dantas-Torres, 2008b). Los métodos de prevención enfocados al control del vector se desglosan en el Cuadro 5. El mecanismo de acción varía en cada producto, siendo el uso de collares, productos tópicos y pastillas masticables las que predominan en el mercado. La efectividad en la mayoría de los estudios existentes se ha probado en el modelo de garrapata *D. reticulatus* y de la especie *B. canis*; esta efectividad ha oscilado entre el 95% y el 100% de prevención en contra de la infección por *B. canis* en perros, en condiciones de laboratorio, por lo que, algunos autores hipotetizan que estos productos podrían evitar en gran porcentaje el riesgo de infección por otras especies de *Babesia* como *B. vogeli* y *B. rossi* en caninos de zonas endémicas (Dumont *et al.*, 2015). Aunque ya existen algunos productos en el mercado mexicano, el problema de usar estos controles químicos a largo plazo es el desarrollo de resistencia a acaricidas como las reportadas actualmente en la garrapata *R. sanguineus* s.l. de una zona en el sureste de México (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Debido a esta problemática, la búsqueda de nuevas estrategias de control químicas y no químicas en contra de la garrapata siempre será motivo de nuevas investigaciones (Dantas-Torres, 2008b).

En cuanto a control inmunológico, la creación de vacunas para la generación de inmunidad humoral protectora en caninos solo se ha desarrollado para el control de la infección causada por *B. canis* (Schetters, 2005); contra *B. vogeli* no existe un inmunógeno comercial hasta el momento. La vacuna que se ha utilizado para la prevención de la babesiosis canina en Europa es Pirodog® de Laboratorio Merial. Este inmunógeno está hecho a partir de antígenos solubles de sobrenadante proveniente de cultivo *in vitro* de *B.*

canis (Molinar *et al.*, 1982), combinado con saponina como adyuvante (Moreau *et al.*, 1989; Schetters *et al.*, 1992). Estos antígenos solubles generan una inmunidad humoral en pocos días, sin embargo, no evita la infección y solo logra disminuir los signos clínicos agudos de la enfermedad, evitando la disminución abrupta del volumen celular aglomerado y del desarrollo de esplenomegalia, facilitando la recuperación del canino (Schetters *et al.*, 1994). Debido a que esta vacuna está hecha del cultivo *in vitro* de *B. canis*, la inmunidad generada no responde ante el desafío con otra especie de *Babesia* como lo es *B. rossi* (Schetters *et al.*, 1995). Actualmente existe una vacuna en fase experimental contra *B. canis* utilizando la proteína recombinante del mismo antígeno vacunal ya utilizado, evitando así el uso de sangre y suero de animales vivos (caninos) para la generación del inmunógeno. Este nuevo método tuvo resultados similares en cuanto a protección en comparación con la vacuna hecha de cultivo *in vitro* (Moubri *et al.*, 2018).

Cuadro 5. Fármacos utilizados para evitar la infestación de garrapatas en caninos.

Principio activo	Nombre comercial	Vía de administración	Referencia
Fipronil-Amitraz-(S) methoprene	CERTIFECT™	Tópica	Jongejan <i>et al.</i> , 2011
Imidacloprid/Flumethrina	SERESTO™	Tópica	Fourie <i>et al.</i> , 2013
Afoxolaner	NexGard™	Oral	Beugnet <i>et al.</i> , 2014
Permetrina-Fipronil	Effitix™	Tópica	Navarro <i>et al.</i> , 2015
Permetrina-Fipronil	Frontline Tri- Act/Frontect™	Tópica	Dumont <i>et al.</i> , 2015
Fluralaner	Bravecto™	Oral	Taenzler <i>et al.</i> , 2015
Fluralaner	Bravecto™	Tópico	Taenzler <i>et al.</i> , 2016
Sarolaner	Simparica™	Oral	Geurden <i>et al.</i> , 2017
Lotilaner	Credelio™	Oral	Cavalleri <i>et al.</i> , 2017

2.4 Mecanismo de invasión de *Babesia* al eritrocito

El mecanismo de invasión celular de *Babesia* es muy similar al de otros microorganismos Apicomplexa como *Plasmodium* y *Toxoplasma*; estos utilizan una serie de proteínas posicionadas en el polo apical para lograr la penetración en la célula blanco. Los pasos en los que el parásito *Babesia* logra invadir el eritrocito se han detallado y clasificado de la siguiente manera: 1) Fijación: en este paso el parásito tiene el primer contacto con la célula hospedera y mediante proteínas de superficie como las de la familia MSA (antígenos de superficie de los merozoítos), logra adherirse a la superficie de esta; 2) Reorientación: este proceso involucra el posicionamiento correcto del aparato apical, de tal manera que logre quedar en contacto directo con la superficie de la célula hospedera, lo cual, favorecerá el siguiente paso; 3) Unión estrecha: este paso es considerado el eje central del proceso de invasión debido a que la membrana del parásito y de la célula hospedera entran en contacto mediante la interacción de ciertas proteínas como AMA-1 (antígeno de membrana apical 1), RON-2 (proteína del cuello de las roptrías 2), RAP-1 (proteína asociada a las roptrías 1), TRAP (proteína anónima relacionada con la trombospondina), entre otras, con el citoesqueleto del eritrocito; 4) Invasión: en este paso se logra la entrada del parásito en la célula hospedera y es llevado a cabo gracias a la función de varias proteínas anteriormente mencionadas, pero en esta ocasión se favorece la formación de una vacuola parasitófora, la cual aísla y protege al parásito del ambiente hostil de la célula y permite su supervivencia inicial. 5) Internalización: por último, este paso permite al parásito acoplarse al interior de la célula, pierde la vacuola parasitófora y otras proteínas como las de los cuerpos esféricos (SBPs) se secretan, propiciando el desarrollo y multiplicación del parásito para posteriormente lisar la célula y continuar con el ciclo infeccioso (Yokoyama *et al.*, 2006; Collins y Blackman, 2011; Tyler *et al.*, 2011).

La mayoría de las proteínas involucradas en el mecanismo de invasión de *Babesia* al eritrocito son secretadas por orgánulos presentes en la estructura sub celular del parásito como se muestra en la figura 3. A la fecha, no hay caracterizada ninguna proteína involucrada en el proceso de invasión en *B. vogeli*. Dos de las más importantes y mejor caracterizadas son: el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) y la proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1), que se describen a continuación.

2.5 Antígeno de membrana apical 1 (AMA-1)

Para que un parásito apicomplexa pueda invadir la célula hospedante, es necesario que secreta una serie de proteínas provenientes de sus orgánulos; uno de los pasos más importantes en este mecanismo de invasión es lograr de manera exitosa un anclaje con su membrana y el citoesqueleto de la célula blanco. Una de las proteínas más estudiadas en distintos modelos apicomplexa, cuya función recae específicamente en este anclaje, es el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1), la cual fue descrita por primera vez en *Plasmodium kwolesi* como un antígeno de superficie de merozoíto y donde es considerado y estudiado como un candidato vacunal en este modelo de parásito apicomplexa (Remarque *et al.*, 2008). AMA-1 es una proteína producida por los orgánulos secretores más pequeños presentes en el polo apical del parásito *Babesia*, las micronemas (Gubbels y Duraisingh, 2012).

Esta proteína está constituida por un péptido señal, tres ectodominios ricos en cisteínas, una región transmembranal y una región citoplásmica (Salama *et al.*, 2013). AMA-1 se caracteriza por formar complejos de unión con las proteínas del cuello de las roptrías (RONs), conformando una estructura clave en el proceso de invasión denominado unión en movimiento estrecha (tight move junction, por sus siglas en inglés) de microorganismos apicomplexa, el cual consiste en conectar las proteínas actinas corticales de las dos células, sirviendo como anclaje para que el merozoíto ingrese y forme una vacuola parasitófora (Tyler *et al.*, 2011). Otro dato importante respecto a la función de AMA-1, es que la cola citoplásmica se une con la proteína aldolasa, sirviendo como puente con la F-actina, desencadenando un reordenamiento del citoesqueleto y promoviendo así, la invasión del parásito (Bargieri *et al.*, 2013).

Esta proteína es altamente conservada entre especies de *Babesia* y ha sido objetivo de estudio en el desarrollo de prototipos de vacunas, ya que, se ha demostrado que anticuerpos anti AMA-1 son capaces de bloquear la invasión de merozoítos de *Babesia* a los eritrocitos (Gaffar *et al.*, 2004; Salama *et al.*, 2013; AbouLaila *et al.*, 2019).

En cuanto a diagnóstico de babesiosis, hay información que demuestra que AMA-1 de *B. bovis* contiene ciertos péptidos específicos de especie, capaces de usarse como diagnóstico inmunológico (Barreda *et al.*, 2019).

Hasta el momento no se ha reportado la caracterización de la proteína homóloga AMA-1 en *B. vogeli*.

2.6 Proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1)

Las roptrías son los orgánulos más grandes del complejo apical y almacenan proteínas involucradas en el proceso de invasión de *Babesia* al eritrocito. Las roptrías se dividen en dos compartimentos distintos, el cuello y el bulbo posterior; estos orgánulos secretan una variedad de proteínas, entre las que destacan RAP-1 (proteína asociada a las roptrías 1) y RONs (proteínas del cuello de las roptrías) (Gubbels y Duraisingh, 2012). Una de las funciones más importantes de RAP-1, es la formación de la membrana vacuolar parasitófora, la cual es esencial en la supervivencia del parásito dentro de la célula hospedante (Yokoyama *et al.*, 2006).

En un modelo similar a *B. vogeli*, como lo es *B. bigemina*, se encontró que el gen *rap-1* estaba conformado por una familia de genes multicopia, organizados en tándem, conformados por tres diferentes genes: *rap-1a*, *rap-1b* y *rap-1c* (Suarez *et al.*, 2003). Por otro lado, en *B. bovis* se ha demostrado que la proteína RAP-1 se expresa en esporozoítos y que anticuerpos específicos pueden inhibir el anclaje a los eritrocitos (Mosqueda *et al.*, 2002); asimismo se ha estudiado el efecto inmunoprotector de anticuerpos anti RAP-1 de *B. bovis* en desafíos, demostrando que, pese a generar una respuesta inmunológica de tipo TH1, la inmunidad de bovinos vacunados con RAP-1 recombinante resulta insuficiente para proveer protección ante desafíos con cepas virulentas (Normine *et al.*, 2003).

Respecto al uso de esta proteína como antígeno de diagnóstico, hay evidencia que respalda su aplicación en ensayos de detección de anticuerpos contra *B. bigemina* y *B. caballi* (Kappmeyer *et al.*, 1999; Boonchit *et al.*, 2006). Sin embargo, por ser una proteína conservada entre algunas especies de *Babesia*, la probabilidad de que ocurran reacciones cruzadas entre distintas especies que infectan un mismo hospedante, son factibles.

En cuanto a la caracterización molecular e inmunológica de la proteína RAP-1 en otras especies de *Babesia* que infectan caninos, se encuentra publicada una secuencia putativa de *Babesia canis* (M91168.1) (Dalrymple *et al.*, 1993) y la secuencia homóloga de *Babesia*

gibsoni (DQ386864), la cual corresponde a un gen de 1425 pares de bases (pb) y a una proteína de 474 aminoácidos, con un peso molecular de 52 kDa (Zhou *et al.*, 2007). *Babesia vogeli* actualmente carece de una caracterización inmunológica y molecular de esta proteína.

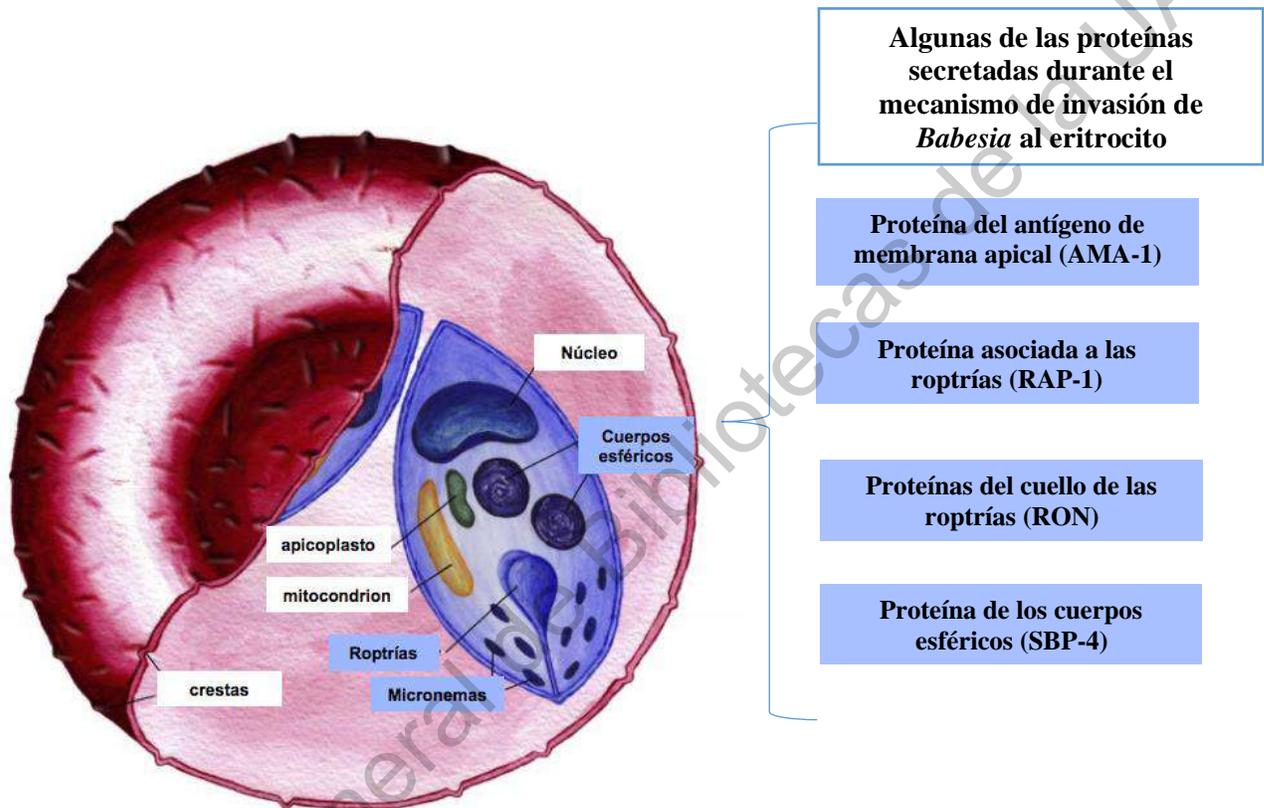


Figura 3. Esquema gráfico de eritrocito infectado por merozoitos de *Babesia* spp. Se observan los orgánulos presentes en la estructura sub celular. En el esquema adyacente se desglosan algunas de las proteínas secretadas durante el mecanismo de invasión al eritrocito por parte de *Babesia* (Modificado de Gohil *et al.*, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

B. vogeli es una especie de piroplasma mundialmente distribuida y es la única que se ha identificado hasta el momento como agente causal de la babesiosis canina en México.

La situación epidemiológica actual de la babesiosis canina en muchos países, incluyendo México, es desconocida y por consiguiente no se ha determinado el impacto económico ni se han implementado medidas de control adecuadas.

Por consiguiente, una de las principales limitantes para el estudio de *B. vogeli* es la falta de herramientas aplicadas al diagnóstico y al escaso conocimiento acerca de los genes que codifican a proteínas antigénicas, candidatos vacunales o de diagnóstico. Por lo que, conocer las secuencias de genes de *B. vogeli* involucrados en el proceso de invasión al eritrocito como *ama-1* y *rap-1*, permitirá caracterizar inmunomolecularmente estas proteínas con el objeto de analizar en un futuro a corto y mediano plazo su uso potencial en estrategias de control y prevención de la babesiosis canina causada por *B. vogeli* en México y otras regiones endémicas de la enfermedad.

IV. HIPÓTESIS

B. vogeli tiene los genes *ama-1* y *rap-1* los cuales expresan a las proteínas AMA-1 y RAP-1 en las fases eritrocíticas.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Identificar los genes *ama-1* y *rap-1* y evaluar la expresión de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli*.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener las secuencias predichas de las proteínas RAP-1 y AMA-1 de *B. vogeli*.
2. Evaluar si *B. vogeli* transcribe los genes *rap-1* y *ama-1*.
3. Obtener anticuerpos contra las proteínas RAP-1 y AMA-1 de *B. vogeli*.
4. Evaluar si *B. vogeli* expresa las proteínas RAP-1 y AMA-1.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico utilizado

El aislado de *B. vogeli* utilizado en esta investigación fue colectado en el municipio de Ciudad Victoria, en el estado de Tamaulipas, y se caracterizó en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Para llevar a cabo una infección experimental se utilizó un canino doméstico de 8 años de edad. Para la generación de anticuerpos contra las proteínas caracterizadas en este trabajo se utilizaron 9 conejos machos de dos meses de edad, raza Nueva Zelanda, los cuales fueron mantenidos en el área de cunicultura (ARCUN) de la Facultad de Ciencias Naturales, campus Amazcala.

Todos los procedimientos de experimentación con animales fueron previamente evaluados y aprobados por el comité de bioética perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el número de aprobación 18FCN2019.

6.2 Cirugía e infección experimental

Para obtener sangre infectada con una mayor parasitemia de *B. vogeli*, se realizó una infección experimental en un canino doméstico de aproximadamente 8 años de edad, mestizo, hembra. La infección experimental se llevó a cabo en la Nave de Infectómica Animal de la Facultad de Ciencias Naturales, del campus Amazcala y la cirugía esplenectomía en el quirófano perteneciente a la licenciatura en medicina veterinaria y zootecnia de la Facultad de Ciencias Naturales, del campus Juriquilla.

