



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

**“Determinación del efecto antimicrobiano y el mecanismo de acción de dos péptidos
catelicidina de *Crotalus aquilus* contra *Babesia* spp.”**

Tesis

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Presenta:

M. en C. Edwin Esaú Hernández Arvizu

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Secretario

Dra. Gloria de la Luz León Ávila

Vocal

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía

Suplente

Dr. Bruno Tonatiuh Rivas Santiago

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Septiembre, 2024.

México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Dedicatorias

A Dios, a mi familia y amigos.

A la memoria de mis abuelos José y doña Chucha, de mi tía abuela Candelaria y mi tía María.

A la memoria de mis tíos abuelos Enedina y Antonio.

A la memoria de mi amigo Fernando.

A mi sobrino, Armin, que ha llenado de luz a nuestra familia desde su llegada al mundo. Eres un niño amado y muy afortunado.

Agradecimientos

A Dios, por la oportunidad de estar aquí y por rodearme de las magníficas personas que ha puesto a lo largo de mi andar por la vida.

A mis padres, mis héroes y ejemplos a seguir, por todo el amor y la paciencia, porque siguen siendo un grandísimo apoyo. Sin ustedes, nada habría sido posible. Son mi inspiración. Los amo muchísimo.

A mis hermanos, Pedro, Pablo y Octavio, que son el tesoro más bello que tengo, porque la vida hubiera sido muy distinta y aburrida sin su presencia. Gracias por la unión, la amistad, la confianza, las risas y todas nuestras aventuras. Les agradezco, porque mi existencia se ilumina con su compañía, porque también son un ejemplo a seguir para mí. Los amo con el alma. Estoy orgulloso de ustedes y los admiro mucho.

A toda mi familia, por el incondicional apoyo y sus incesantes muestras de afecto. Mil gracias. Los tengo en mi corazón.

A América, la persona más preciosa que he conocido, por estar durante todo este proceso, a pesar de las circunstancias y las complicaciones. Esto es posible gracias a ti, y no tengo como agradecerte tanto que has dado. Gracias por ser así, un encanto, lo que hace que cada día de mi vida sea hermoso; gracias por el amor, la confianza y el respeto, por ser mi más grande motivo y mi ídola siempre. Te amo, con mi ser completo, te adoro y eres mi más grande orgullo. Eres la mujer más hermosa que mis ojos han podido mirar.

A mi mejor amigo Emmanuel, por ser la amistad más preciada, divertida y de confianza que existe. A pesar de la distancia y el tiempo, siempre serás con quien he vivido los momentos más grandiosos y las locuras más anecdóticas. Te agradezco cada momento de convivencia. Te quiero un chingo.

A mis amigos Roberto, Carlos Fernando y Carlos Paz, por la convivencia y los años de amistad. Saben que los quiero mucho.

A mi hermanita, Leslie, por ser una luz en mi vida, por la confianza y la motivación. Estoy orgulloso de ti, tienes un futuro brillante. Te amo.

A mis amigos de toda la vida, Abel, Jesús, Libertad, Mariel. Richie, Salecita, Luis CV, Carina y Brenda, por seguir aquí. Atesoro mucho su amistad, se les quiere,

Al Dr. Juan Mosqueda, por todo su apoyo durante estos años, por su guía y su confianza. Ha sido un honor y un placer ser parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Angelina Rodríguez Torres, por su ayuda con los experimentos en el laboratorio, por su disposición y por su participación en los textos publicados.

Al Dr. Carlos Vega, por el tiempo y las lecciones acerca del cultivo celular, por su paciencia y disponibilidad, además de su apoyo en el artículo y la tesis.

A la Dra. Gloria León, por su tiempo y disponibilidad para resolver dudas acerca de los protocolos experimentales y por aceptar ser parte de este comité.

Al Dr. Bruno Rivas, por su participación como sinodal y por sus recomendaciones.

A mis amigos del curso de inmunidad innata, César, Cristian, Juve, Eli, Trini, Mezтли, Juan, Nancy, Emmanuel, Edna, Antonio y Estefany, ha sido un enorme placer coincidir con ustedes. Se les aprecia y admira mucho. Todo el éxito en su camino.

A Jacqueline Rivera, por su sincera amistad, por el apoyo, por las largas y entretenidas conversaciones y por estar, pese a la distancia, siempre con disposición. Ha sido muy lindo encontrarte en este proceso, te quiero mucho.

A mis amigos del laboratorio, Alma, Daniel, Aldo, Mayra, Charlie, Chyntia, Valeria, Sergio, Mariana, Andrés, Diego, Martina, Juliana, Iván, Alejandra, Mane, por toda su ayuda en todos los aspectos posibles. Sin ustedes, no habría llegado a este punto; es bonito coincidir con personas tan talentosas y agradables. Los quiero mucho y siempre ocuparán un lugar muy importante en mis pensamientos. Son mi bonita familia LINVAS.

A mis estudiantes, por motivarme a dar lo mejor siempre, por la energía que transmiten y por permitirme aprender y crecer personal y profesionalmente.

A todas las personas que me apoyaron durante la realización de mis estudios de doctorado y que, por descuido, pude haber omitido en este apartado. Estoy consciente y llevo en el corazón todos sus esfuerzo y muestras de apoyo. Les aprecio enormemente.

A las personas que decidieron tomar un camino distinto al mío, sin embargo, que estuvieron y fueron parte importante de mi crecimiento. Les deseo mucho éxito y una vida llena de aprendizaje. Gracias por lo que dejaron en el tiempo que compartimos vereda.

I would like to express my heartfelt gratitude to Kawazu-sensei, Asada-sensei and all the researchers at NRCPD for the invaluable support provided during my time in Obihiro, Japan, to conduct the experiments for this thesis. I am deeply grateful for the resources, guidance, and opportunities you offered, which have been essential to the development of my work. Thank you for your generosity and commitment to fostering academic growth.

Special thanks are extended to my wonderful friends at the NRCPD: Adrian, June, Fai, Kevin, Nada, Atefeh, and Noriko. Thank you all so much for everything you did for me during my stay. Your kindness and support made my time there unforgettable, and I truly cherish the moments we shared. I hope to see you all again someday.

My heartfelt thanks also go to my friends Ryo, Kiyo, Mimaki, Yuuki, Ryuichi, and Mr. Yoshio for making me feel at home with their incredible hospitality and kindness. I am grateful for the wonderful memories and for your invaluable friendship. I truly hope we can meet again someday.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	14
II.	ANTECEDENTES.....	16
	Babesiosis.....	16
	Terapéutica de la babesiosis.....	17
	Péptidos antimicrobianos.....	17
	Actividad de péptidos antimicrobianos contra protozoarios.....	18
	Efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos.....	20
	Mecanismos de acción e inducción de muerte celular en protozoarios por efecto de los péptidos antimicrobianos.....	22
	Actividad hemolítica y citotóxica de catelicidinas de serpientes.....	27
	Péptidos antimicrobianos caracterizados en <i>Crotalus aquilus</i>	28
III.	HIPÓTESIS.....	29
IV.	OBJETIVOS.....	29
	Objetivo General:.....	29
	Objetivos específicos.....	29
	Justificación.....	29
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
	Ensayo de citotoxicidad por protocolo con MTT.....	30
	Cultivo de <i>Babesia</i> spp.....	32
	Selección de bovino donador para el mantenimiento de los cultivos primarios.....	35
	Análisis <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana.....	36
	Evaluación del mecanismo de acción de la Aquiluscidina.....	41
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
	Ensayo de citotoxicidad.....	43
	Actividad antibabesia de los péptidos.....	44
VII.	CONCLUSIONES.....	81
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Análisis comparativo de las IC ₅₀ obtenidas para la Aquiluscidina y otros compuestos evaluados contra Babesia spp.	59
--	----