La cirugía de esplenectomía se realizó utilizando un protocolo de anestesia fija basado en la administración de clorhidrato de xilacina a dosis de 1 mg/kg vía intramuscular, más tiletamina con zolazepam a dosis de 7 mg/kg, vía endovenosa (Plumb, 2010). La técnica quirúrgica empleada fue hecha con base en el protocolo descrito por Fossum (1999). Quince días después de la esplenectomía, se llevó a cabo la infección experimental. Para esto, se le administraron 5 ml de sangre infectada con *Babesia vogeli* por vía intravenosa (Wang *et al.*, 2018), con un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) del 0.1 %. El progreso de la infección fue monitoreado diariamente verificando la temperatura corporal, volumen celular

aglomerado (método del microhematocrito) y un frotis sanguíneo teñido con colorante Giemsa utilizando sangre extraída de la vena yugular (Furuta *et al.*, 2009).

6.3 Procesamiento de la sangre infectada

Cuando el canino infectado alcanzó el porcentaje de eritrocitos parasitados de 9.0, se procedió a obtener la sangre infectada con *B. vogeli*. La extracción de sangre fue llevada a cabo con previa sedación utilizando tiletamina con zolazepam a la dosis anteriormente especificada. Para el procesamiento de la sangre se utilizó un matraz Erlenmeyer con tubo de desprendimiento de 250 ml; para esto, se le colocó una manguera de hule en la tapa del matraz y otra en el tubo de desprendimiento, posteriormente se le agregaron aproximadamente 25 gramos de cánicas de vidrio para poder desfibrinar la sangre mediante agitación y se selló con papel parafilm y aluminio. En el extremo de la manguera posicionada en la tapa se le incorporó a presión una jeringa de 3 ml con una aguja 20 G × 32mm, después se cubrieron los dos extremos con papel estraza y papel aluminio y se esterilizó en autoclave a 15 Lbs de presión durante 15 minutos. Una vez estéril y frío se le colocó una pinza hemostática en cada extremo de las mangueras. Posteriormente, se procedió a extraer el vacío del matraz mediante una bomba extractora.

Para realizar el sangrado se depiló la zona del cuello para poder visualizar de manera uniforme la vena yugular y se realizó asepsia con alcohol etanol al 70% y una solución de iodopovidona comercial. Después de esto, se procedió a puncionar la vena yugular con la aguja acoplada al matraz con tubo de desprendimiento. Una vez en vena se retiró la pinza hemostática de ese extremo y mediante el vacío la sangre empezó a fluir hacia el interior del matríz. Cuando se terminó de extraer un volumen de aproximadamente 100 ml (< 10% del peso vivo del animal) se volvió a colocar la pinza y se retiró la aguja. Inmediatamente después, se empezó a mover el matríz suave y constantemente en forma oscilatoria durante 20 minutos, hasta la visualización del coágulo de fibrina; ya retraído el coágulo, se almacenó el matraz en hielo y se cubrió de la luz hasta el procesamiento de la sangre en el laboratorio.

Para llevar a cabo el lavado de la sangre se preparó solución Vega y Martínez (VYM) estéril (Vega *et al.*, 1985). El proceso de lavado se inició pasando la sangre del matraz a dos tubos estériles de polipropileno de 50 ml utilizando pipetas estériles de transferencia serológicas de 15 ml. Posteriormente se centrifugaron ambos tubos a 3,500 rpm durante 20

minutos a 4 grados celsius, después se retiró el suero y la capa flogística conformada por glóbulos blancos y plaquetas y se les agregó solución VYM hasta aforar a 45 ml; se repitió la centrifugación con las mismas condiciones antes mencionadas tres veces en total. Al final de los tres lavados, se logró obtener unicamente el paquete globular de eritrocitos infectados con *B. vogeli*. Posteriormente, con los eritrocitos infectados se prepararon frotis de sangre para la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y alicuotas en tubos de 1.5 ml para extracción de ácidos nucleicos. Todo el material biológico se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

6.4 Obtención de las secuencias predichas de RAP-1 y AMA-1 de *B. vogeli*

6.4.1 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de eritrocitos infectados con *B. vogeli* (porcentaje de eritrocitos parasitados del 9%) previamente procesados. El método de extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial Dneasy® Blood & Tissue kit de la empresa Qiagen (Hilden, Alemania) y se realizó de la siguiente forma:

- A) En un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml se agregó 20 µl de proteínasa K, 100 µl de sangre completa y 100 µl de buffer de fosfatos (PBS 1×, pH 7.4).
- B) Después se agregó 200 µl de solución AL y se procedió a mezclar mediante vortex por 5 a 10 segundos e inmediatamente después se pasó a incubar a 56 °C durante 10 minutos.
- C) Posteriormente se adicionaron 20 µl de etanol al 100% y se volvió a mezclar mediante vortex. Toda la mezcla se pasó a una columna Dneasy spin, la cual se colocó previamente en un tubo colector, después se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto y el tubo colector se desechó junto con el líquido sobrante.
- D) Se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se le agregó 500 µl de solución AW1 y se repitió la centrifugación con las mismas condiciones anteriores. Se desecho de nuevo el tubo colector y se posicionó la columna en uno nuevo.

- E) Se continuó agregando 500 µl de solución AW2 y esta vez se procedió a centrifugar a 13,000 rpm durante 3 minutos. Se volvió a descartar el tubo colector y esta vez se colocó un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml nuevo y estéril.
- F) Por último, se adicionó 100 µl de solución AE y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó una última vez a 8,000 rpm durante 1 minuto y lo que se colectó en el tubo de 1.5 ml es el ADN aislado de la muestra.
- G) El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c y se evaluó el índice de pureza mediante la obtención de los valores 260/280 y 260/230. También se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar la integridad. Las muestras de ADN fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

6.4.2 Diseño de iniciadores

Los iniciadores que se utilizaron para amplificar los genes *ama-1* y *rap-1* de *B. vogeli* fueron diseñados con los programas en línea Oligo Analyzer de la compañía IDT (www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) (Owczarzy *et al.*, 2008) y Primer-Blast® del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) (Ye *et al.*, 2012).

Debido a que no se cuenta con el genoma anotado de *B. vogeli* se analizaron las secuencias de nucleótidos del gen *ama-1* de otras especies de *Babesia* ya reportadas en la base de datos Nucleotide del Genbank®, NCBI. Todas las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas mediante el programa bioinformático Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Madeira *et al.*, 2019), esto con el fin de buscar regiones conservadas que pudieran servir como iniciadores para la amplificación parcial del gen *ama-1* de *B. vogeli*. De igual manera, se hizo una exhaustiva revisión de literatura para buscar iniciadores publicados que sirvieran para amplificar un fragmento del gen *ama-1* en organismos genéticamente relacionados con *Babesia* como todos los protozoarios del filo Apicomplexa. En esta búsqueda se encontró un par de iniciadores degenerados que al analizarlos *in silico* mostraba una posible amplificación de 880 pb, correspondiendo a un fragmento del gen *ama-1* de cualquier especie de *Babesia* (Tarigo *et al.*, 2019).

Para el gen *rap-1* de *B. vogeli* se encontraron dos secuencias reportadas en la base de datos Nucleotide del Genbank®, NCBI. Una de estas estaba anotada como gen putativo de *B. canis*, reportada por Dalrymple *et al.* (1993) con clave de acceso M91168.1, la cual sirvió como secuencia molde para el diseño de los iniciadores. Por último, una vez obtenida la secuencia completa o parcial de los genes, se diseñaron un par de iniciadores para cada gen utilizando como secuencia molde una región de nucleótidos interna, evitando tomar secuencias en regiones de intrones, con el fin de realizar una reacción en cadena de la polimerasa a partir de una retrotranscripción (RT-PCR, por sus siglas en inglés).

Para el diseño en general de los iniciadores se consideraron las especificaciones necesarias como el tamaño ideal de 16 a 28 nucleótidos, contenido de entre 40 y 60% de C/Gs, una temperatura de entre 50 °C a 62 °C, así como, que no formaran horquillas, homodímeros y heterodímeros por complementariedad (Chuang *et al.*, 2013). Los iniciadores diseñados se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos, México) y a la empresa ADN sintético SAPI de CV (Irapuato, Guanajuato, México). Las secuencias de los iniciadores utilizados en este trabajo se describen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Iniciadores diseñados para la amplificación de los genes *ama-1* y *rap-1*.

Gen	Secuencia de iniciadores	Tamaño de amplicón	Referencia
<i>ama-1</i>	Fw 5'-ATGGCNAARTTYGAYATHGC-3'	880 pb	Tarigo <i>et al.</i> , 2019
	Rv 5'-GCCARTTDATNCCNACNCC-3'		
	Fw-RT 5'-CTCCAGAGGCAGAACTCGTC-3'	314 pb	Este trabajo
	Rv-RT 5'-TGTCGCTCTTCAGTGGTCTC-3'		
<i>rap-1</i>	Fwrap1 5'-GAAGCGGGTGAAAAGCATTGT-3'	1997 pb	Este trabajo
	Rvrap1 5'-GTGCCACGAAGCCTTGTATG-3'		
	F-RT 5'-GACCTTGTCTACCCTTCTTAACG-3'	632 pb	Este trabajo
	R-RT 5'-CGTTGTACTIONCCNAAGTCTTC-3'		

6.4.3 Amplificación de los genes *rap-1* y *ama-1* de *B. vogeli*

Utilizando el ADN extraído de eritrocitos infectados con *B. vogeli* se realizó una reacción en cadena de la polimerasa punto final (*PCR*, por sus siglas en inglés) para la amplificación de los genes *ama-1* y *rap-1*. Este procedimiento se llevó a cabo en un termociclador modelo T100™ marca Bio-rad.

La reacción se estandarizó en un volumen final de 12.5 µl, utilizando 6.25 µl del master mix 2× (Promega®, Madison, USA), 10 µM de cada iniciador a una concentración final de 0.4 µM, 50 – 100 ng de ADN y cuanto baste de agua grado biología molecular. Los parámetros de termociclado utilizados para la amplificación de un amplicón de 1997 pb correspondiente al gen *rap-1* de *B. vogeli* fueron: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, después 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 52 °C, 1:45 minutos a 72 °C y por último una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Para la amplificación parcial del gen *ama-1* de *B. vogeli* se utilizaron los iniciadores publicados por Tarigo *et al.* (2019), para esto, se preparó la reacción a un volumen final como se describió anteriormente y se utilizó un protocolo de termociclado con ciertas modificaciones; estos parámetros fueron una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C, después 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 56 °C, 1:30 min a 72 °C y por último una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

6.4.4 Clonación, transformación de células competentes y secuenciación

Los productos de PCR obtenidos en las amplificaciones del gen *rap-1* y *ama-1* de *B. vogeli* se procedieron a purificar mediante el kit comercial Molecular Biology, EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Southern Labware®, Cumming, Georgia, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez purificados los amplicones, para el caso particular del fragmento del gen *ama-1* de *B. vogeli* se procedió a enviarlo a secuenciación por el método de Sanger al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos, México) utilizando el producto de la purificación del amplicón. En el caso del gen *rap-1*, se llevó a cabo una clonación y transformación en células competentes, utilizando un vector comercial 2.1 PCR TOPO TA, Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y la cepa *E. coli* TOP10. Este proceso se llevó a cabo agregando el producto de la purificación en una relación inserto/vector 3:1; con base en las indicaciones de la página biomath de la empresa Promega® (<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>). Después de calcular la relación inserto vector, se procedió a realizar la clonación, siguiendo las indicaciones sugeridas en el manual del producto: brevemente, en un microtubo de 0.2 ml se añadió 1 µl de sales, 1 µl del vector 2.1 PCR TOPO TA Cloning, la cantidad necesaria del producto de la purificación (relación 3:1) y agua libre de nucleasas para aforar a un volumen final de 6 µl. La mezcla se agitó suavemente y se incubó en el termociclador a 23 °C por 30 min.

Posteriormente, se continuó con la transformación bacteriana. Se tomaron 2 viales de 50 µl de células competentes y se colocaron en hielo por 30 min, después de este tiempo se agregaron 3 µl del producto de clonación a cada uno de los viales. Posteriormente se realizó un choque térmico de temperatura poniendo los tubos a 42 °C durante 30 s y de inmediato se pasó a hielo por 5 min. Una vez terminado el choque térmico se colocaron 250 µl de medio SOC (2% de triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM de glucosa) y se incubó a 37 °C durante 1 hr con agitación a 200 rpm. Una vez terminado el tiempo de incubación, se colocaron 100 µl de este cultivo en cajas petri con medio LB (Lurian Berthani) sólido, adicionado con 100 µg/ml de ampicilina; el cultivo

se esparció de manera uniforme con un asa bacteriológica estéril y se puso a incubar a 37 °C durante 12 hr. Pasando las 12 hr de incubación se tomaron aleatoriamente 8 colonias bacterianas crecidas en el medio y con un palillo de madera estéril se tomó una pequeña muestra y se procedió a determinar la presencia del inserto en las bacterias mediante una reacción en cadena de la polimerasa de colonia (PCR Colony). Una vez confirmada la presencia de la secuencia de interés. Una vez confirmada la presencia de la secuencia de interés, se realizó una expansión de estas colonias bacterianas, en 5 ml de caldo LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina. Estos cultivos se pusieron a incubar a 37 °C durante 16 hrs con una agitación promedio de 250 rpm utilizando una incubadora con agitación (Modelo MAXQ4450, Thermo Scientific). Al día siguiente, se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el kit comercial ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Para la secuenciación del gen *ama-1* se utilizaron los iniciadores específicos. Para el gen *rap-1* se utilizaron los iniciadores universales con sitios de hibridación en la secuencia del vector M13 y T7 reverse y un iniciador interno diseñado para obtener una secuencia que se sobrelapara a las otras dos derivadas de los iniciadores universales. Por último, se enviaron a secuenciar los amplicones en ambas direcciones utilizando de 300 a 500 ng de ADN plasmídico purificado de 2 clonas diferentes, mediante el método de Sanger, al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos, México). Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el programa Clustal Omega (Madeira *et al.*, 2019).

6.4.5 Análisis de las secuencias obtenidas

Se analizó la presencia de un marco de lectura abierto mediante el programa ORF Finder de la plataforma del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) (Rombel *et al.*, 2002). Para la detección del número de intrones y exones se utilizó el programa GENSCAN online tool (<http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html>) (Burge y Karlin, 1997). La secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos mediante el programa Translate de la plataforma ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). Se realizó un análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos obtenidas mediante

la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

Para evaluar la estructura secundaria de las proteínas se les realizó una serie de análisis bioinformáticos que se describen a continuación. Para predecir regiones hidrofóbicas se utilizó el programa Protscale (<https://web.expasy.org/protscale/>) (Gasteiger *et al.*, 2005), el péptido señal fue determinado mediante SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Almagro *et al.*, 2019), las regiones transmembranales fueron identificadas utilizando el TMHMM Sever v.2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) (Krogh *et al.*, 2001) y los dominios de las proteínas fueron identificados por el programa Pfam (pfam.xfam.org/) (Finn *et al.*, 2014). Se diseñaron dos péptidos de cada proteína con probabilidad de ser epítipo B, descartando las regiones del péptido señal, dominios hidrofóbicos, transmembranales e intracelulares. Para identificar los epítipos B se utilizaron los programas ABCpred (crdd.osdd.net/raghava/abcpred/) (Saha y Raghava, 2006), BCpred (crdd.osdd.net/raghava/bcpred/) (Saha y Raghava, 2004) y IEDB (www.iedb.org/) (Zhang *et al.*, 2008). Se seleccionaron los péptidos con base en los puntajes más altos presentados en los tres algoritmos. Por último, las secuencias péptidicas fueron analizadas mediante la herramienta bioinformática BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para confirmar que no tuvieran regiones altamente conservadas con otras secuencias de microorganismos similares o que estuviesen presentes en las proteínas de los caninos.

6.5 Análisis de la transcripción de los genes *rap-1* y *ama-1* de *B. vogeli*

6.5.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de eritrocitos infectados con el aislado de *B. vogeli* anteriormente descrito; para esto se utilizó la metodología de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), con el fin de evaluar la expresión de ambos genes caracterizados en fases intraeritrocíticas. A continuación se detalla la metodología.

- A) La muestra de eritrocitos infectados preservado en Trizol se descongeló gradualmente en hielo, con el fin de que no sufriera un cambio radical de temperatura. Después se le realizó agitación con vortex y una vez descongelada la muestra, se extrajo 1 ml de esta y se agregó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril; posteriormente se le adicionaron 200 μ l de cloroformo y se volvió a agitar mediante vortex.
- B) Después de este primer paso se deja reposar la muestra durante 3 minutos a temperatura de cuarto (25 $^{\circ}$ C promedio).
- C) Posteriormente se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4 $^{\circ}$ C. Una vez terminado esto, el sobrenadante se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo y estéril. Después se le agregaron 100 μ l de cloroformo (aproximadamente una quinta parte del volumen resultante).
- D) La muestra se volvió a agitar mediante vortex y se le dejó reposar durante 3 minutos a temperatura de cuarto; posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4 $^{\circ}$ C.
- E) Concluido el paso anterior, se pasa el sobrenadante en un tubo nuevo con mucho cuidado de no remover el sedimento. Después se añadieron 500 μ l de isopropanol frío (aproximadamente lo equivalente a un volumen).
- F) Se agitó por inversión 10 veces, se dejó incubar a temperatura de cuarto durante 10 minutos y se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm a 4 $^{\circ}$ C.
- G) En este momento se prepararon 20 ml de etanol grado biología molecular al 75% (15 ml de etanol y 5 ml de agua grado biología molecular).
- H) Se desechó muy cuidadosamente por inmersión el sobrenadante, quedando en el tubo la pequeña masa de ARN extraído. Posteriormente se añadió 1 ml de etanol al 75% y se vortexeó hasta despegar la masa.
- I) Se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 $^{\circ}$ C; se repitieron el paso H y el I dos veces más concluyendo así los lavados con etanol.
- J) Consecuentemente se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pequeña masa resultante, hasta que el tubo estuvo completamente seco.
- K) Por último, se rehidrató con 15 μ l de agua grado biología molecular. Se dio vortex y se almacenó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

L) Para corroborar que se había extraído ARN total, se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el equipo Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c a una longitud de onda de 260 nm.