Índice de Figuras

Figura 1. Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo) para el ensayo de citotoxicidad de las catelicidinas de <i>Crotalus aquilus</i> . Se utilizaron las concentraciones indicadas con números (en rango μM) en los espacios correspondientes Vcn-23 (azul) y Aquiluscidina (rosado). En color gris, se ubican los pozos sometidos a tratamiento con Tritón 100X. Se sembraron 15,000 células embrionarias de riñón humano (HEK293). Med: Medio estéril, sin células. C-: Células y medio, sin tratamiento.	31
Figura 2. Esquematización de la preparación del medio completo para cultivo celular. Se utilizó el M199 base, preparado previamente, y se añadió un volumen correspondiente al 40% de suero fresco bovino. Después se procedió con la incubación para la prueba de esterilidad.....	33
Figura 3. Representación del proceso realizado para comenzar el cultivo in vitro de <i>Babesia bigemina</i>	34
Figura 4. Acomodo del sembrado del cultivo de <i>Babesia</i> spp. en placa de 24 pozos.	35
Figura 5. Esquema del procedimiento experimental utilizado para evaluar la actividad antibabesia in vitro de los péptidos Aquiluscidina y Vcn-23.	36
Figura 6. Cronograma de los experimentos para evaluar el efecto antimicrobiano de los péptidos de <i>C. aquilus</i> contra <i>Babesia</i> spp.	37
Figura 7. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra <i>B. bigemina</i> (aislado de Michoacán). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH ₂ O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con dipropionato de imidocarb. Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades μM	38
Figura 8. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra <i>B. bovis</i> (aislado de Puebla). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH ₂ O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con dipropionato de imidocarb. Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades μM	39
Figura 9. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra <i>B. bovis</i> (cepa Texas) y <i>B. ovata</i> (cepa Miyake). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH ₂ O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); C-DMSO, control negativo con DMSO (diluyente utilizado para reconstituir el diaceturato de dimanezo, se usó el mismo volumen que el requerido para el tratamiento con	

este fármaco); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con diaceturato de diminazeno (DA). Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades μM	40
Figura 10. Porcentaje de eritrocitos infectados (iRBC%) por <i>B. bigemina</i> (aislado de Michoacán) resultantes a las 96 h de evaluación. a) Actividad de la Aquiluscidina y b) Actividad del Vcn-23. Se muestran las medias de los tratamientos y la desviación estándar de cada triplicado. En cada gráfica se muestran únicamente las 3 mayores concentraciones utilizadas de cada péptido, los tres controles: Control: sin tratamiento, Control H_2O : se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido, Imidocarb: tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$	47
Figura 11. Resultado del ensayo contra <i>B. bovis</i> (aislado de Puebla) Porcentaje de eritrocitos infectados (iRBC%) observados durante los 4 días de evaluación. a) Actividad de la Aquiluscidina y b) del Vcn-23. Se muestran las medias de los tratamientos y la desviación estándar de cada triplicado. En cada gráfica se representan todas las concentraciones utilizadas de cada péptido, los tres controles: Control: sin tratamiento, Control H_2O : se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido, Imidocarb: tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	49
Figura 12. Actividad de los péptidos contra <i>B. ovata</i> (cepa Miyake). a) Efecto inhibitorio de la Aquiluscidina durante los 4 días de evaluación. b) Ensayo para la determinación de la IC_{50} de la Aquiluscidina contra <i>B. ovata</i> , se muestran los resultados obtenidos a las 96 h, la IC_{50} se expresa en unidades μM . c) Regresión no lineal para el cálculo de la IC_{50} de la Aquiluscidina contra <i>Babesia ovata</i> . d) Actividad del Vcn-23 contra de <i>B. ovata</i> . En cada gráfica se representan los promedios y la desviación estándar de los triplicados de cada tratamiento con los péptidos y los controles: Control, sin tratamiento; Control H_2O , se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido; Control DMSO, mismo volumen que el tratamiento con DA; DA, diaceturato de diminazeno, tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. iRBC%: porcentaje de eritrocitos infectados. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$	52
Figura 13. Actividad de los péptidos contra <i>B. bovis</i> (cepa Texas). a) Ensayo para la determinación de la IC_{50} de la Aquiluscidina contra <i>B. bovis</i> , se muestran los resultados obtenidos a las 96 h, la IC_{50} se expresa en unidades μM . b) Regresión no lineal para el cálculo de la IC_{50} de la Aquiluscidina contra <i>Babesia bovis</i> . d) Actividad del Vcn-23 contra de <i>B. bovis</i> . En cada gráfica se representan los promedios y la desviación estándar de los triplicados de cada tratamiento con los péptidos y los controles: Control, sin tratamiento; Control H_2O , se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido; Control DMSO, mismo volumen que el tratamiento con DA; DA, diaceturato de diminazeno, tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. iRBC%: porcentaje de eritrocitos infectados. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$	55

Figura 14. Morfología de <i>B. ovata</i> observada después del tratamiento con IC ₅₀ , 2xIC ₅₀ y 4xIC ₅₀ de Aquiluscidina a los tiempos en los que se notó la actividad de los péptidos sobre el parásito. Además del encogimiento de las estructuras correspondientes a los merozoitos en comparación con el control sin tratamiento, se evidencia una mayor condensación de la cromatina en las células afectadas por la Aquiluscidina. Tinción Giemsa. 100X. [Fotografía].....	66
Figura 15. Morfología de <i>B. bovis</i> observada ~28 minutos después del tratamiento con 50 μM de Aquiluscidina. Se destaca un encogimiento de las estructuras correspondientes a los merozoitos en comparación con el control sin tratamiento. Tinción Giemsa. 100X. [Fotografía].....	67
Figura 16. Resultado de la evaluación de la proteína con dominio de caspasa de <i>B. bovis</i> (T2Bo) en el servidor de String. a) Interactoma predicho, se muestran como círculos de varios colores los nodos participantes en la interacción. b) Procesos biológicos en los que se ven implicados los interactores predichos. c) Relación de elementos presentes en los conjuntos génicos de <i>B. bovis</i> (T2Bo) después de la búsqueda con el proceso biológico de “apoptosis”, se observa el número de proteínas cuya descripción podría relacionarse con este tipo de muerte celular.	71
Figura 17. Control de fibroblastos sin tratamiento incubados durante 1.5 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.....	74
Figura 18. Tratamiento de fibroblastos con 100 μM de H ₂ O ₂ durante 1.5 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.	75
Figura 19. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a fibroblastos después de 1.5 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico (prueba de t). ****, p< 0.0001.....	75
Figura 20. Control de <i>B. bigemina</i> sin tratamiento incubados durante 4 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.....	76
Figura 21. Tratamiento de <i>B. bigemina</i> con 100 μM de H ₂ O ₂ durante 4 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.	76
Figura 22. Tratamiento de <i>B. bigemina</i> con 20 μM de Aquiluscidina durante 4 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila	

inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.	77
Figura 23. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a <i>B. bigemina</i> después de 4 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico ANOVA con prueba de Tukey. ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$	77
Figura 24. Control de <i>B. bigemina</i> sin tratamiento incubados durante 24 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.....	78
Figura 25. Tratamiento de <i>B. bigemina</i> con 14.48 μM de Aquiluscidina durante 24 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.	78
Figura 26. Tratamiento de <i>B. bigemina</i> con 20.70 μM de Aquiluscidina durante 24 h a 37 °C y 5% de CO ₂ . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.	79
Figura 27. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a <i>B. bigemina</i> después de 24 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico ANOVA con prueba de Tukey. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$	79
Figura 28. Gel de agarosa para evaluación de la integridad del ADN posterior a la incubación con el peróxido de Hidrógeno (inductor de apoptosis) y 50 μM de Aquiluscidina durante 7 h.	80