6.5.2 RT-PCR

Para evaluar si los genes *rap-1* y *ama-1* de *B. vogeli* se transcriben se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa punto final a partir de ADN complementario obtenido de una retrotranscripción (RT-PCR punto final).

La retrotranscripción fue realizada mediante un kit comercial SuperScript® III (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) utilizando 1µg de ARN total y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez terminada la retrotranscripción se procedió a realizar una PCR punto final utilizando el ADN complementario generado. Los componentes de esta PCR fueron calculados para un volumen final de 12.5 µl, constituidos por 10 µM de cada primer interno específico para el gen *rap-1* o *ama-1* (cuadro 6), 1.25 µl de ADNc, 6.25 µl de PCR Master Mix 2× Bioline (Meridian Bioscience, London, UK) y 4 µl de agua grado biología molecular. Como control negativo se utilizó ARN total tratado con buffer de ADNasa y sin procesarlo con enzima retrotranscriptasa. Las condiciones de termociclado para el gen *rap-1* fueron las siguientes; una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y un paso de extensión final de 72 °C por 3 min, para obtener al final un amplicón de aproximadamente 600 pb. Para el gen *ama-1* las condiciones de termociclado fueron las siguientes; una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95° C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 20 s y un paso final de 72 °C por 2 min, para obtener al final un amplicón de aproximadamente 314 pb.

6.6 Obtención de anticuerpos contra las proteínas RAP-1 y AMA-1 de *B. vogeli*

6.6.1 Síntesis de péptidos

Con base en los análisis bioinformáticos anteriormente descritos, se seleccionaron dos péptidos por proteína y se mandaron a sintetizar químicamente a la empresa PEPTIDE2 (Chantilly, Virginia, USA) en un sistema de dendrímeros de 8 ramas. (MAPS-8).

6.6.2 Inmunizaciones

Para la generación de anticuerpos contra las proteínas AMA-1 Y RAP-1 se inmunizaron conejos de dos meses de edad, raza Nueva Zelanda con cada péptido seleccionado (MAPS-8). Las inmunizaciones se llevaron a cabo en el área de cunicultura ubicada en la Facultad de Ciencias Naturales, Campus Amazcala, de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se utilizaron dos conejos por cada péptido y un conejo como control negativo. Estos conejos fueron mantenidos en jaulas individuales con alimento comercial y agua *ad libitum*. La dosis en la que se preparó el antígeno con la que se inmunizó cada conejo fue administrada en un volumen final de 1 ml; esta contenía 100 µg de péptido diluido en 300 µl de PBS 1× estéril, pH 7.4 y 700 µl de adyuvante Montanide ISA 71VG (Seppic®, Francia). Para inmunizar al conejo control negativo se utilizó únicamente 700 µl de adyuvante y 300 µl de PBS 1× estéril, pH 7.4. Las inmunizaciones se realizaron con una jeringa hipodérmica de 3 ml con aguja de calibre 22, administrando la mitad de la dosis en un sitio cercano al linfonodo subescapular y la otra mitad cerca del linfonodo poplíteo, vía subcutánea. El calendario de vacunación dio inicio con la primera inmunización (día 0), en donde además se obtuvo suero pre – inmunización y posteriormente se aplicaron tres refuerzos cada veinti y un días, para terminar con cuatro inmunizaciones en total (día 0, 21, 42, 63); quince día posteriores (día 78) a la última inmunización se realizó el sacrificio de los animales y la obtención de los sueros hiper inmunes (figura 5) (Valdez-Espinosa, 2015; Mosqueda *et al.*, 2019).

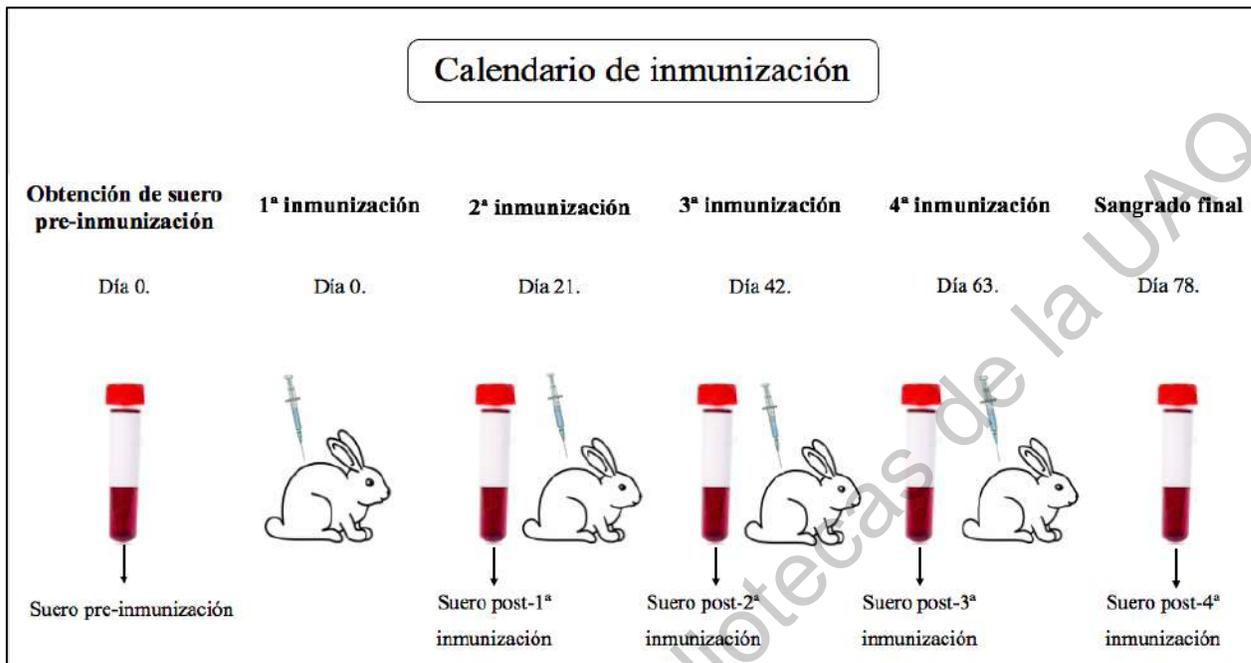


Figura 4. Calendario de vacunación utilizado para la generación de anticuerpos contra las proteínas RAP-1 y AMA-1 de *B. vogeli*.

6.6.3 Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta

Para determinar el incremento de anticuerpos en los conejos inmunizados se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de tipo indirecta. Se utilizó el protocolo descrito por Hernández-Silva *et al.*, (2018) con ciertas modificaciones. A continuación se desglosa el procedimiento.

- A) Se sensibilizaron placas de 96 pozos de poliestireno de alta unión de la marca Costar® (Corning Incorporated, No. Cat. 3590), con un volumen final de 100 µl a una concentración de 4 µg/ml de cada péptido a analizar diluido en buffer de carbonatos pH 9.6 y se dejó durante toda la noche a 4 °C.
- B) Al día siguiente se retiró el buffer de carbonatos y se procedió a lavar la placa aplicando 200 µl de PBS Tween al 0.05%, pH 7.4. El lavado se repitió tres veces, aplicando pequeños movimientos oscilatorios a la placa, para después de 1 min decantar el buffer de lavado.

- C) Después de haber realizado el primer lavado, se continuó con el bloqueo de la placa, para lo cual se agregaron 200 μ l de leche descremada al 5% diluida en PBS Tween 0.05% y se dejó incubando a 37 °C durante 1 hr.
- D) En este paso se prepararon las diluciones del anticuerpo primario, es decir, el suero pre inmunización y todos los sueros post inmunización de los conejos inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos.
- E) Al terminar el tiempo de incubación del bloqueo, se procedió a repetir el lavado, como se describió anteriormente.
- F) Ya lavadas y escurridas las placas, se inició con la incubación del anticuerpo primario, colocando por cada conejo 100 μ l de suero pre inmunización y todos los sueros post inmunización por triplicado; se pasó a incubar 37 °C durante 1 hr y al término de este tiempo, se volvió a lavar con PBS Tween 0.05%.
- G) Después, se incubaron 100 μ l del anticuerpo secundario diluido en leche al 2% en 1:3,500, durante 45 minutos; el anticuerpo secundario consistió en un Anti Ig G H+L de Conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Una vez terminada esta incubación se repitieron los lavados, ahora solo incrementándose a cuatro.
- H) Se preparó la solución de revelado; esta se conformó de citrato de sodio al 0.1 M y ácido cítrico al 0.1 M, en un volumen de 5 ml cada uno, posteriormente se le agregaron 4 mg de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) y 8 μ l de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos volúmenes son los correspondientes para el revelado de una placa.
- I) Para revelar, se agregaron 100 μ l de solución de revelado por pozo, sin agregar solución de paro y se tomó lectura a los 20 minutos a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se evaluaron y graficaron utilizando el software GraphPad Prism® versión 8.4.2 (464).

6.7 Análisis de expresión de las proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta

Para llevar a cabo la localización subcelular se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando láminas con eritrocitos infectados con *B. vogeli* y los sueros hiper inmunes obtenidos de los conejos inmunizados con los péptidos sintéticos. Esto con el fin de demostrar que anticuerpos anti AMA-1 y anti RAP-1 de *B. vogeli* son capaces de reconocer la proteína nativa presente en el parásito. Se utilizó el procedimiento descrito en Mosqueda *et al.* (2019), con algunas modificaciones.

A continuación se describe el método de inmunofluorescencia indirecta utilizado.

- a) Se extrajeron las láminas del congelador y se pusieron a secar por 30 min en la cabina de flujo laminar.
- b) Una vez secas, se pusieron a fijar en una solución con 90% acetona y 10% metanol por 30 minutos; la solución fijadora se colocó en congelación 24 h antes.
- c) Después de terminar el tiempo de fijación, se dejó secar y se procedió a realizarle sobre la lámina el número de círculos necesarios utilizando esmalte oscuro. Los círculos se hicieron con un diámetro entre 1 a 1.5 cm.
- d) Posteriormente se diluyen los sueros a analizar en solución PBS Tween al 1%. Para este experimento se utilizó la dilución 1:40 para el anticuerpo primario y 1:150 para el anticuerpo secundario, el cual correspondía a un anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Flour™ 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA).
- e) Se colocó el anticuerpo primario (sueros pre y post inmunización) en los pozos hechos con esmalte y se incubó durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. En cada lámina se colocó un control negativo de reacción (solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.4)).
- f) Ya terminada la primera incubación, se colocaron las láminas en cajas Coplin de vidrio y se dieron tres lavados con PBS Tween al 1% con agitación leve y un lavado final con pura agua destilada. Cada lavado contó con un tiempo de 5 min.

- g) Se repitió el secado de las láminas y se continuó con la incubación del anticuerpo secundario durante 30 minutos a 37 °C, procurando tapar las cámaras húmedas con papel aluminio.
- h) Se repitieron los 4 lavados como se describió anteriormente y se volvieron a secar las láminas.
- i) Por último, se montaron con glicerina fosfatada (solución conformada por 50% de glicerol y 50% de PBS 1×) y se procedió a observar en el microscopio de epifluorescencia a aumento de 1000×.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

7 RESULTADOS

7.1 Amplificación de los genes *ama-1* y *rap-1* de *B. vogeli*

Mediante la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final y la utilización de ADN genómico de *B. vogeli* extraído de eritrocitos de perro infectados, se logró la amplificación de un fragmento parcial de aproximadamente 880 pb correspondiente al gen *ama-1* (Figura 6).

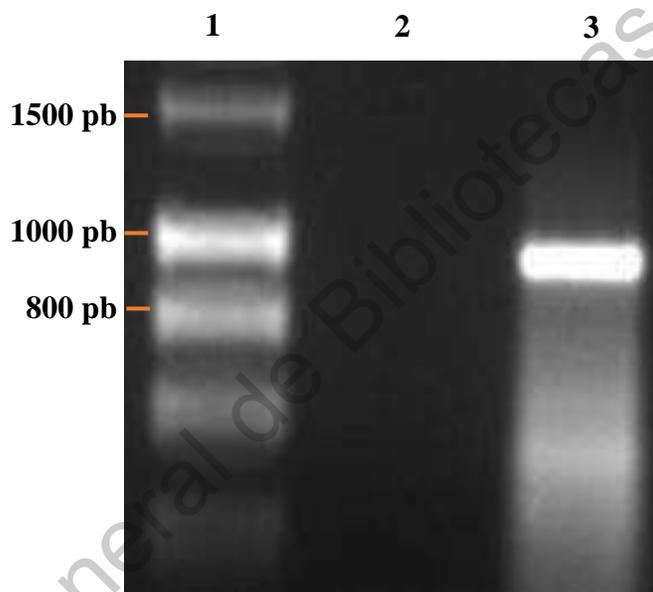


Figura 5. Amplificación parcial del gen *ama-1* de *B. vogeli*. La reacción en cadena de la polimerasa se visualizó en un gel de agarosa al 1%, utilizando “red” gel. Carril 1: Marcador de talla molecular 1 kbp. Carril 2: Control negativo. Carril 3: ADN genómico de *B. vogeli*. La amplificación corresponde al tamaño de pares de bases aproximado de 880 pb.

Para el caso del gen *rap-1* de *B. vogeli*, se obtuvo un amplicón de 1997 pb, el cual corresponde al tamaño del gen de acuerdo al diseño de los iniciadores (Figura 6).

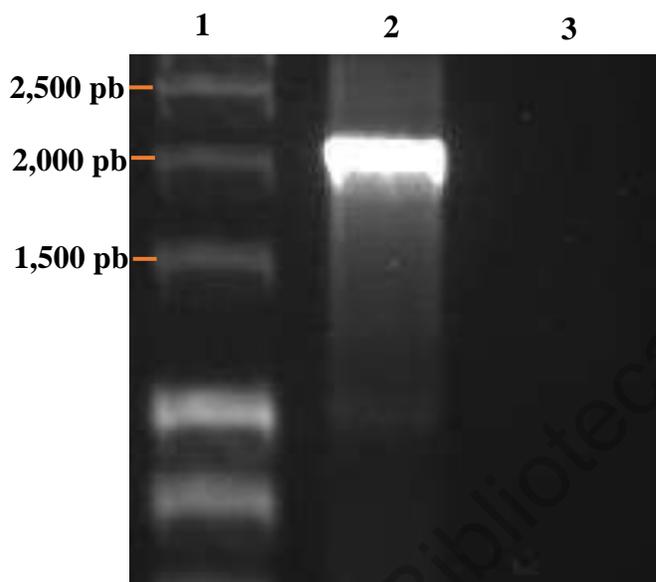


Figura 6. Amplificación del gen *rap-1* de *B. vogeli*. La reacción en cadena de la polimerasa se visualizó en un gel de agarosa al 1%, utilizando “red” gel. Carril 1: Marcador de talla molecular 1 kbp. Carril 2: ADN genómico de *B. vogeli*. Carril 3: Control negativo. La amplificación corresponde al tamaño de pares de bases aproximado de 1997 pb.

7.2 Clonación de los amplicones y transformación en células competentes

El amplicón de 1997 pares de bases correspondiente al gen *rap-1* de *B. vogeli*, fue clonado en un vector 2.1 PCR TOPO TA Cloning y transformado en células competentes *E. coli* Top10. A continuación, se analizó el producto de PCR de colonia hecho para determinar la presencia del inserto en el ADN plasmídico bacteriano.

Se logró comprobar que en cinco de ocho colonias analizadas se encontraba el inserto. Esta reacción se realizó con iniciadores específicos del gen *rap-1* de *B. vogeli*, y el tamaño del fragmento amplificado fue de aproximadamente 1997 pb (Figura 7). Asimismo, se agregó a la reacción un control positivo (ADN genómico *B. vogeli*) y un control negativo (agua libre de nucleasas).

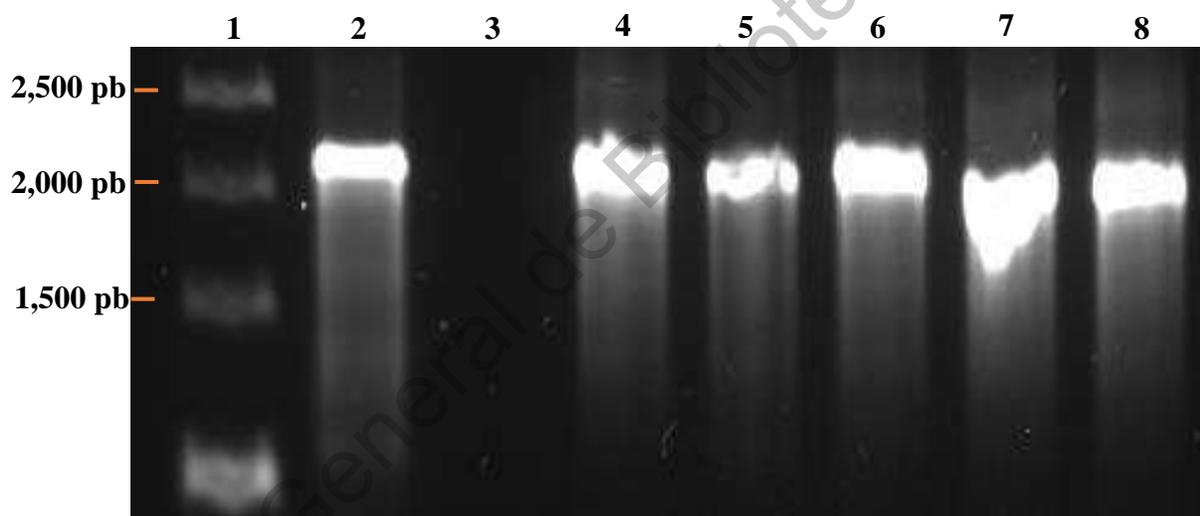


Figura 7. Amplificación del gen *rap-1* de *B. vogeli* mediante un PCR de colonia. Se logró obtener 5 clonas de *E. coli* Top 10 con el inserto esperado; comprobando que la clonación y transformación del gen *rap-1* de *B. vogeli* fue hecha de manera exitosa. Carril 1: Marcador de talla molecular 1 kbp. Carril 2: Control positivo (ADN genómico *B. vogeli*). Carril 3: Control negativo (agua libre de nucleasas). Carril 4-8: Colonias bacterianas analizadas. La amplificación corresponde al tamaño de pares de bases aproximado de 1997 pb.

7.3 Secuenciación y análisis de las secuencias nucleotídicas

7.3.1 Gen *ama-1*

En este caso en particular se envió a secuenciar directamente el producto de PCR purificado, utilizando los iniciadores especificados en el cuadro 6. El fragmento del gen *ama-1* de *B. vogeli* que obtuvimos fue de 407 pares de bases (la secuencia en formato FASTA se muestra en el anexo 1). Al analizar la secuencia para buscar intrones, los resultados fueron negativos, lo que sugiere que el fragmento obtenido es un exón. Por último, al realizar una búsqueda de marcos de lectura abiertos, se encontró uno en el ORF 2; sin embargo, no fue posible obtener la secuencia desde el codón de inicio. El análisis BLAST de la secuencia nucleotídica del gen *ama-1* de *B. vogeli* se desglosa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Análisis BLAST de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a AMA-1 de *B. vogeli*.

Secuencias homólogas	Nucleótidos	Aminoácidos
	Identidad (%)	Identidad (%)
<i>B. gibsoni</i>	89	69.57
<i>B. divergens</i>	89	74.47
<i>B. bovis</i>	78	69.05
<i>B. bigemina</i>	70	74.47
<i>B. ovata</i>	70	70.21

7.3.2 Gen *rap-1*

Para el gen *rap-1* se obtuvieron dos pares de secuencias en ambas direcciones, provenientes de dos clonas positivas al inserto de interés. Las secuencias obtenidas se utilizaron para obtener la secuencia completa del gen. No se encontraron regiones predichas como intrones. Se encontró un marco de lectura abierto en el ORF 2, con un total de 1,335 pares de bases (la secuencia en formato FASTA se muestra en el anexo 1). El análisis BLAST de la secuencia del gen *rap-1* se desglosa en el cuadro 8.

Cuadro 8. Análisis BLAST de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a RAP-1 de *B. vogeli*.

Secuencias homóloga	Nucleótidos	Aminoácidos
	Identidad (%)	Identidad (%)
<i>B. canis</i>	99.55	96.93
<i>B. divergens</i>	75.79	43.60
<i>B. sp. Xinjiang</i>	73.78	41.30
<i>B. caballi</i>	73.26	41.98
<i>B. gibsoni</i>	66.17	37.50

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia fue llevado a cabo con la herramienta bioinformática ProtScale y nos mostró no tener regiones hidrofóbicas, con base en la escala Kyte & Doolittle (las regiones hidrofóbicas tienen un valor superior a 1.5) como se muestra en la figura 9.

Mediante el programa TMHMM Server v.2.0 se realizó la predicción de hélices transmembranales en la secuencia parcial de aminoácidos de AMA-1; como se muestra en la figura 10, no se encontró ninguna región de la proteína con estas características, indicando que la secuencia que logramos obtener únicamente forma parte de los dominios extracelulares de la proteína AMA-1 (línea color rosa). El dominio transmembranal ubicado cerca de la región C-terminal de AMA-1, es un dominio conservado entre organismos Apicomplexa, sin embargo, no fue obtenido y analizado en *B. vogeli*, debido a que el fragmento de la proteína que obtuvimos corresponde al ectodominio 1, cerca de la región N-terminal.

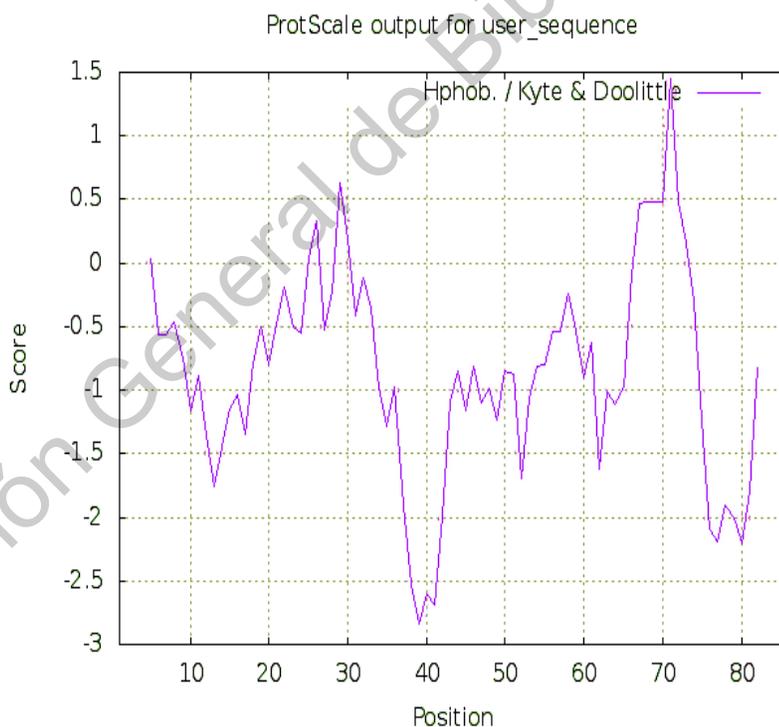


Figura 9. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína AMA-1 de *B. vogeli* con el programa ProtScale del servidor Expasy.

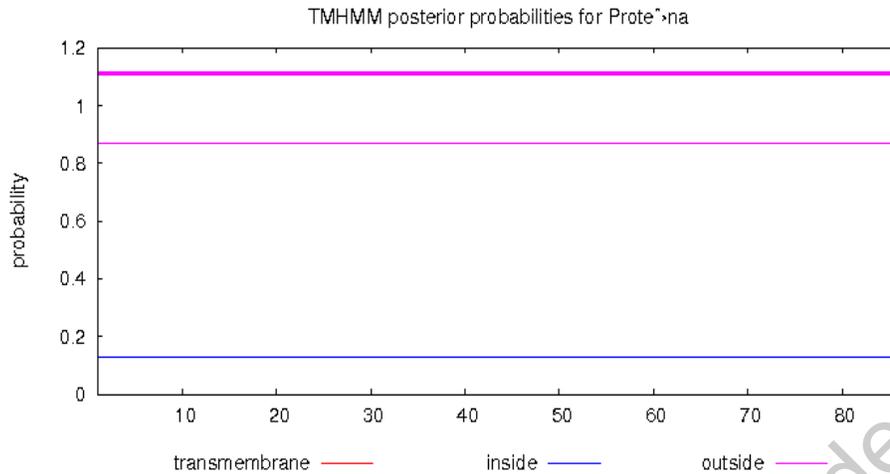


Figura 10. Análisis bioinformático de predicción de hélices transmembranales en la proteína AMA-1 con el programa TMHMM Server v.2.0.

Utilizando el programa SignalP 5.0 no se identificó ninguna región correspondiente a un péptido señal en la secuencia parcial de la proteína AMA-1, como se muestra en la figura 13.

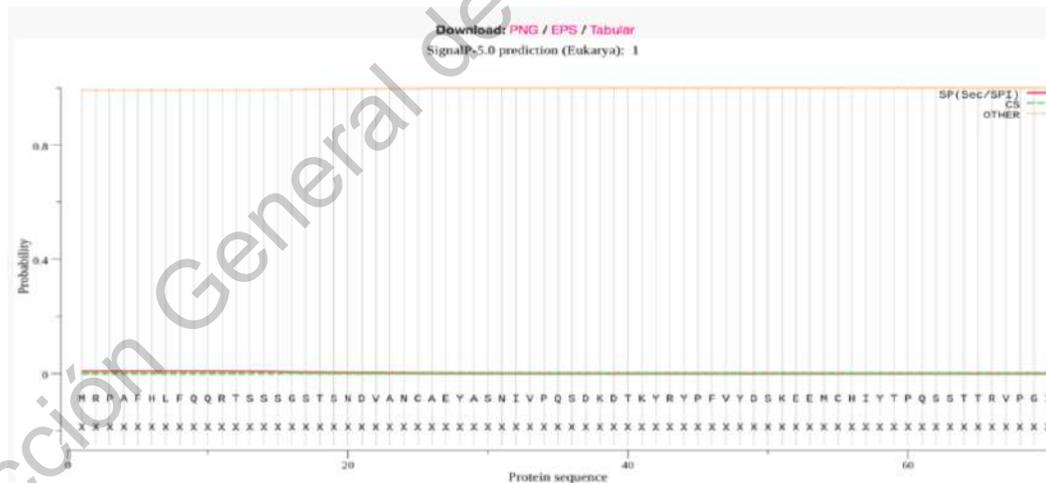


Figura 11. Análisis de la predicción de péptido señal en la proteína AMA-1 con el programa SignalP 5.0.

En la búsqueda de dominios funcionales mediante el programa Pfam, se encontró que la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína AMA-1 pertenece a la familia de las proteínas de antígeno apical de membrana de organismos *Babesia*, la cual corresponde al ectodominio 1 de la proteína (figura 12).

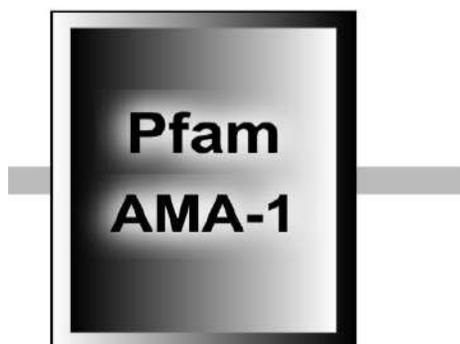


Figura 12. Análisis de dominios funcionales en la proteína AMA-1 mediante el programa Pfam. Se observa en el recuadro gris el fragmento de la proteína AMA-1 de *B. vogeli*.

7.4.2 Proteína RAP-1

La secuencia de aminoácidos predicha correspondiente a la proteína RAP-1 de *B. vogeli* fue de 444 aminoácidos (la secuencia en formato FASTA se muestran en el anexo 1) y un peso molecular predicho de 50.95 kDa.

Los resultados del análisis BLAST se desglosan en el cuadro 8. Se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RAP-1 de *B. vogeli* obtenida aquí, con la secuencia putativa homóloga de *Babesia canis* utilizando el programa Clustal Omega (figura 13). Se encontró que la secuencia obtenida de RAP-1 mostraba una ausencia de 12 aminoácidos, comparada con la secuencia publicada de RAP-1 de *B. canis*. Esta delección se ubicó cerca de la región C-terminal de la proteína, en una zona rica en repetidos en tándem.

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia fue llevado a cabo con la herramienta bioinformática ProtScale y nos mostró no tener regiones hidrofóbicas, con base en la escala Kyte & Doolittle (valor superior a 1.5) como se muestra en la figura 14.

raplmex	MRLVKQAIGTLVLAFTTSAPAYKVPFGGILSKSDGAEKTLSTLLNVDASTRAALEGYRM	60
raplaust	MRLVKQAIGTLVLAFTTSAPAYKVPFGGILSKSDGAEKTLSTLLNVDASTRAALEGYRM	60

raplmex	NAAMANFNSNGRREEVVEAVCGNIAEETECQKSVAEYVESCVRDYDCFSIENQKYPQEKEYQ	120
raplaust	NAAMANFNSNGRREEVVEAVCGNIAEETECQKSVAEYVESCVRDYDCFSIENQKYPQEKEYQ	120

raplmex	PLTLPNPYQLEAAPYVFRNSESNPIKNPTEAFWMRFRHGGRYGAYHNFLVNILYKNLSDS	180
raplaust	PLTLPNPYQLEAAPYVFRNSESNPIKNPTEAFWMRFRHGGRYGAYHNFLVNILYKNLSDS	180

raplmex	MVDDNLEGFVRKYAYMATMYKTYTALDVVNARIINKIAFSRHLFGRQIRNALTNIIRSN	240
raplaust	MVDDNLEGFVRKYAYMATMYKTYTALDVVNARIINKIAFSRHLFGRQIRNALTNIIRSN	240

raplmex	IPEDFGKYNVDRLRHVMGGYEEYMKQVPSLPNFAKKYAGMVVKSLIKNVGAYQKQPWFK	300
raplaust	IPEDFGKYNVDRLRHVMGGYEEYMKQVPSLPNFAKKYAGMVVKSLIKNVGAYQKQPWFK	300

raplmex	KLNNQIRNFFVVKIHEPTKEFFVVKIHEPTKEFFVVK-----IHEPTKEFFVN	348
raplaust	KLNNQIRNFFVVKIHEPTKEFFVVKIHEPTKEFFVVKIHEPTKEFFVVKIHEPTKEFFVN	360

raplmex	KLHEPTKEFFVVKLHEPTKEFFSNMVPGAFQKISEKAGRHLRSSKTVVPEDEPSSSLENE	408
raplaust	KLHEPTKEFFVVKLHEPTKEFFSNMVPGAFQKISEKAGRHLRSSKTVVPEDEPSSSLENE	420

raplmex	AVEDGQLTMGDVTFEMATPTYEQGSQESLNEVGNE	444
raplaust	AVEDGQLTMGDVTFEMATPTYEQGSQESLNEVGNE	456

Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de RAP-1 de *B. vogeli*. La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia homóloga putativa reportada para la proteína RAP-1 de *B. canis* mostrando que está conservada entre estos diferentes aislados (se observa en asteriscos los aminoácidos conservados en ambas secuencias).

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia fue llevado a cabo con la herramienta bioinformática ProtScale y mostró no tener regiones hidrofóbicas, con base en la escala Kyte & Doolittle (las regiones hidrofóbicas tienen un valor superior a 1.5) (Figura 14).

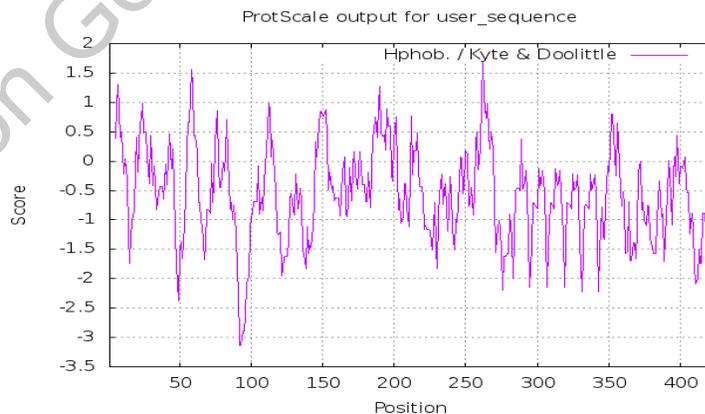


Figura 14. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína RAP-1 de *B. vogeli* con el programa ProtScale del servidor ExPASy.

Mediante el programa TMHMM Server v.2.0 se realizó la predicción de hélices transmembranales en la secuencia de aminoácidos de RAP-1. Como se muestra en la Figura 15, no se encontró ninguna región de la proteína con estas características, indicando que la proteína no tiene regiones transmembranales (línea color rosa superior); esto concuerda con la estructura de otras proteínas RAP-1 de *Babesia*, demostrando que es una proteína que se secreta al medio extracelular.

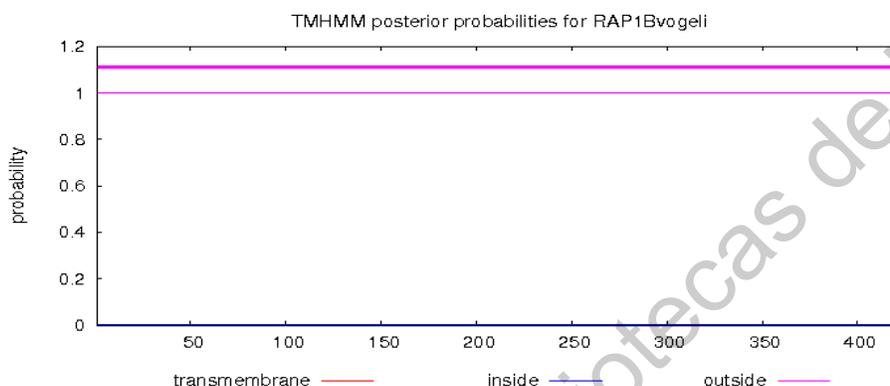


Figura 15. Análisis bioinformático de predicción de hélices transmembranales en la proteína RAP-1 con el programa TMHMM Server v.2.0.

Utilizando el programa SignalP 5.0 se identificó un péptido señal en la proteína RAP-1 conformado del aminoácido 1 al 21 (sitio de corte: línea verde), como se muestra en la Figura 16.

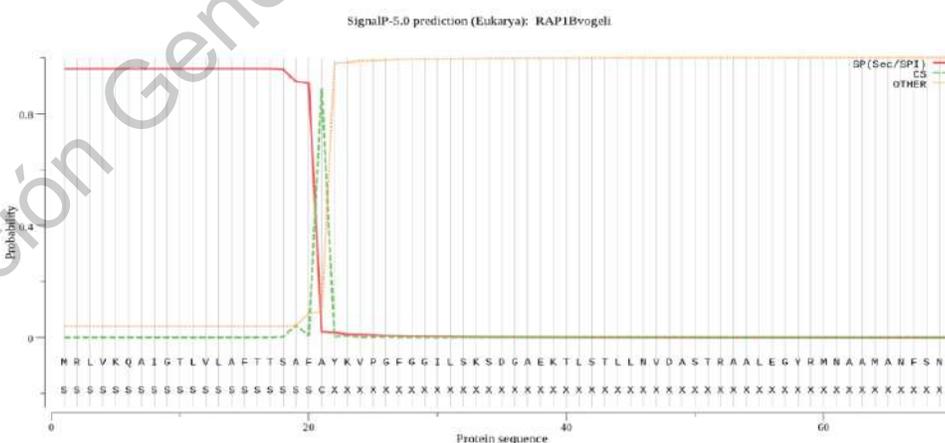


Figura 16. Análisis de la predicción de péptido señal en la proteína RAP-1 con el programa SignalP 5.0.