RESUMEN

Entre las enfermedades zoonóticas causadas por protozoos, cuya importancia ha incrementado en años recientes, se encuentra la babesiosis, la cual es causada por distintas especies del género *Babesia*. El incremento de la tasa de presentación en humanos, la presencia de resistencia a fármacos, el impacto en el sector ganadero y los efectos secundarios asociados a la terapéutica de la enfermedad, han propiciado la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Para este fin, se han propuesto los péptidos de defensa del hospedante (HDPs), cuya efectividad ha sido demostrada contra otras clases de protozoos intracelulares. En este grupo de moléculas se encuentran las catelicidinas, una de las familias más importantes identificada en animales. La Aquiluscidina, catelicidina de *Crotalus aquilus*, y el Vcn-23, su derivado, mostraron previamente una actividad antibacteriana a bajas concentraciones. El objetivo de este trabajo fue analizar el potencial antibabesia de estos péptidos. El Vcn-23 no tuvo efecto significativo contra ninguna de las especies evaluadas. Sin embargo, la Aquiluscidina mostró actividad dosis dependiente contra *B. ovata* (cepa Miyake) y *B. bovis* (cepa Texas) en ensayos libres de suero, teniendo una IC₅₀ de 14.48 y 20.70 µM, respectivamente. Incluso, fue capaz de disminuir la cantidad de parásitos en cultivo de *B. bigemina* (aislado de Michoacán); no obstante, no presentó efecto contra *B. bovis* (aislado de Puebla). Los últimos dos aislados fueron cultivados en medio con 40% de suero bovino. Posteriormente, el tratamiento con Aquiluscidina provocó alteraciones morfológicas en los parásitos, principalmente perceptibles como disminución del tamaño celular. Además, ocasionó la formación de especies reactivas de Oxígeno, lo que estaría relacionado con la muerte celular del microorganismo. En conclusión, la Aquiluscidina tiene acción antibabesia, la cual se ve afectada por la adición de suero al medio de cultivo. Además, induce cambios morfológicos en el parásito, conduciendo a su eliminación. Estos hallazgos indican que este péptido tiene potencial para investigarse como alternativa para el diseño de compuestos dirigidos al tratamiento de la babesiosis.

Palabras clave: Péptidos de defensa del hospedante, Aquiluscidina, *Babesia*, *Crotalus aquilus*.

ABSTRACT

Among zoonotic diseases caused by protozoa, which have gained increasing importance in recent years, Babesiosis is one of them; caused by various species of the genus *Babesia*. The rise in human infection rates, the presence of drug resistance, the impact on the livestock sector, and the side effects associated with this disease's therapy have prompted the search for new treatment alternatives. In this context, host defense peptides (HDPs) have been proposed, whose effectiveness has been demonstrated against other classes of intracellular protozoa. Within this group of molecules, cathelicidins are among the most important families identified in animals. Aquiluscidin, a cathelicidin from *Crotalus aquilus*, and Vcn-23, its derivative, have previously shown antibacterial activity at low concentrations. The aim of this study was to analyze the antibabesial potential of these peptides. Vcn-23 had no significant effect against any of the evaluated species. However, Aquiluscidin showed dose-dependent activity against *B. ovata* (Miyake strain) and *B. bovis* (Texas strain) in serum-free assays, with an IC₅₀ of 14.48 and 20.70 μM, respectively. It was even capable of reducing the number of parasites in *B. bigemina* cultures (Michoacán isolate); however, it had no effect against *B. bovis* (Puebla isolate). The latter two isolates were cultured in a medium containing 40% bovine serum. Subsequently, treatment with Aquiluscidin induced morphological alterations in the parasites, primarily noticeable as a reduction in cell size. Additionally, it caused the formation of reactive oxygen species, which might be related to the microorganism's cell death. In conclusion, Aquiluscidin has antibabesial action, which is affected by the addition of serum to the culture medium. Furthermore, it induces morphological changes in the parasite, leading to its elimination. These findings indicate that this peptide has potential for investigation as an alternative for the design of compounds aimed for treating babesiosis.

Keywords: Host defense peptides, Aquiluscidina, *Babesia*, *Crotalus aquilus*

I. INTRODUCCIÓN

Babesia spp. ocasiona la enfermedad conocida como babesiosis, la cual impacta en la salud humana y animal, caracterizándose por la presentación de anemia y fiebre, principalmente ((Ristic, 1981; Wormser *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2019). En el ámbito veterinario, las drogas utilizadas como tratamiento son el diacetato de diminazeno y el dipropionato de imidocarb, medicamentos que tienden a causar efectos no deseados y con tiempos elevados de retiro (Collet, 2000; Miller *et al.*, 2005; Vial & Gorenflot, 2006). En casos de babesiosis humana, existen diversas estrategias terapéuticas, las cuales no han demostrado una completa eficiencia contra estos microorganismos (Krause, 2019).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs), llamados también péptidos de defensa del hospedante (HDPs), son componentes pertenecientes a la respuesta inmune innata de varios organismos. Principalmente se han encontrado en especies animales y se han estudiado como alternativas para tratar enfermedades infecciosas, debido a su acción microbicida e inmunomoduladora (Brogden, 2005; Hancock *et al.*, 2016, Kumar, 2018). Algunas de estas moléculas han mostrado actividad contra distintos géneros de protozoos intracelulares, como *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Lynn *et al.*, 2011; Bandeira *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019).

Una catelicidina identificada en la serpiente *Crotalus aquilus*, víbora de cascabel oscura de Querétaro, denominada Aquiluscidina y su péptido derivado (Vcn-23) demostraron efecto antimicrobiano contra cepas bacterianas de laboratorio y aislados clínicos humanos. A su vez, ambos componentes no fueron significativamente activos contra glóbulos rojos de rata, contribuyendo a la idoneidad de estas moléculas para utilizarse como candidatos farmacológicos (Hernández-Arvizu *et al.*, 2023).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto antiparasitario de la Aquiluscidina y el Vcn-23 contra 3 especies de *Babesia*. A pesar de que el Vcn-23 no tuvo actividad antibabesia, la Aquiluscidina tuvo acción inhibitoria contra *B. bovis* (cepa Texas), *B. ovata* (cepa Miyake) y *B. bigemina* (aislado de Michoacán). El efecto de este péptido se vio limitado por la presencia de suero en el medio de cultivo celular. La actividad de la Aquiluscidina se caracterizó por cambios en la morfología celular, los cuales fueron perceptibles a los pocos

minutos, y por el incremento en la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS), lo que estaría vinculado con la muerte celular del parásito.

II. ANTECEDENTES

Babesiosis

La babesiosis es una enfermedad causada por parásitos intraeritrocíticos del género *Babesia*. Hasta la fecha se conocen más de 100 especies de *Babesia* afectando animales domésticos y silvestres, siendo aquellas que infectan al ganado las que representan un mayor impacto económico (Galay *et al.*, 2012; Krause *et al.*, 2019). Recientemente se ha incrementado el número de casos de babesiosis en humanos, lo que ha llevado a considerarla una zoonosis de importancia cada vez mayor (Homer *et al.*, 2000, como se citó en Tsuji *et al.*, 2007; Krause, 2019). Los parásitos del género *Babesia* son transmitidos por garrapatas (Smith & Kilborne, 1893), además, una de las principales vías de infección en humanos es la transfusión sanguínea (Fang & McCullough, 2016), también se han presentado casos de transmisión vertical en humanos (Krause & Vannier, 2012) y ratones (Bednarska *et al.*, 2015).

En muchas ocasiones, los pacientes infectados no presentan síntomas de la enfermedad (Fang & McCullough, 2016), pero ciertos factores predisponen a la complicación del proceso infeccioso (Vannier *et al.*, 2015). La multiplicación del parásito y la posterior liberación de los merozoitos, provocan la lisis de los eritrocitos (Vial & Gorenflot, 2006; Beugnet & Moreau, 2015; Vannier *et al.*, 2015), por lo que el curso de la enfermedad comprende, de manera principal, cuadros de anemia, fiebre, hemoglobinuria y fatiga (Ristic, 1981; Wormser *et al.*, 2006), así como afecciones en órganos en pacientes infectados con estos parásitos intraeritrocíticos (Shimamoto *et al.*, 2012; Okla *et al.*, 2014; Nassar & Richter, 2017; Esmailnejad *et al.*, 2018; Reuling *et al.*, 2018). En infecciones causadas por *Babesia rossi* en caninos, además de anemia e ictericia, se reportó un aumento de las enzimas hepáticas en aquellos individuos que murieron debido a la enfermedad; del mismo modo, las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva y amiloide sérico A) incrementaron su concentración sérica en los perros diagnosticados con la infección ocasionada por este parásito. También se observó una disminución en la cantidad de leucocitos totales, con descenso en el conteo de algunos tipos celulares específicos, relacionado con la poca cantidad de la quimiocina IL-8, en comparación con los caninos no

infectados. Las concentraciones de la IL-10 y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) fueron mayores en los animales infectados que en aquellos que no tenían la enfermedad y también se reportó que los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-6 y MCP-1 eran más elevados en aquellos individuos que no sobrevivieron a la infección, lo que llevó a concluir que la respuesta inflamatoria desmedida, causada por la incremento de estas citocinas, provoca severas complicaciones en los pacientes con esta afección (Goddard *et al.*, 2016).

Terapéutica de la babesiosis

Los medicamentos más usados para el tratamiento de la babesiosis en varias especies animales son el diaceturato de diminazeno y el dipropionato de imidocarb (Vial & Gorenflot, 2006). En el caso del uso del diminazeno, existe evidencia de tiempos de eliminación largos y de reacciones secundarias como diarrea (Miller *et al.*, 2005), anafilaxia y signología nerviosa (Collet, 2000). Cepas de *B. gibsoni* han desarrollado resistencia a la acción de este medicamento (Wickramasekara *et al.*, 2012, como se citó en Rajapakshage *et al.*, 2012). Adicionalmente, un elevado porcentaje de médicos veterinarios han detectado dolor y reacciones en el sitio de inyección, así como la aparición de signos gastrointestinales en los caninos que son tratados con imidocarb (Collet, 2000).

La babesiosis humana se trata con combinaciones de atovacuona/azitromicina o clindamicina/quinina, sin embargo, personas con trastornos inmunitarios requieren terapias de soporte, incluyendo transfusiones sanguíneas (Krause, 2019). Efectos adversos se han reportado en el caso de ambas terapias, siendo más frecuentes en el uso de clindamicina/quinina (Vannier *et al.*, 2015; Krause, 2019).

Péptidos antimicrobianos

Entre los mecanismos de la respuesta inmune innata se encuentran los péptidos antimicrobianos, elementos formados por cadenas cortas de aminoácidos, cargados positivamente (en la mayoría de los casos), anfipáticos y con estructuras secundarias características (Broden, 2005; Owen *et al.*, 2014). Estas moléculas se han identificado en

una gran cantidad de organismos y presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Zhang & Gallo, 2016), en los animales son sintetizados por células inmunitarias y epiteliales (Tizard, 2009; Hancock *et al.*, 2016).

Existen diferentes clasificaciones para agrupar a todos los péptidos que se han caracterizado hasta el momento, una de las más extendidas en cuanto a uso es la basada en sus propiedades estructurales, las cuales se relacionan directamente con la secuencia de aminoácidos que los configura. Considerado lo descrito anteriormente, se tienen 3 grupos en esta clasificación: los que adoptan una estructura alfa helicoidal, aquí se localizan péptidos como el buforin II (sapo), la melitina (abeja) y la LL-37 (humano); una segunda categoría es la de los péptidos que contienen puentes disulfuro por la presencia de residuos de cisteína pareados, teniendo a las protegrinas (cerdo) y defensinas (mamíferos en general) como principales exponentes; por último, se considera a aquellos péptidos cuya estructura es flexible, entre los que se encuentran las indolicinas (bovinos), histatinas (humanos) y fragmentos de otros péptidos como el Ctn-15-34 derivado de la crotalicidina de la víbora de cascabel sudamericana *C. durissus* (Kumar *et al.*, 2018).

Debido a su potencial antimicrobiano y a las ventajas que representan en comparación con tratamientos farmacológicos de otra naturaleza, tales como un espectro de actividad más amplio, menor toxicidad y sus interacciones con el sistema inmunitario; el estudio de sus propiedades y mecanismos se ha extendido de manera reciente (Mookherjee *et al.*, 2020). Se han diseñado péptidos de secuencias cortas, los cuales se derivan de péptidos antimicrobianos nativos, y cuya función más importante es la actividad inmunomoduladora, a estos compuestos se les conoce como “péptidos reguladores de defensa innata (IDR, por sus siglas en inglés)” (Hancock *et al.*, 2016). El beneficio de estos derivados sobre los péptidos nativos es que tienden a ocasionar menores efectos no deseados (Mookherjee *et al.*, 2020).

Actividad de péptidos antimicrobianos contra protozoarios

Se ha sugerido el uso de péptidos antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoarios, esto debido a su amplio espectro, su baja toxicidad contra células animales sanas y su poca probabilidad de generar resistencia, (Lacerda *et al.*,

2016; Giovati *et al.*, 2018). Se ha caracterizado el efecto de diversos péptidos contra *Leishmania amazonensis* (Salay *et al.*, 2011), *Trypanozoma cruzi* (Bandeira *et al.*, 2018) y *Toxoplasma gondii* (Vetrivel *et al.*, 2018), entre otros parásitos (Giovati *et al.*, 2018).

Estudios de péptidos caracterizados en artrópodos transmisores de parásitos se han enfocado en evaluar su actividad antiprotozoaria, tal es el caso de la defensina denominada longicin, identificada a partir del intestino de la garrapata *Haemaphysalis longicornis* (Tsuji *et al.*, 2007). Tanto el péptido nativo como uno de sus derivados (P4) resultaron eficientes al inhibir el crecimiento de varias especies de *Babesia* en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Tsuji *et al.*, 2007; Galay *et al.*, 2012).

LZ-1, un péptido derivado de la catelicidina de *Bungarus fasciatus*, un elárido asiático, demostró tener capacidad para suprimir la etapa en sangre de *Plasmodium falciparum* a bajas concentraciones. Además, presentó actividad antimalaria *in vivo* contra *Plasmodium berghei*, así como efectos antiinflamatorios en modelos murinos, disminuyendo el daño hepático provocado por la presencia del parásito; se reportó también un decremento en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α e IFN- γ) y el mantenimiento de los niveles de IL-10, una citocina antiinflamatoria. El mecanismo de acción determinado para este péptido fue el impedimento de producción de ATP por inhibición de la actividad de la enzima piruvato cinasa en los eritrocitos infectados con el parásito (Fang *et al.*, 2019).

El péptido Ctn (catelicidina de *Crotalus durissus*) mostró tener actividad *in vitro* contra los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Tanto el péptido completo, como dos de sus derivados, Ctn [1-14] y Ctn [15-34], tuvieron sus concentraciones efectivas medias máximas (EC₅₀) contra la forma de tripomastigote del parásito de 0.22, 33.1 y 9.5 μ M, respectivamente. La catelicidina completa (Ctn), a baja concentración (0.22 μ M), disminuyó la cantidad de células LLC-MK2 infectadas por el amastigote de *T. cruzi*. Así mismo, la actividad contra la forma de epimastigote fue reportada a concentración de 4.47 μ M, siendo más efectivo que la LL-37 (catelicidina humana) y el benznidazol, medicamento de primera elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de barrido se determinó que Ctn causa muerte por necrosis en el epimastigote, esto debido a la detección del aumento de la permeabilidad y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Además, se detalló el incremento de especies

reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución del potencial transmembranal mitocondrial en los parásitos tratados con Ctn (Bandeira *et al.*, 2018). De forma similar se concluyó que la batroxidina, catelicidina descubierta en la serpiente *Bothrops atrox*, tenía el mismo mecanismo de acción contra las distintas formas de desarrollo de *T. cruzi* (Mello *et al.*, 2017).

La melitina, el componente antimicrobiano del veneno de abeja, demostró potente acción antimicrobiana contra amastigotes, promastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. Diferentes mecanismos para la eliminación de las distintas etapas de desarrollo del parásito fueron observados en el tratamiento con el péptido. La melitina ocasionó modificaciones en la morfología externa de epimastigotes y tripomastigotes, entre las que se encontraron la formación de vesículas y ruptura de membrana, entre otras alteraciones. A nivel de orgánulos, se observaron cambios en la mitocondria con pérdida de potencial de membrana, formación de autofagosomas y ruptura de reservosomas en los epimastigotes. En los tripomastigotes también se caracterizó daño mitocondrial en conjunto con disrupciones nucleares, ruptura de cadenas de ADN, condensación de cromatina y formación de filamentos en el kinetoplasto. Respecto a la forma de amastigotes, disminuyó el número de esta forma parasitaria por cada 100 células y tuvo un patrón de modificaciones celulares similar a la etapa de epimastigotes. Se concluyó que el péptido causa la muerte del parásito por inducción de autofagia (epimastigotes y amastigotes) y apoptosis (tripomastigotes) aunque no se descartó la posibilidad de inducción de muerte por necrosis (Adade *et al.*, 2013).

Efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos

Funciones moduladoras de la inflamación se han caracterizado en diversos péptidos antimicrobianos, razón por la cual también se han referido a ellos como péptidos de defensa del hospedante (HDP, por sus siglas en inglés) (Hancock *et al.*, 2016). Tal es el caso de la catelicidina Hc-CATH (identificado en la serpiente marina *Hydrophis cyanocinctus*), la cual disminuyó la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos peritoneales de ratón cuando se pre-incubaron con el péptido y, posteriormente, se estimularon con lipopolisacárido; así mismo, se obtuvo un resultado similar después de la co-incubación de las células con ambos componentes (Wei *et al.*, 2015). La catelicidina BF,

de *Bungarus fasciatus*, disminuyó notoriamente los niveles de producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) cuando se usó como pretratamiento en células RAW264.7 que, posteriormente, fueron estimuladas con lipopolisacárido en comparación con aquellas que no recibieron el tratamiento previo con el péptido. A su vez, se determinó que el decremento de estos componentes inflamatorios podría estar relacionado con la inhibición de la fosforilación del NF- κ B p65 (Zhang *et al.*, 2015). Otra catelicidina con efectos inmunomoduladores es la LL-37, esta molécula ocasionó un aumento en la producción de IL-10 y TGF- β (citocinas antiinflamatorias), con un efecto adverso sobre la cantidad de IL-12p40, IL-17, IL-6, TNF- α e IFN- β (todas asociadas a reacción inflamatoria), en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Rv. La interacción de LL-37 con estas células no tuvo efectos negativos en su actividad microbicida (Torres-Juárez *et al.*, 2015; como se citó en Rivas-Santiago *et al.*, 2018).

El tratamiento con hepcidina en ratones infectados con *P. berghei* tuvo efecto modulador que se caracterizó por el descenso de las enzimas ALT y AST, así como de bilirrubina, factores que se utilizan para evaluar fallas en el funcionamiento del hígado. En este estudio, se observó una reducción en la parasitemia de los ratones infectados que fueron tratados con diferentes dosis de hepcidina plegada, aunque también el péptido lineal tuvo un efecto antimalaria cuando se utilizó como tratamiento. A su vez, un incremento en la supervivencia fue demostrado en los animales enfermos tratados con los péptidos. El tratamiento con hepcidina tuvo efecto sobre el descenso en la concentración de citocinas séricas, tales como IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-10, mientras que las citocinas IL-17A e IL-12p70 incrementaron su presencia en suero. En el caso del IFN- γ , se describió una baja en sus niveles séricos al inicio del proceso infeccioso, sin embargo, en conjunto con la complicación de la enfermedad, los ratones tratados con el péptido incrementaron sus niveles de esta citocina en comparación con el grupo control, lo que indicó el efecto protector de la hepcidina al mediar los niveles de expresión de IFN- γ (Fang *et al.*, 2017).

El péptido IDR-1018, derivado sintético de la batenecina bovina, en conjunto con los fármacos pirimetatina y cloroquina (utilizados en la terapéutica antimalaria), provocó un aumento en la protección de una infección experimental de malaria cerebral en ratones causada por *P. berghei* cepa ANKA/C57BL/6, con esto también se observó un incremento

en la supervivencia en aquellos ratones que recibieron el tratamiento con el péptido de forma intravenosa cuando se comparó con los que, en su lugar, solo se trataron con solución salina. Esto se relacionó con los perfiles transcripcionales en los que se encontró que, en los individuos evaluados con la actividad del péptido, fue evidente la regulación negativa de genes asociados a la inflamación, tales como IL-1, IL-1RN, CCL3, CCL4, IFN- γ y TNF- α , entre otros (Achtman *et al.*, 2012).

Mecanismos de acción e inducción de muerte celular en protozoarios por efecto de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, incluidas las catelicidinas, tienen diversos modos de acción para eliminar a los microorganismos. Principalmente se conoce el efecto que tienen sobre las membranas de los patógenos mediante sus mecanismos clásicos de daño: formación de poro de barril, toroidal, de alfombra y micelar, además, se ha caracterizado su actividad sobre blancos internos en las células una vez que translocan hacia el interior (Torrent *et al.*, 2012; Pretzel *et al.*, 2015). Como consecuencia, los péptidos antimicrobianos pueden inducir la muerte de los parásitos por apoptosis, necrosis o autofagia (Cauchard *et al.*, 2016).

La Batroxidina, catelicidina identificada en la serpiente *Bothrops atrox*, resultó un eficiente antiparasitario en contra de los tres estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*. Cuando se evaluó la vía de inducción de muerte que el péptido ocasionaba en el epimastigote (fase del ciclo de vida que se desarrolla en el vector transmisor) utilizando la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀, 11.3 μ M) y el doble de esta dosis (2xIC₅₀, 22.6 μ M), mediante el protocolo de citometría de flujo, se notó un incremento en la permeabilización de las células hacia el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD), después de 6 y 24 h de incubación, lo que fue indicativo de una alteración en la integridad de la membrana. A su vez, se notó un incremento en la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) indicado por un aumento en la señal de DCFH-DA (diacetato dicloro-dihidrofluoresceína), mientras que la señal emitida por el colorante fluorescente rodamina 123 disminuyó con el tratamiento con el péptido, resultado que señala la perturbación del potencial membranal mitocondrial. Cuando los epimastigotes tratados con esta catelicidina se observaron con microscopía

electrónica de barrido se apreció la formación de poros en la membrana, con cambios en la morfología normal del parásito por el daño directo a la membrana plasmática, afectando su integridad y provocando pérdida de contenido citoplasmático. A partir de estos hallazgos, se concluyó que la actividad antiparasitaria de la batroxidina sobre el epimastigote de *T. cruzi* se llevaba a cabo mediante la inducción de muerte celular por necrosis, dado por el rompimiento de la membrana plasmática derivado de la acción del péptido. En este mismo estudio se mostró que el péptido a bajas concentraciones disminuía la cantidad de células LLC-MK2 (células de riñón de mono Rhesus) infectadas por el amastigote de *T. cruzi* y que este efecto era específico debido a la baja citotoxicidad mostrada hacia esta misma línea celular cuando no estaba infectada, mostrando un índice de selectividad de 315.5 (Mello *et al.*, 2017).

La acción de otra catelicidina encontrada en un vipérido (*Crotalus durissus terrificus*), la crotalicidina o Ctn, y sus fragmentos derivados de una predicción con herramientas bioinformáticas (Ctn [1-14] y Ctn [15-34]), se evaluó contra *T. cruzi* (amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes). El péptido nativo, Ctn, mostró una importante actividad antiparasitaria a bajas concentraciones (IC₅₀, 4.47 y 0.22 µM) contra todas las fases de desarrollo de este protozoario, mientras que los péptidos derivados solamente mostraron actividad contra el tripomastigote (etapa infectiva del parásito). Mediante citometría de flujo se analizó la vía de inducción de muerte provocada por Ctn (4.47 µM) en el epimastigote de *T. cruzi* con el uso de los indicadores fluorescentes rodamina 123, DCFH-DA, Annexina V (AX) y 7-AAD. Los resultados de este ensayo mostraron una permeabilización de la membrana y la expresión de fosfatidilserina en la superficie externa de la célula, en conjunto con una disminución en el potencial transmembranal mitocondrial y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, por lo cual los autores concluyeron que la muerte celular era ocasionada por necrosis o apoptosis tardía/necrosis. Cuando los epimastigotes tratados con la catelicidina Ctn se observaron por medio de microscopía electrónica de barrido, fue notoria la formación de poros en la membrana y las afecciones morfológicas en esta estructura (Bandeira *et al.*, 2018). El hecho de que las formas de amastigote y tripomastigote fueran más susceptibles al efecto de los péptidos antimicrobianos (incluyendo los derivados de Ctn) se atribuyó a la expresión de ciertas moléculas expresadas en la

superficie en estos dos estadios de desarrollo y que están implicadas en los procesos de invasión e internalización del parásito, como son algunas glucoproteínas y transalidasas (que transfieren moléculas de ácido siálico a mucinas en la superficie membranal), efecto que daría un carácter aniónico a la membrana (De Souza *et al.*, 2010, como se citó en Bandeira *et al.*, 2018).