En el análisis de dominios funcionales, los resultados indicaron que la secuencia de aminoácidos de la proteína predicha obtenida en este trabajo, pertenece a la familia de las proteínas asociadas a las roptrías de organismos *Babesia*. En la Figura 17 se observa el dominio correspondiente a esta familia.



Figura 17. Análisis de dominios funcionales en la proteína RAP-1 mediante el programa Pfam. Se observa en color verde la proteína RAP-1 de *B. vogeli*.

7.5 Análisis de la transcripción de los genes

7.5.1 Gen *ama-1*

Para evaluar si el gen *ama-1* se transcribe en la fase intraeritrocítica en *B. vogeli*, se realizó un análisis de RT-PCR con iniciadores específicos.

El resultado de RT-PCR mostró un amplicón de 314 pares de bases, confirmando la transcripción de este gen en fases intraeritrocíticas (Figura 18).

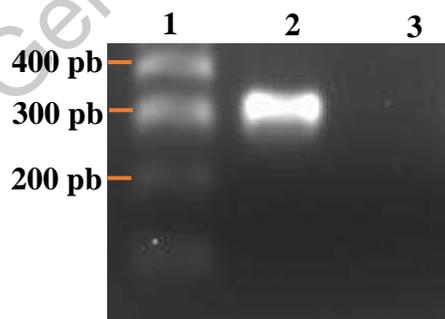


Figura 18. RT-PCR para comprobar la transcripción del gen *ama-1*. Carril 1: Marcador de talla molecular 100 pb. Carril 2: ARNm de *B. vogeli* con transcriptasa reversa. Carril 3: ARNm de *B. vogeli* sin transcriptasa reversa. La amplificación corresponde al tamaño esperado de 314 pares de bases.

7.5.2 Gen *rap-1*

Para evaluar si el gen *rap-1* se transcribe en la fase intraeritrocítica en *B. vogeli*, se realizó un análisis de RT-PCR con iniciadores específicos.

El resultado de RT-PCR mostró un amplicón de aproximadamente 632 pares de bases, confirmando la transcripción de este gen en fases intraeritrocíticas (Figura 19).

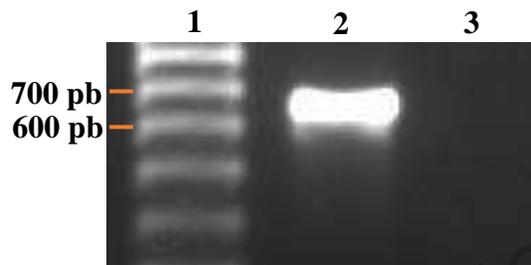


Figura 19. RT-PCR para comprobar la transcripción del gen *rap-1*. Carril 1: Marcador de talla molecular 100 pb. Carril 2: ARNm de *B. vogeli* con transcriptasa reversa. Carril 3: ARNm de *B. vogeli* sin transcriptasa reversa. La amplificación corresponde al tamaño esperado de 632 pares de bases.

7.6 Identificación y selección de péptidos con epítomos B predichos

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de la estructura secundaria de las proteínas, se descartaron las regiones con dominios transmembranales, intracelulares y la región del péptido señal; posteriormente se procedió a seleccionar y predecir mediante herramientas bioinformáticas, dos secuencias peptídicas presentes en cada una de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli*, predichas como epítomo B.

A continuación, en el cuadro 9 se muestran la secuencia de los péptidos seleccionados para cada proteína, el nombre asignado, la longitud en aminoácidos y la posición en la estructura primaria de la proteína.

Cuadro 9. Péptidos diseñados en sistema MAP-8 de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli*.

Proteína	Nombre del péptido	Longitud en aminoácidos	Posición en la secuencia	Secuencia de aminoácidos
AMA 1	AMA 1.1	23	Desconocida	IVPQSDKDTKYRYPFVYDSKEEM
	AMA 1.2	20	Desconocida	HLFQQRTSSSGSTSNDVANC
RAP 1	RAP 1.1	21	141-161 aa	ESNPIKNPTEAFWMRFRHGGR
	RAP 1.2	22	413-434 aa	GQLTMGDVTDVFEMATPTYEQGS

7.7 Resultados de la evaluación de los anticuerpos contra las proteínas AMA-1 y RAP-1 mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA indirecta)

7.7.1 Determinación de anticuerpos anti RAP-1 de *B. vogeli*

En las figuras 20, 21, 22 y 23 se observan las gráficas que demuestran la generación de anticuerpos contra cada uno de los péptidos de la proteína RAP-1 de *B. vogeli*. Este análisis fue hecho mediante la técnica de ELISA indirecta, utilizando los sueros de conejo de cada una de las inmunizaciones.

En este experimento se analizó la respuesta de anticuerpos contra el péptido RAP-1.1, observando un incremento en la producción de anticuerpos en cada conejo inmunizado en comparación con el control negativo. En el suero posterior a la cuarta inmunización fue donde se obtuvo una mayor densidad óptica, reflejando un incremento en la concentración de anticuerpos anti RAP-1.1 en ambos conejos.

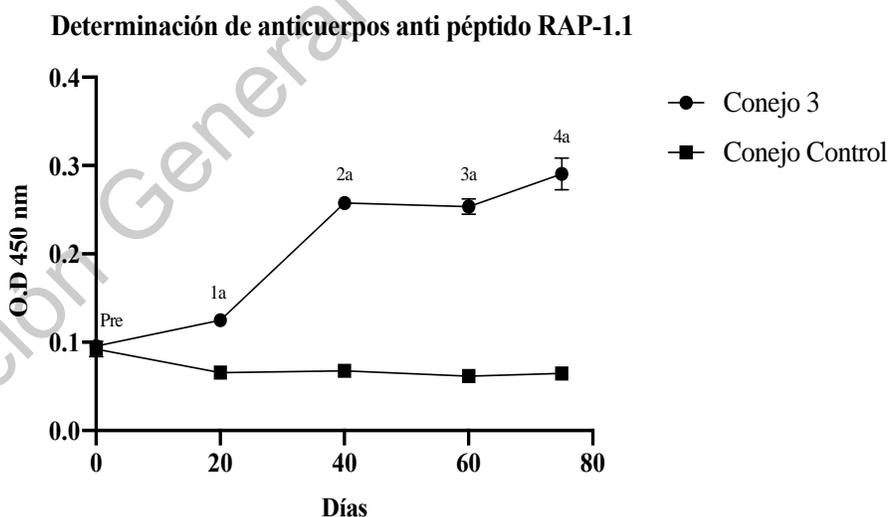


Figura 20. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 3) inmunizado con el péptido RAP-1.1. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:6,400.

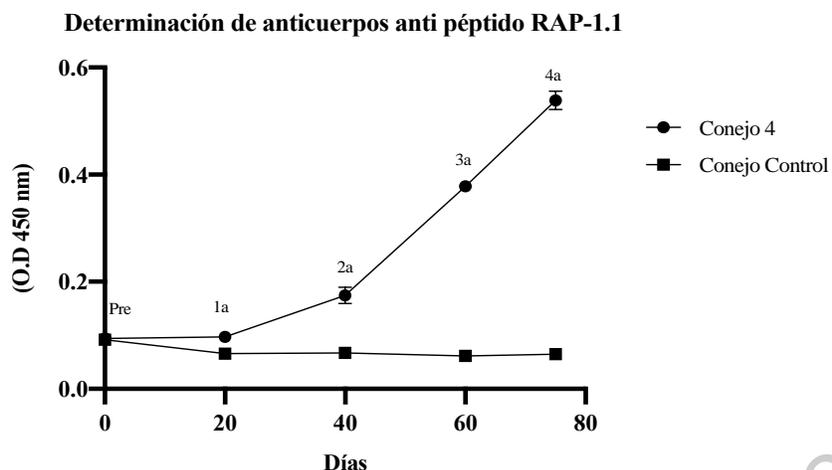


Figura 21. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 4) inmunizado con el péptido RAP-1.1. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:6,400.

Al analizar los sueros de los conejos inmunizados con el péptido RAP-1.2 se pudo observar un mayor incremento de anticuerpos en comparación con los sueros anti RAP1.1, sin embargo, en el suero posterior a la cuarta inmunización de un conejo (número 13) se observó un ligero decremento en comparación con el suero posterior a la tercera inmunización. El péptido RAP1.2 demostró ser más inmunogénico que RAP 1.1, ya que en un conejo (11) alcanzó densidades ópticas superiores a 1.0.

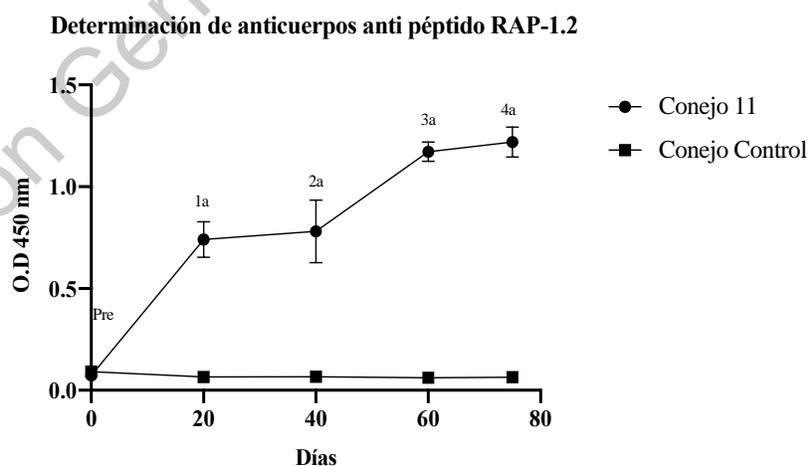


Figura 22. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 11) inmunizado con el péptido RAP-1.2. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:12,800.

Determinación de anticuerpos anti péptido RAP-1.2

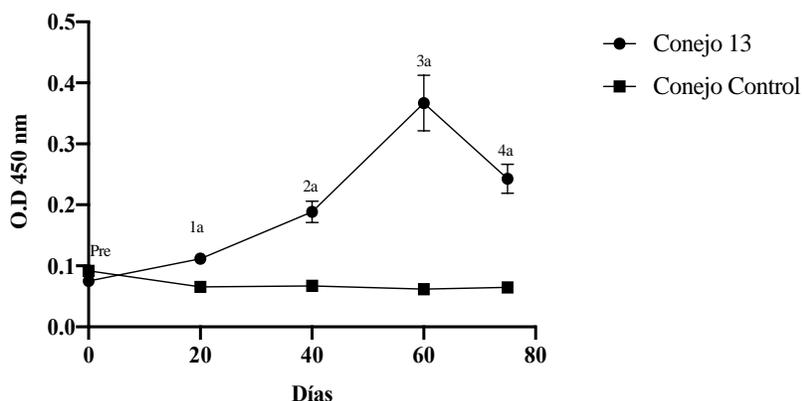


Figura 23. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 13) inmunizado con el péptido RAP-1.2. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:12,800.

7.7.2 Determinación de anticuerpos anti AMA-1 de *B. vogeli*

En las figuras 24, 25 y 26 se observan las gráficas que demuestran la generación de anticuerpos contra cada uno de los péptidos de la proteína AMA-1 de *B. vogeli*. Este análisis fue hecho mediante ELISA indirecta, utilizando los sueros de conejos de cada una de las inmunizaciones.

En este experimento se analizó la respuesta de anticuerpos contra el péptido AMA-1.1 y AMA-1.2, observando un incremento en la producción de anticuerpos en cada conejo inmunizado en comparación con el control negativo. En el suero posterior a la cuarta inmunización fue donde se obtuvo una mayor densidad óptica, reflejando un incremento en la concentración de anticuerpos anti AMA-1 en todos los conejos inmunizados. En el conejo 1 se observó un rápido incremento de la densidad óptica a partir del suero posterior a la primera inmunización, lo que indicó que la estimulación de la producción de anticuerpos fue mas eficiente en este individuo. Los dos péptidos demostraron ser inmunogénicos.

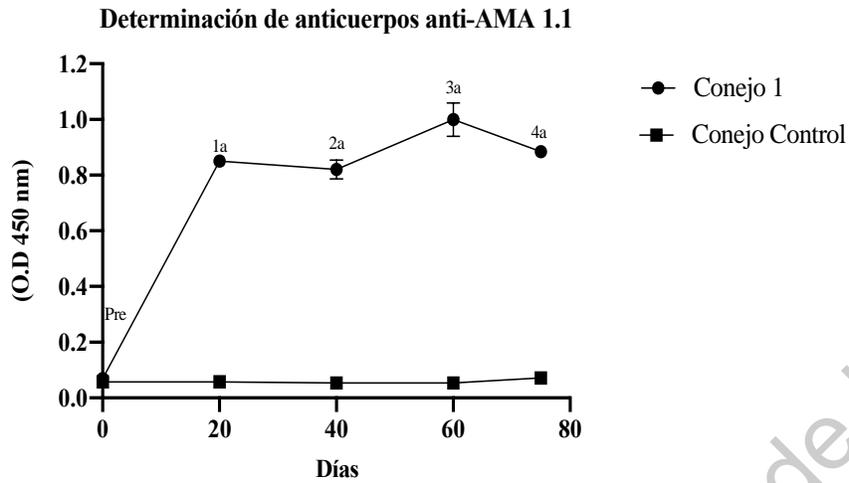


Figura 24. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 1) inmunizado con el péptido AMA-1.1. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:3,200.

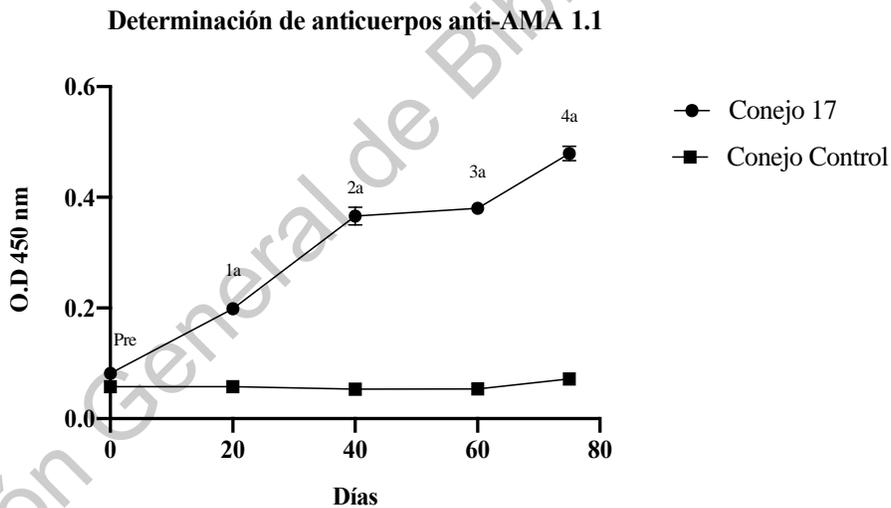


Figura 25. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 17) inmunizado con el péptido AMA-1.1. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:400.

Determinación de anticuerpos anti péptido AMA-1.2

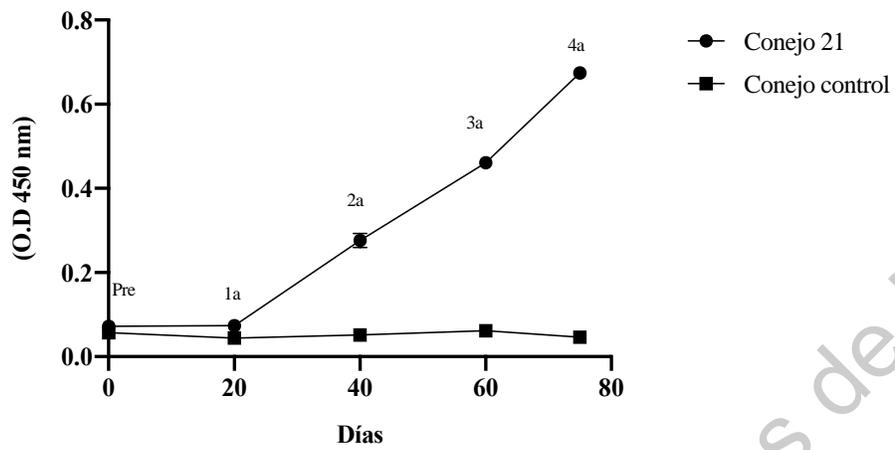


Figura 26. Gráfica de determinación de anticuerpos en el conejo (no. 21) inmunizado con el péptido AMA-1.2. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:1,600.

7.8 Análisis de expresión de las proteínas AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

El análisis de la expresión de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta; con el fin de demostrar que los anticuerpos anti AMA-1 y anti RAP-1 generados en los conejos, eran capaces de reconocer a los merozoítos de *B. vogeli*.

El resultado de las inmunofluorescencias mostró un patrón de marcado fluorescente definido y homogéneo, ubicándose la mayor intensidad de la señal en el complejo apical de los merozoítos y en algunos casos, el contorno de la membrana de los parásitos.