El péptido BMAP-18, que se originó a partir del acortamiento del péptido antimicrobiano mielóide bovino (BMAP) 27, demostró un enorme espectro de actividad contra varias subespecies de *Trypanosoma brucei*, así como contra *T. congolense* y *T. danilewskyi*. Cuando se examinó la acción del péptido contra la cepa 427.01 de *T. brucei brucei* a baja concentración (5 µg/ml) se observó una pérdida de potencial mitocondrial determinado por la disminución en la señal emitida por rodamina 123, también se notó un aumento en la granularidad de las células, cuya muerte fue atribuida a un proceso apoptótico sin daño a la membrana celular. Sin embargo, cuando se utilizó una concentración de 50 µg/ml de BMAP-18 contra *T. b. brucei* 427.01 y *T. b. rhodesiense* y se observó con microscopio electrónico fue evidente que el efecto del péptido consistió en provocar un daño a la membrana e indujo una muerte celular por necrosis en los parásitos (Haines *et al.*, 2009).

Una de las catelicidinas encontradas en caballos (eCATH1), tuvo actividad (IC₅₀, 9.5 µM) contra tres especies de tripanosomas, *T. b. brucei* AnTat 1.1E, *T. evansi* RoTat 1.2, y *T. equiperdum* BoTat 1.1. Los tripomastigotes de *T. equiperdum* mostraron un alto grado de permeabilización de la membrana cuando se trataron con esta catelicidina. Cuando se evaluó la retención del colorante rodamina 123 en las tres especies mencionadas anteriormente después del tratamiento con diferentes concentraciones del péptido (IC₅₀, 2xIC₅₀, 3xIC₅₀) lo cual indicó la disminución o pérdida del potencial transmembranal mitocondrial. Además, la motilidad de los parásitos se notó afectada. Alteraciones morfológicas y estructurales se apreciaron, por medio de microscopía electrónica de barrido, en los tripomastigotes de *T. equiperdum* y *T. b. brucei* cuando se trataron con eCATH1(2xIC₅₀) y estos cambios fueron mayormente perceptibles cuando se incrementó el tiempo de tratamiento. Utilizando microscopía electrónica de transmisión se evidenciaron daños en membrana plasmática (formación de protuberancias, ruptura y desprendimiento), forma celular (hinchamiento, adaptación de forma redonda) y orgánulos (vacuolización en membranas). Se concluyó que

la actividad anti-tripanosoma era ocasionada por el rompimiento de la membrana celular, seguido por la pérdida del equilibrio osmótico, la internalización de los péptidos y las perturbaciones de los orgánulos teniendo consecuencias sobre los procesos vitales de los parásitos (Cauchard *et al.*, 2016).

Efectos similares a los descritos anteriormente se han caracterizado con el uso de la protegrina 1, catelicidina de cerdo, cuando se analizó su efecto en contra de *T. brucei*. Estudios de microscopía demostraron que la protegrina 1 afecta la membrana, provoca cambios en la forma del parásito y lleva a la pérdida de contenido celular. Además, estos resultados fueron dependientes de la dosis utilizada (McGwire *et al.*, 2003).

La especificidad mostrada hacia los protozoarios, como las especies pertenecientes al género *Trypanosoma*, se puede explicar debido a la presencia de moléculas de carácter aniónico en la superficie externa de estas células (las cuales varían dependiendo de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentre el parásito, modificando el valor de la carga también) (Souto-Padrón, 2002). Los tripomastigotes de *T. cruzi*, expresan en su superficie proteínas de la familia de las transialidasas (ancladas a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol -GPI-), glucoproteínas y mucinas que son necesarias para la interacción con elementos que componen la parte externa de las membranas de las células de los organismos que son parasitados (De Souza *et al.*, 2010). Sin embargo, sería la conjugación del ácido siálico con estas proteínas, los grupos fosfatos y algunos glucolípidos los principales causantes de esta negatividad (en cuanto a carga) característica de la membrana (Souto-Padrón, 2002). Esto provocaría la atracción electrostática de los péptidos con cargas positivas, como es el caso de las catelicidinas y explicaría su selectividad por las membranas de estos protozoarios sobre las de las células de mamíferos. Además, las diferentes especies de tripanosomas, así como sus distintos estadios de desarrollo varían en tipo y cantidad de proteínas que expresan superficialmente, lo que hace variable también la susceptibilidad al efecto de los péptidos antimicrobianos (McGwire *et al.*, 2003). En el caso de las fases intracelulares, se atribuye la actividad selectiva a la modificación de la membrana por la infección parasitaria, de modo que adopta una carga negativa que es susceptible a la acción de los péptidos (Jacobs *et al.*, 2003).

El péptido LZ1, un derivado de la BF-CATH, catelicidina identificada en la serpiente *Bungarus fasciatus*, mostró tener un efecto antipalúdico contra la etapa sanguínea de la cepa 3D7 de *P. falciparum* a una dosis de 3.045 μM en cultivos in vitro. Después de medir la actividad de la enzima piruvato cinasa, en eritrocitos de ratones infectados con *P. berghei*, se observó una disminución en su función; además, este resultado era más notorio conforme se aumentaba la dosis de péptido utilizado. Adicionalmente a esto, la producción de ATP en los eritrocitos infectados demostró un menor nivel cuando se trataron con LZ1. El tratamiento a la par con inhibidores de la glucólisis (2-desoxiglucosa) y de la fosforilación oxidativa (oligomicina) tuvo un mayor impacto en la reducción del ATP, sugiriendo una acción del péptido sobre las vías metabólicas, afectando principalmente la glucólisis. Estos efectos se produjeron de manera específica en los eritrocitos infectados, de modo que no hubo afecciones perceptibles en los eritrocitos sanos (Fang *et al.*, 2019).

Existen otras moléculas que no pertenecen a la familia de las catelicidinas, pero que sí se consideran péptidos antimicrobianos y cuyo mecanismo de acción pudiera estar relacionado y podría proporcionar las bases para el entendimiento de la actividad anti-malaria de las catelicidinas. Un péptido de carácter catiónico encontrado en el veneno de la víbora de cascabel sudamericana *C. durissus terrificus*, llamado crotamina (clasificado como un péptido que penetra las células), tuvo un remarcable efecto en contra de *P. falciparum* cuando se evaluó en cultivo de eritrocitos infectados, mostrando una IC_{50} de 1.87 μM . El mecanismo propuesto para esta actividad antipalúdica fue la alteración de los lisosomas y dañando la estructura membranal del parásito, provocando una desestabilización en la homeostasis del H^+ y una desregulación del pH necesario para el funcionamiento de las enzimas de los compartimientos acídicos (plasmepsinas y falcipainas). Cabe resaltar que la internalización del péptido fue específica para los eritrocitos infectados, siendo inocuo para aquellos que no estaban parasitados (El Chamy Maluf *et al.*, 2016).

NK-2, un fragmento del péptido NK-lisina, procedente de linfocitos citotóxicos de cerdo, resultó eficiente al eliminar a la forma intraeritocítica de *P. falciparum* (IC_{50} , 6.2 μM). Cuando se analizó el grado de hemólisis causado por el efecto del péptido en eritrocitos altamente infectados (95% de celular rojas infectadas) y en eritrocitos sanos se demostró que, a las concentraciones utilizadas, solamente existía lisis en los eritrocitos parasitados. Al

observar los eritrocitos infectados en microscopio óptico se apreció un elevado grado de daño en los parásitos, comprobando que NK-2 pudo atravesar la membrana del eritrocito y la vacuola parasitófora formada como consecuencia de la infección. Posteriormente, se confirmó que el péptido provocaba la permeabilización de la membrana de *P. falciparum* y cambios en su morfología. Después, se comparó la diferencia en la presencia de fosfatidilserina en la superficie de eritrocitos infectados y no infectados, cantidad que incrementó dependiendo de la presencia del parásito y del estadio de desarrollo en que se encontraba (trofozoíto o esquizonte). Por último, se evaluó la capacidad lítica de NK-2 utilizando liposomas conformados por fosfatidilserina y fosfatidilcolina, dando como resultado un incremento en la lisis conforme se aumentaba la cantidad de fosfatidilserina (Gelhaus *et al.*, 2008).