En el análisis de los sueros provenientes de los conejos inmunizados con el péptido RAP-1.1, se observó un marcaje muy tenue de la silueta del merozoíto de *B. vogeli*, y un nulo patrón de fluorescencia en complejo apical (Figura 27, panel A y B); este resultado sugiere que los anticuerpos anti RAP-1.1 generados en este individuo no tuvieron una alta afinidad. Por otra parte, el otro conejo mostró un marcaje fluorescente más intenso en complejo apical, demostrando la expresión de la proteína (Figura 27, panel C y D). En cuanto a los sueros provenientes de los conejos inmunizados con el péptido RAP-1.2, se pudo observar que la afinidad y la cantidad de los anticuerpos generados fue mayor en comparación a los sueros anti RAP-1.1. El patrón de fluorescencia mostrado fue exclusivamente en el complejo apical del merozoíto de *B. vogeli* (Figura 28, panel A y B); cabe mencionar que la intensidad de la fluorescencia fue mayor en el conejo 11, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la ELISA. El suero del conejo 13 mostró reconocer a los merozoítos con el mismo patrón descrito en el individuo anterior (Figura 28, panel C y D), pero se notó una disminución leve en la intensidad de la fluorescencia. Con base en los resultados obtenidos en las inmunofluorescencias y en las ELISAs, el péptido RAP-1.2 demostró ser más inmunogénico que RAP-1.1 en el modelo *in vivo* de conejos.

Los sueros provenientes de los conejos inmunizados con los péptidos AMA-1.1 y AMA-1.2 se evaluaron mediante inmunofluorescencia. Los resultados demostraron que el patrón de reconocimiento de fluorescencia se manifestaba en el complejo apical, en la membrana del merozoíto y en algunas partes de la membrana del eritrocito. En comparación con el patrón de fluorescencia obtenido con los anticuerpos anti RAP-1 en donde el marcaje

era de un único punto fluorescente en el complejo apical, aquí el marcaje fue mucho más difuso. El péptido AMA-1.1 demostró ser inmunogénico, al observarse que el conejo 1 generó anticuerpos que generaban un patrón de marcaje fluorescente de mayor intensidad (Figura 29, panel A y B). Por su contraparte, el suero del conejo 17 demostró reconocer al merozoíto por inmunofluorescencia (Figura 29, panel C y D), pero con una intensidad menor, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la ELISA. El péptido AMA-1.2 mostró su inmunogenicidad al generar anticuerpos que reconocen al merozoíto de *B. vogeli* (Figura 30, panel A y B). El patrón de fluorescencia obtenido con los anticuerpos anti AMA-1.2 fue muy similar al anteriormente descrito para los anticuerpos anti AMA-1.1.

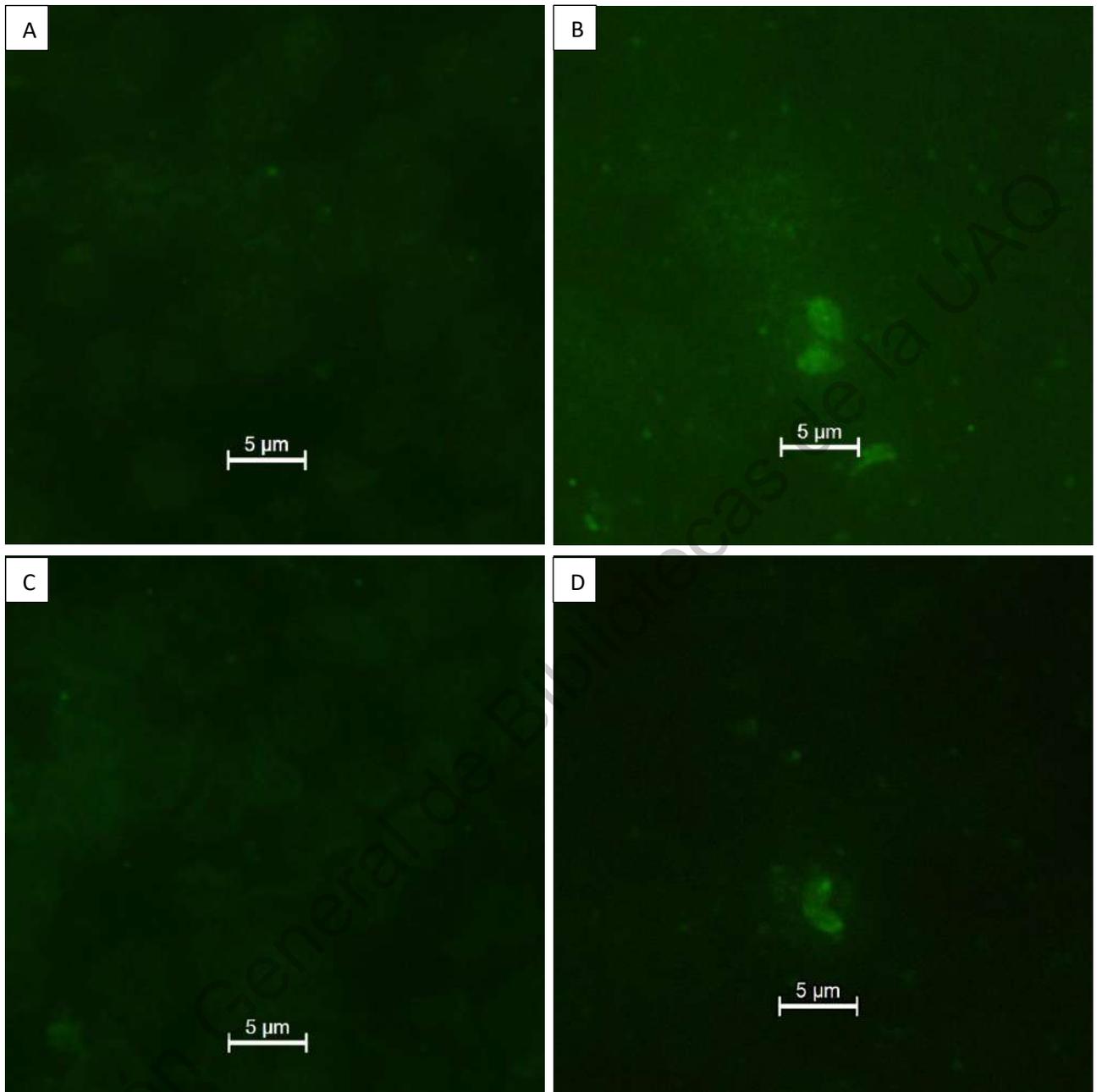


Figura 27. Los anticuerpos anti péptido RAP-1.1 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de *B. vogeli* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero pre-inmunización del conejo 3. B) Suero post-inmunización del conejo 3. C) Suero pre-inmunización del conejo 4. D) Suero post-inmunización del conejo 4. Objetivo 100×, Alexa Flour™ 488.

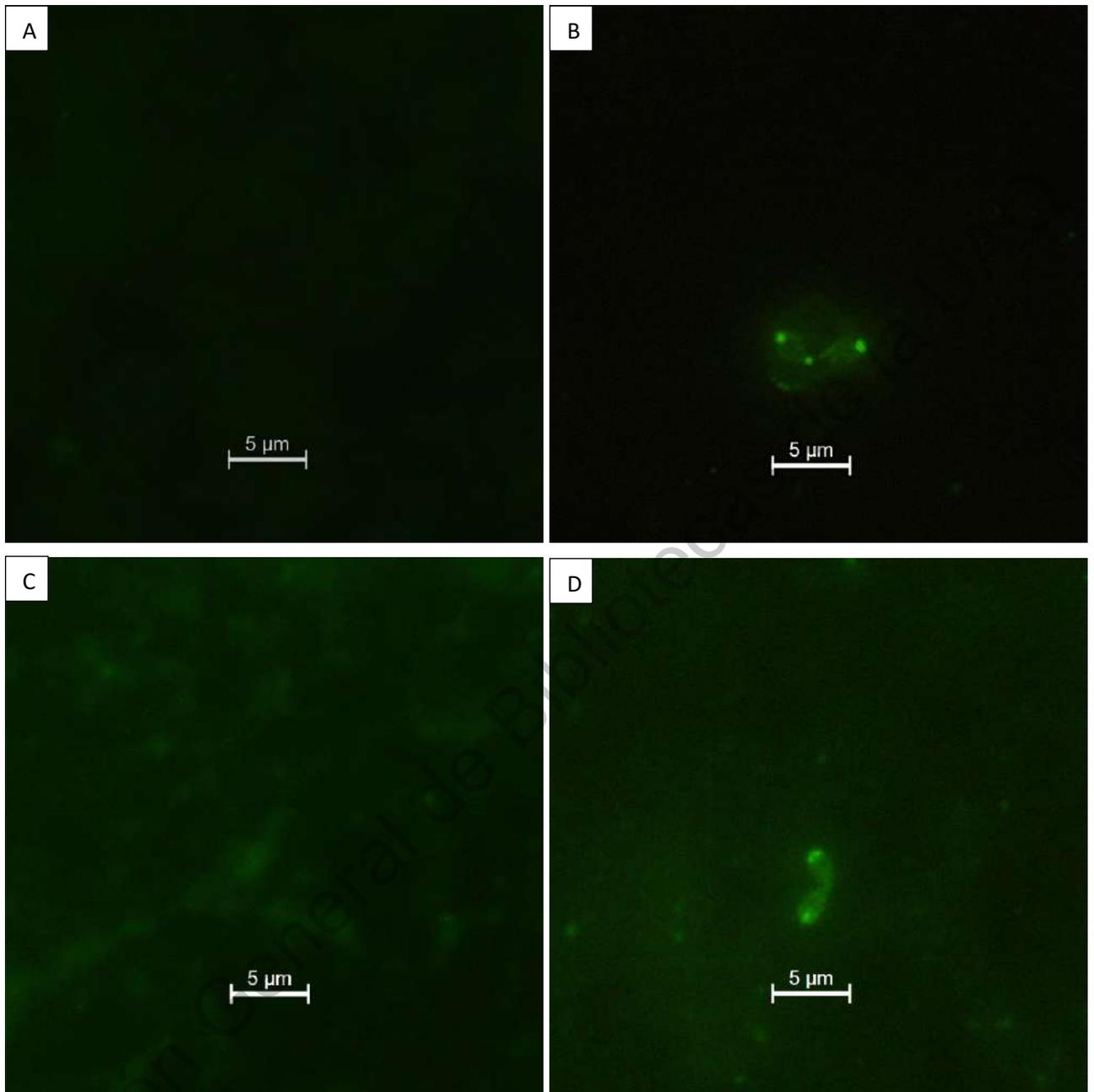


Figura 28. Los anticuerpos anti péptido RAP-1.2 reconocen los merozoítos intraeritrocítos de *B. vogeli* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero pre-inmunización del conejo 11. B) Suero post-inmunización del conejo 11. C) Suero pre-inmunización del conejo 13. D) Suero post-inmunización del conejo 13. Objetivo 100×, Alexa Flour™ 488.

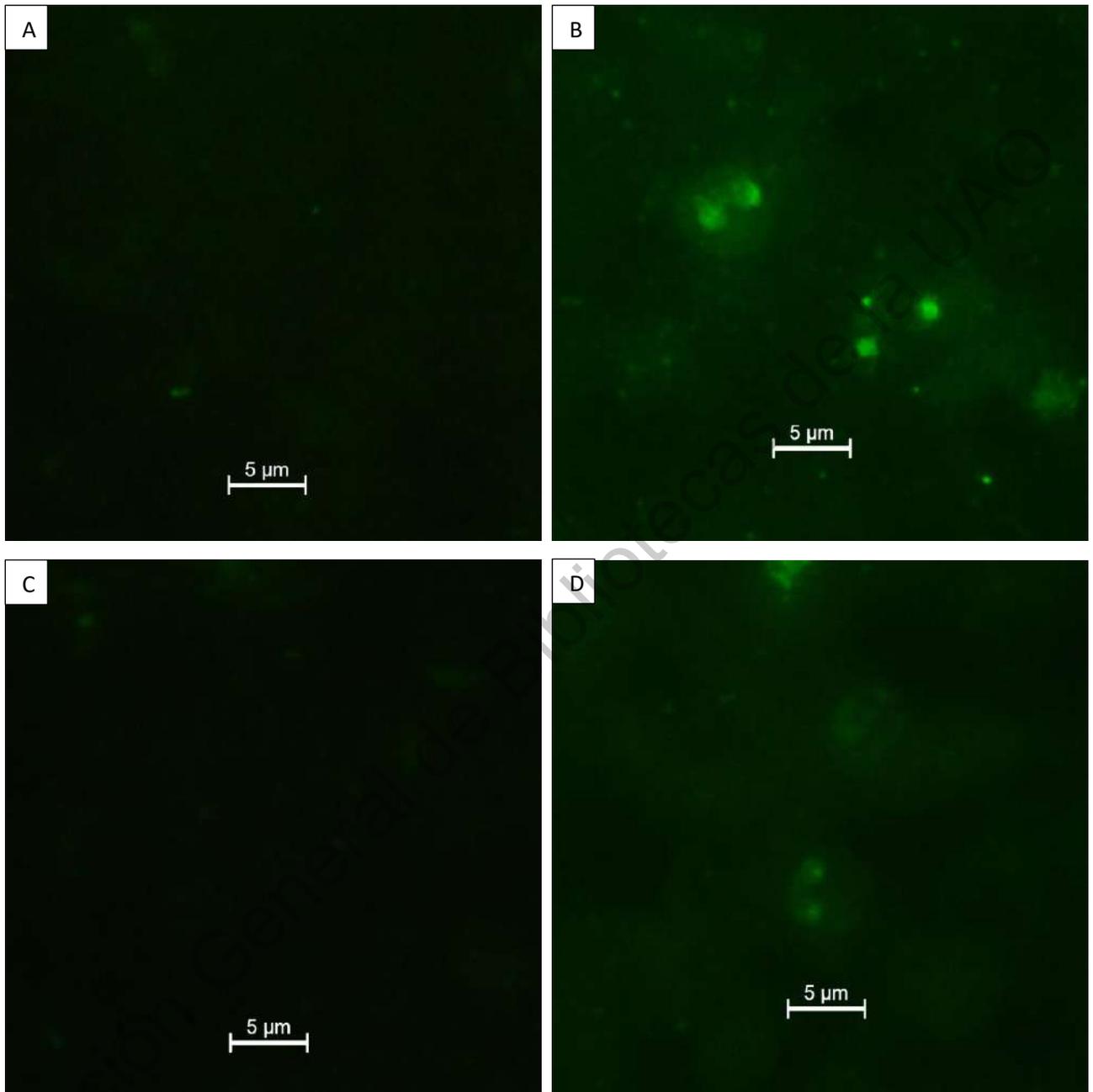


Figura 29. Los anticuerpos anti péptido AMA-1.1 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de *B. vogeli* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero pre-inmunización del conejo 1. B) Suero post-inmunización del conejo 1. C) Suero pre-inmunización del conejo 17. D) Suero post-inmunización del conejo 17. Objetivo 100×, Alexa Flour™ 488.

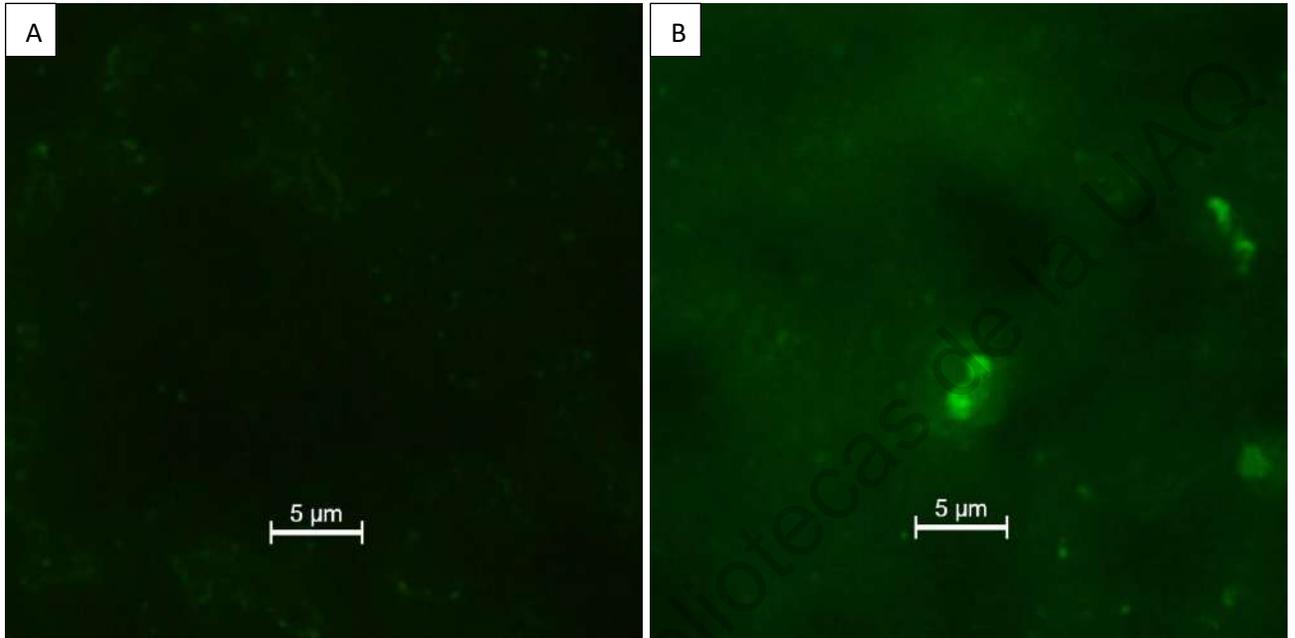


Figura 30. Los anticuerpos anti péptido AMA 1.2 reconocen los merozoítos intraeritrocíticos de *B. vogeli* mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Suero pre-inmunización del conejo 21. B) Suero post-inmunización del conejo 21. Objetivo 100×, Alexa Flour™ 488.