Actividad hemolítica y citotóxica de catelicidinas de serpientes

Se ha evaluado la actividad citotóxica y hemolítica de varios péptidos antimicrobianos, con la finalidad de conocer su viabilidad como opciones terapéuticas. La catelicidina Hc-CATH provocó 5.25% de hemólisis en eritrocitos humanos y tuvo un efecto citotóxico menor al 5% cuando se evaluó con 4 líneas celulares de mamíferos; para ambos ensayos se utilizó una concentración de 200 µg/ml de este péptido, cantidad aproximadamente 10 veces mayor a la necesitada para presentar actividad antimicrobiana contra varias especies de bacterias (Wei *et al.*, 2015). La catelicidina BF (del elápidio *Bungarus fasciatus*) no mostró actividad detectable contra eritrocitos humanos, macrófagos de ratón (RAW264.7) y células tumorales (HepG2) cuando se utilizaron concentraciones de hasta 400 µg/ml (Wang *et al.*, 2008).

La crotalicidina (Ctn), catelicidina identificada en la víbora de cascabel sudamericana *Crotalus durissus*, y dos péptidos derivados predichos por su fragmentación *in silico* (Ctn [1-14] y Ctn [15-34]), ocasionaron solamente 7% de hemólisis en eritrocitos humanos cuando se evaluaron a 100 µM y 400 µM, respectivamente. Aunado a esto, se evidenció que el 80% de fibroblastos (1BR3G), incubados con 100 µM de Ctn [1-14] y Ctn [15-34] durante 24 h, conservaron su viabilidad. Ambos péptidos derivados mostraron menos actividad citotóxica

que el péptido del cual se originan, cuya concentración inhibitoria media (IC50) se alcanzaba con 6.25 μM , en una incubación de 4 h (Falcao *et al.*, 2015). Después de una incubación de media hora a 37 °C con eritrocitos, las catelicidinas OH-CRAMP, catelicidina de la cobra real (*Ophiophagus hannah*); batroxidina (de *Bothrops atrox*), crotalicidina y Pt-CRAMP1 (*Pseudonaja textilis*) tuvieron un efecto hemolítico de 10% a concentraciones de 100 μM , 12.5 μM , 25 μM y 6.25 μM , respectivamente (Falcao *et al.*, 2014).

Tanto la batroxidina como la crotalicidina resultaron ser completamente inocuos cuando se evaluó su citotoxicidad en células RAW264.7 a concentraciones comprendidas entre 4-64 $\mu\text{g/ml}$ (rangos en los que se observó efecto antimicrobiano contra bacterias multirresistentes a fármacos). Se evaluó también el potencial citotóxico de ambos péptidos en un microambiente similar al presentado en un proceso infeccioso con respuesta inflamatoria, las células se estimularon con antígeno bacteriano (proveniente de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*) y con IFN- γ , donde se observó solamente una ligera pérdida de la viabilidad celular (Oliveira-Júnior *et al.*, 2018).

Péptidos antimicrobianos caracterizados en *Crotalus aquilus*

Una catelicidina (Aquiluscidina) de la víbora de cascabel oscura de Querétaro, *Crotalus aquilus*, fue identificada a partir de transcritos de células epiteliales, y sus características fisicoquímicas fueron predichas por medio de herramientas bioinformáticas. Un péptido derivado (Vcn-23) fue seleccionado con base en los análisis de sus propiedades para la determinación de su actividad antimicrobiana. Tanto la Aquiluscidina como el Vcn-23 demostraron un buen rendimiento en los ensayos antibacterianos a concentraciones menores a 2 μM contra cepas de laboratorio y de aislados clínicos humanos, mostrando efecto inhibitorio tanto contra microorganismos Gram positivos como Gram negativos (Hernández-Arvizu, 2019), con nula actividad hemolítica en eritrocitos de rata a una concentración de hasta 50 μM (Hernández-Arvizu *et al.*, 2023). Debido a lo mencionado anteriormente, ambos péptidos son excelentes candidatos para continuar con las evaluaciones respecto a su espectro de actividad y mecanismos de acción.

III. HIPÓTESIS

La Aquiluscidina y el Vcn-23 tienen actividad antimicrobiana contra microorganismos del género *Babesia*, provocando la muerte de los parásitos por la vía de apoptosis/necrosis.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General: Determinar el efecto antimicrobiano y el mecanismo de acción de la Aquiluscidina y el Vcn-23 contra *Babesia* spp.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un cultivo *in vitro* de *Babesia* spp.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de la Aquiluscidina y el Vcn-23 contra especies de *Babesia* en cultivos *in vitro*.
3. Determinar el mecanismo de acción de estos péptidos.

Justificación

La babesiosis es una enfermedad zoonótica que afecta a humanos y a especies animales de importancia económica. Aunque hay fármacos eficaces contra esta enfermedad, estas poseen riesgos a la salud y tiempos de retiro largos, por lo que es necesario desarrollar nuevos tratamientos eficientes y seguros. Las catelicidinas de serpientes han presentado actividad contra diversos protozoarios, entre los que se incluyen especies del género *Plasmodium*. La catelicidina de *C. aquilus* (Aquiluscidina) y su péptido derivado (Vcn-23) mostraron un efecto antibacteriano contra diferentes microorganismos a bajas concentraciones sin actividad hemolítica detectable. El estudio de estas moléculas, incluyendo sus mecanismos de acción, permitirá el desarrollo de nuevos candidatos para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoarios, como la babesiosis.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los protocolos descritos en este apartado se sometieron a evaluación por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y fueron aprobados el día 1 de julio de 2020, con el número 41FCN2020. Los péptidos Aquiluscidina (KRFKKFFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVIGVSFPF-NH₂, 4.17132 kDa, carga neta +16) y Vcn-23 (FFKKVKKSVKKRLKKIFKKPMVI-NH₂, 2.84872 kDa, carga neta +12) fueron adquiridos comercialmente a través de la empresa Peptide 2.0, tal como anteriormente se ha descrito (Hernández-Arvizu et al., 2023). A continuación, los liofilizados fueron disueltos en agua inyectable (PiSA® Farmacéutica) y se ajustaron a una concentración de trabajo de 2 mg/mL.

Ensayo de citotoxicidad por protocolo con MTT

Se determinó la citotoxicidad de la Aquiluscidina y el Vcn-23 evaluando la actividad mitocondrial mediante el protocolo con el reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) y su conversión en formazán (Meerloo *et al.*, 2011). Para la realización de este ensayo se utilizaron células embrionarias de riñón humano (HEK293), línea celular con la que se ha evaluado anteriormente la acción citotóxica de otras catelicidinas (Panteleev *et al.*, 2018). Las células se cultivaron en placas p100 y p6 (Corning Costar) con medio DMEM (Biowest-10103-500) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, S1810-500) y adicionado con antibiótico-antimicótico (Gibco-15240062 [penicilina, 10,000 unidades/ml; estreptomina, 10,000 µg/ml; y fungizona, 25 µg/ml]) al 1% (medio de cultivo completo), para su mantenimiento y la estandarización de su crecimiento en estos formatos. Posteriormente, se procedió al sembrado en placa de 96 pozos (p96). Después, se evaluaron distintas concentraciones celulares y de suero fetal bovino (1-2%) para sincronización en los pozos de la placa para conseguir un 70% de confluencia antes de la aplicación de los tratamientos.