Dirección General de Bibliotecas

8 DISCUSIÓN

La babesiosis canina es una enfermedad infecciosa que afecta a caninos domésticos y silvestres en zonas endémicas de garrapatas (Dantas-Torres y Figueredo, 2006, Irwin, 2010). Una de las principales especies distribuidas mundialmente y causante de la babesiosis canina en México es *Babesia vogeli*. El estudio de esta especie ha sido muy limitado a análisis epidemiológicos y reportes esporádicos (Osorono y Ristic, 1974; Panti-May y Rodríguez-Vivas, 2020). Sin embargo, se han descrito pocos aspectos biológicos relacionados con la caracterización de proteínas involucradas en el mecanismo de invasión al eritrocito. Estas caracterizaciones moleculares e inmunológicas de proteínas antígenicas han sido muy aplicadas en la obtención de candidatos vacunales o de diagnóstico en otras especies de *Babesia* (Hernández-Silva *et al.*, 2018; Hidalgo-Ruiz *et al.*, 2018; Barreda *et al.*, 2019; Mosqueda *et al.*, 2019). Debido a esto, se propuso caracterizar dos proteínas antígenicas de *B. vogeli*, utilizando una metodología similar a las desarrolladas en otros trabajos (Hernández-Silva *et al.*, 2018; Mosqueda *et al.*, 2019), con el fin de comprobar su expresión e inmunogenicidad.

Los resultados de la caracterización parcial de la proteína AMA-1 fue posible gracias a la utilización de una estrategia de amplificación basada en el uso de iniciadores con bases degeneradas. Los iniciadores utilizados en la amplificación fueron diseñados por Tarigo *et al.* (2019), tomando como base, secuencias conservadas del gen *ama-1* de microorganismos genéticamente relacionados como algunas especies de *Plasmodium* y *Babesia*. En este trabajo se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 880 pares de bases, lo cual concuerda con lo obtenido por Tarigo *et al.* (2019). Al secuenciar el amplicón obtenido, pudimos únicamente ensamblar un fragmento de 407 pares de bases; esto debido a que la secuenciación se llevó a cabo utilizando directamente el producto purificado de la PCR, y no se clonó en un vector plasmídico, haciendo que tuvieramos que remover pares de bases en los extremos 5' y 3' de las secuencias obtenidas, con el fin de generar una secuencia consenso que concordara en ambas direcciones. Al comparar la secuencia obtenida con otras en las bases de datos, pudimos confirmar que se trataba de un fragmento del gen *ama-1*, debido a que al análisis BLAST (Altschul *et al.*, 1990) mostró un alto porcentaje de identidad con otras secuencias de genes *ama-1* pertenecientes a otras especies de *Babesia*, siendo *B.*

divergens y *B. gibsoni* las más parecidas a nivel nucleotídico con un 89% de identidad. Esto se debe a que el gen que codifica para la proteína AMA-1 de organismos *Babesia* es muy conservado entre especies (Bargieri *et al.*, 2013; Salama *et al.*, 2013; Tarigo *et al.*, 2019).

En cuanto al resultado obtenido en el análisis de transcripción, se comprobó que los genes *ama-1* y *rap-1* de *B. vogeli* se transcriben en las fases intraeritrocíticas; esto concuerda con los estudios donde se logró amplificar a partir de ADN complementario el gen *ama-1* de *B. bovis* (Gaffar *et al.*, 2004; Salama *et al.*, 2013), *B. bigemina* (AbouLaila *et al.*, 2019), *B. gibsoni* (Zhou *et al.*, 2006) y *B. divergens* (Montero *et al.*, 2009), entre otros. El gen *rap-1*, se ha demostrado que se transcribe en fases intraeritrocíticas en la especie *B. bigemina* (Suárez *et al.*, 2003), *B. bovis* (), *B. gibsoni* (Zhou *et al.*, 2007), entre otras.

La proteína AMA-1 de *B. bovis* está conformada por 605 aminoácidos y la de *B. bigemina* por 595 aminoácidos; al comparar la proteína parcial AMA-1 de *B. vogeli* se observó que la secuencia obtenida era la región homóloga correspondiente del aminoácido 190 al 276 (Gaffar *et al.*, 2004) y la región homóloga del aminoácido 179 al 263 de *B. bigemina* (Torina *et al.*, 2010; AbouLaila *et al.*, 2019). Por lo tanto, la región del dominio funcional obtenido en este trabajo corresponde a un fragmento del ectodominio 1 de AMA-1 de *B. vogeli*, mismo que ha sido utilizado para generar anticuerpos anti AMA-1 en ensayos inmunológicos. En el estudio de Salama *et al.* (2013) los anticuerpos contra esta región inhibieron en un 70% la eficiencia de invasión al eritrocito por parte de *B. bovis*. Al diseñar los péptidos con epítomos B, observamos que el péptido AMA-1.1 de *B. vogeli* contenía 8 aminoácidos conservados entre especies de *Babesia*; este péptido conservado se ha utilizado exitosamente para generar anticuerpos anti AMA-1 de *B. bigemina*, denominándolo péptido AMA 1C (Valdez-Espinosa, 2015) y P1AMA en *B. bovis* (Barreda *et al.*, 2019). Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con estos trabajos, ya que, se logró generar anticuerpos confirmando que esta región de la proteína es inmunogénica.

Respecto a especies de *Babesia* que infectan caninos, únicamente se encuentra caracterizada la proteína AMA-1 de *B. gibsoni*, la cual está conformada por 1,794 nucleótidos que codifican a una proteína de 598 aminoácidos, con un peso molecular de 66 kDa (Zhou *et al.*, 2006), por lo cual, se hipotetiza que las características de esta proteína en *B. vogeli*, sean similares.

En el caso de la proteína RAP-1, se encontró una secuencia homóloga obtenida de una cepa de *Babesia canis* en Australia (Dalrymple *et al.*, 1993); esta secuencia había sido reportada en el GenBank como putativa, por lo que, no contaba con experimentos que respaldaran su expresión. Esta secuencia se tomó como molde para el diseño de los iniciadores utilizados para obtener el gen *rap-1* en *B. vogeli*.

Con base en el análisis bioinformático de la secuencia obtenida de *rap-1* de *B. vogeli*, se observó que el porcentaje de identidad era de un 99.55% comparada con la secuencia putativa reportada por Dalrymple *et al.* (1993); esto puede atribuirse a que, en realidad la secuencia reportada por el grupo australiano era *B. vogeli* y no *B. canis*. Esto puede justificarse debido a que hay estudios donde mencionan que la única especie grande de *Babesia* que infecta caninos en Australia es *B. vogeli* (Greay *et al.*, 2018). Asimismo, Penzhorn (2020) menciona que hay mucha discrepancia entre la literatura de *Babesia canis* (*sensu lato*) reportada en los últimos 50 años, y es muy probable que los grupos de investigación anteriormente se refirieran a *B. canis* (*s.l*) como una denominación uniforme para todas las especies de *Babesia* grandes de caninos.

La proteína RAP-1 de *B. vogeli* caracterizada en este trabajo está conformada por 444 aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 50.95 kDa; esto es similar a lo encontrado con otras proteínas RAP-1 de *Babesia*, como *B. gibsoni*, la cual está conformada por 474 aminoácidos y un peso molecular de 52 kDa (Zhou *et al.*, 2007).

Al no tener disponible el genoma anotado de *B. vogeli* es difícil poder predecir si también el locus del gen *rap-1* está conformado por multicopias separadas por regiones intergénicas, así como evaluar si existen las variantes denominadas *rap-1a*, *rap-1b* y *rap-1c*, similar a lo encontrado en *B. bigemina* (Suárez *et al.*, 2003) y *B. gibsoni* (Terkawi *et al.*, 2009).

Al realizar la inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti AMA-1 y anti RAP-1 de *B. vogeli* se logró observar un patrón de expresión en la membrana y el complejo apical de los merozoítos intraeritrocíticos, concordando con lo observado en otros trabajos para *B. bigemina* y *B. bovis* (Yokoyama *et al.*, 2002; Salama *et al.*, 2013; Valdez-Espinosa, 2015). Estos resultados confirmaron que los anticuerpos generados en los conejos reconocían a la proteína nativa de *B. vogeli*, comprobando la expresión de AMA-1 y RAP-1.

9 CONCLUSIONES

Se logró obtener por primera vez una secuencia parcial del gen que codifica a la proteína antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) y el gen completo que codifica a la proteína asociada a las roptrías 1 (RAP-1) de *B. vogeli*. Asimismo, se comprobó su expresión en fases intraeritrocíticas, demostrando que es un gen que se transcribe. De igual manera se demostró que anticuerpos anti péptidos de AMA-1 lograron reconocer mediante inmunofluorescencia indirecta merozoítos de *B. vogeli* marcando un patrón de fluorescencia difuso específicamente en el complejo apical.

Algo importante que recalcar en este trabajo, es que, utilizando la estrategia de amplificación con iniciadores degenerados para el gen *ama-1*, se puede llegar a obtener un fragmento parcial de la proteína AMA-1 de cualquier otra especie de *Babesia*. Este fragmento al ser parte del ectodominio 1 y al ser conservado entre apicomplexos, codifican a una región inmunógena de la proteína capaz de ser utilizada como candidato vacunal, según otros estudios realizados en *B. bovis* y *B. bigemina*.

Se concluye que AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli* son proteínas inmunógenicas capaces de desarrollar una respuesta inmunológica en un modelo *in vivo*, las cuales se expresan en las fases intraeritrocíticas de *B. vogeli*. Estos hallazgos sugieren el posible uso de estas proteínas como candidatos vacunales o de diagnóstico por su inmunogenicidad demostrada.

Se recomienda hacer un ensayo de inhibición *in vitro* para corroborar que los anticuerpos generados brinden protección contra la invasión de *B. vogeli* al eritrocito, así como, un ensayo de inmunoelectrotransferencia (Western Blot), para corroborar que los anticuerpos anti AMA-1 y anti RAP-1 reconocen de manera específica a la proteína nativa.

10. LITERATURA CITADA

1. Almagro, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., . . . Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.*, *37*, 420-423.
2. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool . *J. Mol. Biol.*, *215*, 403-410.
3. AbouLaila, M., Terkawi, M., Menshawy, S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Identification, Characterization, and Protective Effect of the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) Homolog from the Argentina Strain of *Babesia bigemina*. *Ann. Clin. Investig.*, *1*, 1001.
4. Annoscia, G., Latrofa, M., Cantacessi, C., Olivieri, E., Manfredi, M., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2017). A new PCR assay for the detection and differentiation of *Babesia canis* and *Babesia vogeli*. *Ticks Tick Borne Dis.*, *8*, 862-865.
5. Babes, V. (1888). Sur l' hémoglobinurie bactérienne du boeuf. *C. R. Acad. Sci.*, *107*, 692-694.
6. Baneth, G. (2018). Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Vet Parasitol.*, *254*, 58-63.
7. Bargieri, D. Y., Andenmatten, N., Lagal, V., Thiberge, S., Whitelaw, J. A., Tardieux, I., . . . Ménard, R. (2013). Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nat. Commun.*, *4*, 2552.
8. Barreda, D., Hidalgo-Ruiz, M., Hernandez-Ortiz, R., Ramos, J. A., Galindo-Velasco, E., & Mosqueda, J. (2019). Identification of conserved peptides containing B-cell epitopes of *Babesia bovis* AMA-1 and their potential as diagnostics candidates. *Transbound Emerg Dis.*, *00*, 1-9.
9. Beugnet, F., Halos, L., Larsen, D., Labuschagné, M., Erasmus, H., & Fourie, J. (2014). The ability of an oral formulation of afoxolaner to block the transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs. *Parasit Vectors*, *7*, 283-289.

10. Bilgic, H. B., Hacilarlioglu, S., Bakirci, S., Kose, O., Unlu, A. H., Aksulu, A., . . . Karagenca, T. (2020). Comparison of protectiveness of recombinant *Babesia ovis* apical membrane antigen 1 and *B. ovis*-infected cell line as vaccines against ovine babesiosis. *Ticks Tick Borne Dis.*, *11*, 101280.
11. Bilić, P., Kuleš, J., Barić.Rafaj, R., & Vladimir, M. (2018). Canine babesiosis: where do we stand? *Acta Vet-Beograd*, *68*, 127-160.
12. Birkenheuer, A., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M., & Breitschwerdt, E. (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet Parasitol*, *124*, 151-160.
13. Boonchit, S., Alhassan, A., Chan, B., Xuan, X., Yokoyama, N., Ooshiro, M., . . . Igarashi, I. (2006). Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol*, *137*, 28-35.
14. Burge, C., & Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.*, *268*, 78-94.
15. Carli, E., Tasca, S., Trotta, M., Furlanello, T., Caldin, M., & Solano-Gallego, L. (2009). Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Vet Parasitol*, *162*, 51-57.
16. Cavalleri, D., Murphy, M., Seewald, W., Drake, J., & Nanchen, S. (2017). Two randomized, controlled studies to assess the efficacy and safety of lotilaner (Credelio™) in preventing *Dermacentor reticulatus* transmission of *Babesia canis* to dogs. *Parasit Vectors*, *10*, 520-526.
17. Collins, C. R., & Blackman, M. J. (2011). Apicomplexan AMA1 in Host Cell Invasion: A Model at the Junction? *Cell Host Microbe*, *10*, 531-533.
18. Costa-Júnior, L., Ribeiro, M., Rembeck, K., Rabelo, E., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., . . . Passos, L. (2009). Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Res. Vet. Sci.*, *86*, 257-260.

19. Costa-Júnior, L., Zahler-Rinder, M., Ribeiro, M., Rembeck, K., Rabelo, E., Pfister, K., & Passos, L. (2012). Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet Parasitol*, 188, 160-163.
20. Cruz-Vazquez, C., & Garcia-Vazquez, Z. (1999). Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Exp Appl Acarol*, 23, 277-280.
21. Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C.H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett*, 35, 1541-9.
22. Dalrymple, B. P., Casu, R. E., Peters, J. M., Dimmock, C. M., Gale, K. R., Boese, R., & Wright, I. G. (1993). Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Mol Biochem Parasitol*, 57, 181-192.
23. Dantas-Torres, F. (2008a). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*, 1, 1-17.
24. Dantas-Torres, F. (2008b). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet Parasitol*, 152, 173-185.
25. Dantas-Torres, F., & Figueredo, L. A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Vet Parasitol*, 141, 197-203.
26. Duarte, S., Linhares, G., Romanowsky, T., Neto, O., & Borges, L. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet Parasitol*, 152, 16-20.
27. Dumont, P., Fourie, J. J., Soll, M., & Beugnet, F. (2015). Repellency, prevention of attachment and acaricidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against the main vector of canine babesiosis in Europe, *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors*, 8, 50-55.

28. Eichenberger, R. M., Štefanića, S., Naucke, T. J., Šarkūnas, M., Zamokas, G., Grimm, F., & Deplazes, P. (2017). An ELISA for the early diagnosis of acute canine babesiosis detecting circulating antigen of large *Babesia* spp. *Vet Parasitol*, 243, 162-168.
29. Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., . . . Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42, 222-230.
30. Fossum, T. W. (1999). *Cirugía en pequeños animales*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
31. Fourie, J. J., Stanneck, D., & Jongejan, F. (2013). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated with an imidacloprid/flumethrin collar. *Vet Parasitol*, 192, 273-278.
32. Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol*, 134, 77-85.
33. Furuta, P. I., Oliveira, T. M., Teixeira, M. C., Rocha, A. G., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2009). Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*, 18, 41-45.
34. Gaffar, F.R., Yatsuda, A.P., Fransen, F.F.J., & de Vries, E. (2004). Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect. Immun*, 72, 2947-2955.
35. Galán, A., Mayer, I., Rafaj, R. B., Bendelja, K., Sušić, V., Cerón, J. J., & Mrljak, V. (2018). MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by *Babesia canis*. *PLoS ONE*, 13, 1-21.
36. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. En J. Walker, *The Proteomics Protocols Handbook*. UK: Humana Press.

37. Geurden, T., Six, R., Becskei, C., Maeder, S., Lloyd, A., Mahabir, S., . . . Liebenberg, J. (2017). Evaluation of the efficacy of sarolaner (Simparica®) in the prevention of babesiosis in dogs. *Parasit Vectors*, *10*, 415-420.
38. Gohil, S., Kats, L. M., Sturm, A., & Cooke, B. M. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin' forward. *Trends Parasitol*, *26*, 591-599.
39. Gray, J. S., Estrada-Peña, A., & Zintl, A. (2019). Vectors of Babesiosis. *Annu. Rev. Entomol*, *64*, 9.1-9.17.
40. Greay, T. L., Zahedi, A., Krige, A., Owens, J. M., Rees, R. L., Ryan, U. M., Oskam, C. L., & Irwin, P. J. (2018). Endemic, exotic and novel apicomplexan parasites detected during a national study of ticks from companion animals in Australia. *Parasit. Vectors*, *11*, 197.
41. Gubbels, M.-J., & Duraisingh, M. T. (2012). Evolution of apicomplexan secretory organelles. *Int. J. Parasitol*, *42*, 1071-1081.
42. Henri J. Vial; A. Gorenflot. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol*, *138*, 147-160.
43. Hernández-Silva, D. J., Valdez-Espinoza, U. M., Mercado-Uriostegui, M. A., Aguilar-Tipacamú, G., Ramos-Aragón, J. A., Hernández-Ortiz, R., . . . Mosqueda, J. (2018). Immunomolecular characterization of MIC-1, a novel antigen in *Babesia bigemina*, which contains conserved and immunodominant B-cell epitopes that induce neutralizing antibodies. *Vet Sci*, *5*, 32.
44. Homer, M., Aguilar-Delfin, I., Telford-III, S., Krause, P., & Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, *13*(3), 451-469.
45. Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A., & Gray, J. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol*, *38*, 1219-1237.
46. Hutcheon, D. (1893). Diseases amongst dogs. Malignant jaundice or bilious fever of the dog. *Agric J Cape Good Hope*, *6*, 476-7.
47. Irwin, P. (2010). Canine Babesiosis. *Vet Clin Small Anim*, *40*, 1141-1156.

48. Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* life cycle – when phylogeny meets biology. *Trends Parasitol.*, 35, 356-368.
49. Jefferies, R., Ryan, U., & Irwin, P. (2007). PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol*, 144, 20-27.
50. Johnson, N. (2016). Tracing disease emergence: canine babesiosis in the UK. *Vet Rec*, 356-357.
51. Johnson, N., Goohariz, H., Wakeley, P., & Phipps, L. (2013). *Babesia vogeli* in a quarantined dog. *Vet Rec*, 172, 241-242.
52. Jongejan, F., Fourie, J. J., Chester, S. T., Manavella, C., Mallouk, Y., Pollmeier, M. G., & Baggott, D. (2011). The prevention of transmission of *Babesia canis canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs using a novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene. *Vet Parasitol*, 179, 343-350.
53. Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P. (2015). Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment . *Vet Med Res Rep*, 6, 119-128.
54. Kappmeyer, L. S., Perryman, L. E., Hines, S. A., Baszler, T. V., Katz, J. B., Hennager, S. G., & Knowles, D. P. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*, 37, 2285-2290.
55. Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. v., & Sonnhammer, E. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305, 567-580.
56. Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., . . . Wallace, F. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool*, 27, 37-58.
57. Müller, H., Aysul, N., Liu, Z., Salih, D. A., Karagenc, T., Beyer, D., . . . Seitzer, U. (2010). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of *Babesia canis* infections. *Transbound Emerg Dis*, 57, 63-65.

58. Madeira, F., Park, Y. m., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., . . . Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*, 636-641.
59. Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., Brkljacic, M., Kucer, N., Rafaj, R., . . . Mrljak, V. (2009). Septic shock in canine babesiosis. *Vet Parasitol*, *162*, 263-270.
60. Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., . . . Ceron, J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol*, *144*, 242-250.
61. Matijatko, V., Torti, M., & Schetters, T. P. (2012). Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol*, *28*(3), 99-105.
62. Matjila, P., Penzhorn, B., Bekker, C., Nijhof, A., & Jongejan, F. (2004). Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet Parasitol*, *122*, 119-125.
63. Molinar, E., James, M.A., Kakoma, I., Holland, C., & Ristic, M. (1982). Antigenic and immunogenic studies on cell culture-derived *Babesia canis*. *Vet Parasitol*, *10*, 29-40.
64. Montero, E., Rodriguez, M., Oksov, Y., & Lobo, C.A. (2009). Babesia divergens apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. *Infect. Immun*, *77*, 4783-4793.
65. Moreau, Y., Vidor, E., Bissuel, G., & Dubreuil, N. (1989). Vaccination against canine babesiosis: an overview of field observations . *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *83*, 95-96.
66. Mosqueda, J., Hidalgo-Ruiz, M., Calvo-Olvera, D. A., Hernandez-Silva, D. J., Ueti, M. W., Mercado-Uriostegui, M. A., . . . Igarashi, I. (2019). RON2, a novel gene in *Babesia bigemina*, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasion. *Parasitology*, 1-9.
67. Mosqueda, J., McElwain, T. F., Stiller, D., & Palmer, G. H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect. Immun.*, *70*, 1599-1603.

68. Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamú, G., & Cantó, G. (2012). Current advances in detection and treatment of Babesiosis. *Curr. Med. Chem*, *19*, 1504-1518.
69. Moubri, K., Kleuskens, J., Crommert, J. V., Scholtes, N., Kasteren, T. V., Delbecq, S., . . . Schetters, T. (2018). Discovery of a recombinant *Babesia canis* supernatant antigen that protects dogs against virulent challenge infection. *Vet Parasitol*, *249*, 21-29.
70. Navarro, C., Reymond, N., Fourie, J., Hellmann, K., & Bonneau, S. (2015). Prevention of *Babesia canis* in dogs: efficacy of a fixed combination of permethrin and fipronil (Effitix®) using an experimental transmission blocking model with infected *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors*, *8*, 32-41.
71. Norimine, J., Mosqueda, J., Suarez, C., Palmer, G. H., McElwain, T. F., Mbassa, G., & Brown, W. C. (2003). Stimulation of T-Helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* Rhoptry-Associated Protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect. Immun.*, *71*, 5021-5032.
72. Osorno, B., & Ristic, M. (1974). *Babesia canis* en perros en México. *Tec Pecu*, 36-40.
73. Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., . . . Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, *36*, 163-169.
74. Panti-May, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I. (2020). Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, *21*, 100417.
75. Paulino, P. G., Pires, M. S., Silva, C. B., Peckle, M., Costa, R. L., Vitari, G. L., . . . Santos, H. A. (2018). Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, *13*, 160-165.
76. Pereira da Costa, A., Costa, F. B., Labruna, M. B., Silveira, I., Moraes-Filho, J., Soares, J. F., . . . Guerra, R. D. (2015). A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*,

Ehrlichia canis and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Braz J Vet Parasitol*, 24, 28-35.

77. Penzhorn, B. L. (2020). Don't let sleeping dogs lie: unravelling the identity and taxonomy of *Babesia canis*, *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*. *Parasites Vectors*, 13, 184.
78. Plumb, D. C. (2010). *Manual de farmacología veterinaria*. Buenos Aires, Argentina: Inter-médica.
79. Remarque, E. J., Faber, B. W., Kocken, C. H., & Thomas, A. W. (2008). Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol.*, 24, 74-84.
80. Rodríguez-Vivas, R. I., Cob-Galera, L., & Domínguez-Alpizar, J. L. (2000). Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan (1984-1999). *Rev. Biomed*, 11, 277-282.
81. Rodríguez-Vivas, R., Ojeda-Chi, M., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. (2017). First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infesting dogs in Mexico. *Med Vet Entomol*, 31, 72-77.
82. Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., & Baneth, G. (2014). Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Vet Parasitol*, 199, 121-128.
83. Rombel, I.T., Skyes, K.F., Rayner, S., & Johnston, S.A. (2002). ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. *Gene*, 282, 33-41.
84. Schetters, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol*, 21(4), 179-184.
85. Schetters, T., Kleuskens, J., Crommert, J. V., Leeuw, P. D., Finizio, A.-L., & Gorenflot, A. (2009). Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Vet Parasitol*, 162, 7-15.

86. Schetters, T., Kleuskens, J., & Bos, N. S. (1992). Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using parasite antigens from in vitro culture. *Parasite Immunol*, *14*, 295-305.
87. Schetters, T., Kleuskens, J., Scholtes, N., & Bos, H. (1995). Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. *Parasite Immunol*, *17*, 215-218.
88. Schetters, T., Kleuskens, J., Scholtes, N., Pasman, J., & Bos, H. (1994). Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants with emphasis on clinical babesiosis. *Vet Parasitol*, *52*, 219-233.
89. Schnittger, L., Rodriguez, A., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol*, *12*, 1788–1809.
90. Salama, A. A., Terkawi, M. A., Kawai, S., AbouLaila, M., Nayel, M., Mousa, A., . . . Igarashi, I. (2013). Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp. Parasitol*, *135*, 623-628.
91. Saha, S., & Raghava, G. (2004). Bcepred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. En G. Nicosia, V. Cutello, P. Bentley, & J. Timmis, *Artificial Immune Systems*. Berlin: Springer.
92. Saha, S., & Raghava, G. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, *65*, 40-48.
93. Shortt, H. E. (1973). *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod and mamalian hosts. *Int. J. Parasitol.*, *3*, 119-148.
94. Smith, T., & Kilborne, F. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. *Bureau of Animal Industry, Bull 1*, 85-114.
95. Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*, *181*, 48-60.

96. Solano-Gallego, L., Sainz, A., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors*, 9, 336.
97. Suarez, C. E., Palmer, G. H., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., Hötzel, I., & McElwain, T. F. (2003). Organization, transcription, and expression of rhostry associated protein genes in the *Babesia bigemina rap-1* locus. *Mol. Biochem. Parasitol*, 127, 101-112.
98. Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R. K., & Heckerroth, A. R. (2015). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated orally with fluralaner chewable tablets (Bravecto TM). *Parasit Vectors*, 1-6.
99. Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R. K., & Heckerroth, A. R. (2016). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. *Parasit Vectors*, 9, 234-236.
100. Tarigo, J. L., Kelly, L. S., Brown, H. M., & Peterson, D. S. (2019). Limited genetic variability of *Cytauxzoon felis* apical membrane antigen-1 (ama 1) from domestic cats and bobcats. *Parasites Vectors*, 12, 115.
101. Terkawi, M. A., Amornthep, A., Ooka, H., Aboge, G., Jia, H., Goo, Y. K., Nelson, B., Yamagishi, J., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Kawazu, S. I., Fujisaki, K., & Xuan, X. (2009). Molecular characterization of three distinct *Babesia gibsoni* rhostry-associated protein-1s (RAP-1s). *Parasitology*, 136, 1147-1160.
102. Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M. T., Rentería-Evangelista, T. B., González-Medina, Y., Barreras-Serrano, A., . . . Vinasco, J. (2009). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec*, 164, 59-61.
103. Torina, A., Agnone, A., Sireci, G., Mosqueda, J.J., Blanda, V., Albanese, I., La Farina, M., Cerrone, A., Cusumano, F., & Caracappa, S. (2010). Characterization of the Apical Membrane Antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. *Transbound Emerg Dis*, 57, 52-56.

104. Troskie, M., Villiers, L. d., Leisewitz, A., Oosthuizen, M. C., & Quan, M. (2019). Development and validation of a multiplex, real-time PCR assay for *Babesia rossi* and *Babesia vogeli*. *Ticks Tick Borne Dis*, *10*, 421-432.
105. Tyler, J. S., Treeck, M., & Boothroyd, J. C. (2011). Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends. Parasitol*, *27*, 410-420.
106. Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Vet Parasitol*, *138*, 3-10.
107. Uilenberg, G., Franssen, F., Perié, N., & Spanjer, A. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q*, *11*, 33-40.
108. Valdez-Espinoza, U. M. (2015). *Identificación de epítomos conservados en aislados de Babesia bigemina*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
109. Vargas-Hernández, G., André, M., Faria, J., Munhoz, T., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Vet Parasitol*, *186*, 254-260.
110. Vega, C. A., Buening, G. M., Rodriguez, S. D., Carson, C. A., & McLaughlin, K. (1985). Cryopreservation of *Babesia bigemina* for in vitro cultivation. *Am. J. Vet. Res.*, *46*, 421-423.
111. Wang, J., Zhang, J., Kelly, P., Zheng, X., Li, M., You, J., . . . Wang, C. (2018). First description of the pathogenicity of *Babesia vogeli* in experimentally infected dogs. *Vet Parasitol*, *253*, 1-7.
112. Welzl, C., Leisewitz, L., Jacobson, L., Vaughan-Scott, T., & Myburgh, E. (2001). Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, *72*, 158-162.
113. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134.
114. Yisaschar-Mekuzas, Y., Jaffe, C., Pastor, J., Cardoso, L., & Baneth, G. (2013). Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for

six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Vet Parasitol*, 191, 367-373.

115. Yokoyama, N., Suthisak, Boonchit., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sugimoto, C., & Igarashi, I. (2002). Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite Rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. *Infect. Immun*, 70, 5822-5826.
116. Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol*, 138, 22-32.
117. Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol Res*, 84, 544-548.
118. Zhang, Q., Wang, P., Kim, Y., Haste-Andersen, P., Beaver, J., Bourne, P. E., . . . Peters, B. (2008). Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Research*, 36, 513-518.
119. Zhou, J., Jia, H., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., & Xuan, X. (2007). *Babesia gibsoni* rhoptry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen. *Vet. Parasitol.*, 145, 16-20.
120. Zhou, J., Yang, J., Zhang, G., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., & Xuan, X. (2006). *Babesia gibsoni*: An apical membrane antigen-1 homologue and its antibody response in the infected dogs. *Exp. Parasitol*, 114, 329-333.
121. Zygnier, W., Gojska, O., Rapacka, G., Jaros, D., & Wedrychowicz, H. (2007). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet Parasitol*, 145, 146-151.
122. Zygnier, W., Gójska-Zygnier, O., Bańska, P., & Długosz, E. (2014). Increased concentration of serum TNF alpha and its correlations with arterial blood pressure and indices of renal damage in dogs infected with *Babesia canis*. *Parasitol Res*, 113, 1499-1503.

11. ANEXO 1

A continuación, se adjuntan las secuencias obtenidas de los genes y las proteínas de AMA-1 y RAP-1 de *B. vogeli* en formato FASTA.

>*ama1.B.vogeli* aislado Tamaulipas secuencia de nucleótidos parcial

```
CTCCAGAGGCAGAACTCGTCCAAAGGAAGATGAGACCCGCATTTACCTGTTTCAGCAGAGGAC
CTCATCAAGTGGAAGTACGAGTAACGATGTTGCCAACTGTGCCGAATACGCCAGCAACATAGTT
CCCCAGTCTGACAAGGACACTAAATATAGGTACCCGTTTCGTTTACGACAGCAAGGAGGAGATGT
GCCACATCTATACACCCCAATCCAGTACAACCAGGGTTCCAGGTATTGTGACAACGACGGTTCG
AAGGAGGAAGGAGCCAGCTCCTTGCTCTGTATGAGACCACTGAAGAGCGACATCGACTCGCATC
TCTACTACGGTCTGCCAATCTTGACCCACCGGGAAGAAAAGTGTCCATGTCACCAGTCAGAAA
TGCTATATTCGGAAGGTGGTCCA
```

>AMA-1.*B.vogeli* aislado Tamaulipas secuencia de aminoácidos parcial

```
MRPAFHLFQRTSSSGSTSNDVANCAEYASNIVPQSDKDKTKYRYPFVYDSKEEMCHIYTPQSSTTRV
PGIVTTTTVRRRKEPAPCSV
```

>RAP-1.*B.vogeli* aislado Tamaulipas secuencia de nucleótidos completa

ATGAGGCTAGTGAAACAAGCTATCGGCACCCTGGTGTTAGCATTACCACTTCTGCTTTTGCATA
CAAGGTTCCAGGTTTTGGCGGTATTCTTTCTAAATCAGATGGAGCCGAAAAGACCTTGTCTACCC
TTCTTAACGTTGACGCATCGACGAGAGCGGCTTTAGAAGGCTACAGAATGAATGCTGCTATGGC
AAACTTTTCAAACGGTTCGACAGGGAAGAGGTGGTGGAAAGCTGTCTGTGGAAACATCGCAGAGGA
GACTGAATGTCAGAAGAGCGTAGCTGAGTATGTTGAAAGCTGCGTCAGGTACGACTGCTTTAGC
ATTGAGAACCAGAAGTACCCTCAAGAGAAGGAATACCAGCCGCTGACCCTTCCCAACCCTTATC
AATTGGAGGCCGCGTTCTATGTCTTCAGAAACAGTGAATCAAACCAATTA AAAACCCAACGGA
AGCTTTCTGGATGCGTTTTTCGTCACGGCGGACGTTATGGCGCCTATCACAATTCCTGGTGAATA
TTCTATATAAAAACCTCAGCGATAGCATGGTGGATGATAACCTCGAAGGTTTCGTACGCAAATA
TGCTTACATGGCCACCATGTATTACAAGACATACACCGCTTTGGATGTTGTA AATGCCAGGATCA
TTAACAAAATTGCCTTCTCCCGCCACTTGTTCCGGAAGGCAGATTAGGAACGCCCTAACGAATAT
AATCCGCAGTAACATTCCCGAAGACTTCGGCAAGTACAACGTTGACCGCCTGAGGCACGTGATG
GGTGGCTACGAGGAGTACATGATGAAGCAAGTACCATCTCTTCCAAATTTCCGCAAGAAATACG
CGGGAATGGTGGTAAAGAGTTTAATTAAGAATGTGGGAGCTTACCAGAAGCAGCCATGGTTCAA
AAAGCTGAACAATCAAATAAGAACTTCTTCGTGAACAAGATCCATGAACCTACTAAGGAGTTC
TTCGTGAACAAGATCCATGAACCCACCAAGGAGTTCTTCGTGAACAAGATCCATGAACCCACCA
AGGAGTTCTTCGTGAACAAGCTCCATGAACCCACCAAGGAGTTCTTCGTGAACAAGCTCCATGA
ACCCACCAAGGAGTTCTTCTTAACATGGTACCCGGGGCATTCCAGAAGATATCTGAAAAGGCA
GGTAGACACCTGAGAAGTTCTAAGACAGTTGTCCCTGAAGACGAGCCCTCATCGTCTCTGGAAA
ATGAGGCTGTAGAGGATGGTCAACTTACAATGGGGGATGTGACCGATTTTGAAATGGCGACTCC
CACCTATGAGCAGGGCTCACAGGAGAGTTTAAATGAAGTTGGTAACGAATAA

>RAP-1.*B.vogeli* aislado Tamaulipas secuencia de aminoácidos completa

MRLVKQAIGTLVLAFTTSAFAYKVPFGGILSKSDGAEKTLSTLLNVDASTRAALEGYRMNAAMAN
FSNGREEVVEAVCGNIAEETECQKSVAEYVESCVRDYDCFSIENQKYPQEKEYQPLTLPNPYQLEAA
FYVFRNSESNPIKNPTEAFWMRFRHGGRYGAYHNFLVNILYKNLSDSMVDDNLEGFVRKYAYMAT
MYYKTYTALDVVNARIINKIAFSRHLFGRQIRNALTNIIRSNIPEDFGKYNVDRLRHVMGGYEEYMM
KQVPSLPNFAKKYAGMVVKS LIKNGVAYQKQPWFKKLNNQIRNFFVNKIHEPTKEFFVNKIHEPTKE
FFVNKIHEPTKEFFVNKLHEPTKEFFVNKLHEPTKEFFSNMVPGAFQKISEKAGRHLRSSKTVVPEDEP
SSSLENEAVEDGQLTMGDVTD FEMATPTYEQGSQESLNEVGNE