En una placa p96, se sembraron 15,000 células por pozo en medio completo y se incubaron a 37 °C y 4.7% de concentración de dióxido de carbono (CO₂) durante 8 h. Posteriormente, se cambió el medio completo por medio de sincronización (DMEM

suplementado con 1% de suero fetal bovino y adicionado con 1% de antibiótico-antimicótico) y se incubó la placa durante toda la noche. Al día siguiente, se prepararon las alícuotas de los péptidos (Vcn-23 y Aquiluscidina) en medio DMEM libre de suero (Wei *et al.*, 2015). Siete concentraciones se utilizaron en el ensayo: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM . Como controles se usaron diluciones de Tritón 100X al 1, 0.1, 0.01 y 0.001% en medio DMEM; así como células evaluadas únicamente con el medio (sin tratamiento) y pozos con medio sin células (blanco). En la Figura 1 se esquematiza la distribución de los tratamientos en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
B	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
C	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
D	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
E	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
F	Med	C-	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50	100	1%	0.1%	0.01%
G	0.001%	0.001%	0.001%									
H	0.001%	0.001%	0.001%									

Figura 1. Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo) para el ensayo de citotoxicidad de las catelicidinas de *Crotalus aquilus*. Se utilizaron las concentraciones indicadas con números (en rango μM) en los espacios correspondientes Vcn-23 (azul) y Aquiluscidina (rosado). En color gris, se ubican los pozos sometidos a tratamiento con Tritón 100X. Se sembraron 15,000 células embrionarias de riñón humano (HEK293). Med: Medio estéril, sin células. C-: Células y medio, sin tratamiento.

p96.

La placa se incubó por 24 h a 37 °C y 4.7% de CO₂, después de esto, se retiró el medio de todos los pozos y se colocaron 100 μl del reactivo MTT (disuelto en DMEM [0.5 mg/ml]), la placa se cubrió con papel aluminio y se incubó durante 4 h en las mismas condiciones descritas con anterioridad. Posteriormente, el medio con MTT fue retirado y se añadieron 100 μl de dimetil sulfóxido (DMSO), la placa fue cubierta con papel aluminio nuevamente y se dejó en incubación a 37 °C en agitación (150 rpm) durante toda la noche. Después, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm en un lector de placas. Los pozos con células sin tratamiento se tomaron como 100% de viabilidad celular. Cada tratamiento se evaluó por triplicado y en dos experimentos independientes. Los análisis estadísticos como interpolación

de valores para cálculo de viabilidad celular, media aritmética, error estándar, ANOVA de una vía y regresión no lineal para determinación de dosis letal 50 (DL₅₀) se calcularon con los programas GraphPad Prism 8 y Minitab 19.

Cultivo de *Babesia* spp.

Se utilizó un bovino (*Bos taurus*) libre de *Babesia* y *Anaplasma*, entre otros patógenos (Alcalá *et al.*, 2015), que se encontraba en el Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se empleó un matraz Kitasato de 1 L, con una manguera de látex en el brazo lateral y una tapa de caucho adaptada para la colocación de otra manguera similar. Al matraz se le agregaron el 10% (v/v) de perlas de vidrio y esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Una vez enfriado, se le generó vacío con una bomba específica para este fin. La sangre del bovino se obtuvo puncionando la vena yugular (Alcalá *et al.*, 2015). El matraz se mantuvo en agitación constante mientras durante el proceso de la extracción de la sangre para permitir que se formara un coágulo. Al finalizar, se transportó la sangre al Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Durante el procesamiento en el laboratorio, se separó el suero del paquete celular mediante centrifugación (3500 rpm por 15 minutos a 4°C), los eritrocitos se lavaron cinco veces en solución VyM (Vega *et al.*, 1985a) adicionada con antibiótico-antimicótico al 1% (bajo las mismas condiciones de centrifugado indicadas anteriormente). Los eritrocitos lavados se distribuyeron en alícuotas de 10 ml y se mantuvieron en refrigeración con la misma solución VyM a una proporción de 1:1 (v/v) por un periodo de hasta 8 semanas. Los eritrocitos obtenidos mediante este procedimiento se utilizaron para proveer el cultivo de células sanas que pudieran ser infectadas por el parásito. El suero recolectado se almacenó a -80°C hasta su uso (Alcalá *et al.*, 2015).

El medio base M199 (Sigma-Aldrich-M5017-1L) se preparó con 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco-15240062), adicionándosele 2.2 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y 10.31 g de TES (ácido N-Tris-Hidroximetil-metil-2-aminoetanosulfónico) (Alcalá *et al.*, 2015). Subsecuentemente, fue filtrado en una unidad de filtración (Sartolab-180C3) con

membrana de PES de 0.22 μm , para ser envasado en contenedores previamente esterilizados. Después, se realizaron pruebas de esterilidad, las cuales consistieron en colocar 1 ml de medio base en tubos cónicos de 1.5 ml, estériles, e incubarlos a 37 °C durante 24 h en una incubadora de CO₂ para cultivo celular. El medio base así preparado se almacenó en refrigeración hasta su uso.

El medio completo se preparó de la siguiente manera: se añadieron 30 ml de medio base en un tubo cónico de 50 ml y se suplementó con 20 ml suero de bovino adulto (40% v/v), este suero debía ser fresco y recién descongelado (Alcalá *et al.*, 2015). Se esterilizó mediante filtración con filtros de pirinola de 0.2 μm (Minisart NML plus 17823-K). Se llevaron a cabo pruebas de esterilidad como las descritas previamente para el medio base (Figura 2).

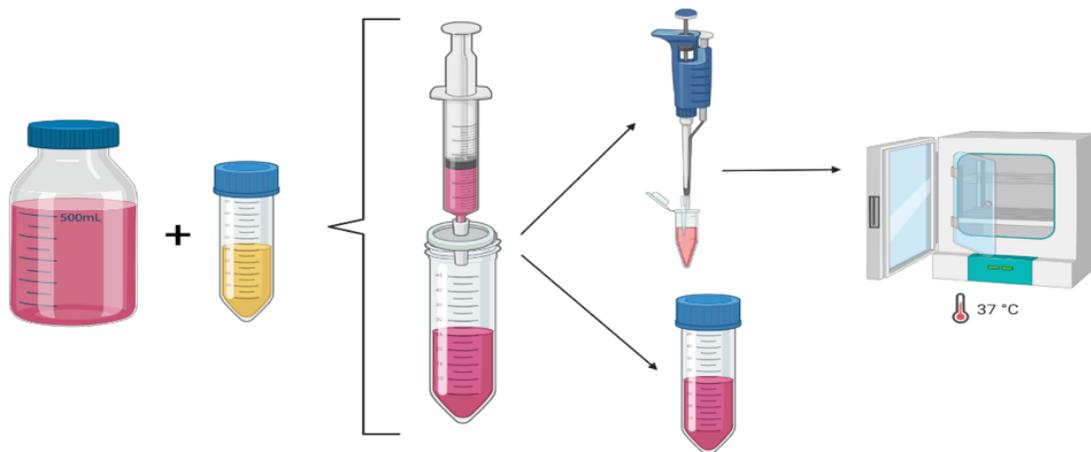


Imagen creada en Biorender.com por Edwin Hernández, 2021.

Figura 2. Esquematación de la preparación del medio completo para cultivo celular. Se utilizó el M199 base, preparado previamente, y se añadió un volumen correspondiente al 40% de suero fresco bovino. Después se procedió con la incubación para la prueba de esterilidad.

El cultivo *in vitro* se inició siguiendo el protocolo indicado por Alcalá *et al.*, en 2015, a partir de dos viales con eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* (aislado de Michoacán) criopreservados en nitrógeno líquido, los cuales fueron transportados al Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro en un termo con nitrógeno líquido. Los viales se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se inocularon uno de manera intravenosa, en la vena yugular, y otro de forma intramuscular. La inoculación del contenido de los viales se realizó sobre los mismos bovinos de los cuales se extrajeron, previamente, los eritrocitos

sanos para el mantenimiento del cultivo. La parasitemia fue monitorizada diariamente por el equipo veterinario del Campus, por medio de obtención de muestra de sangre del animal, tinción y conteo de células infectadas observadas en el microscopio óptico. Los días que se cuantificó que la parasitemia estaba en 1% y 3% se realizaron sangrados con tubos vacutainer® con heparina como anticoagulante y se transportaron al Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas. Posterior a esto, se procedió a realizar el lavado de la sangre infectada, tal como se describió previamente, con solución de VyM. El sobrenadante se descartó y los eritrocitos fueron resuspendidos en medio completo, en un porcentaje volumen/volumen de 10% en una placa de 24 pozos (con un volumen final de 1.1 ml en cada pozo, entre medio completo y eritrocitos infectados) (Vega, comunicación personal, 28 de septiembre de 2020). Las placas se incubaron durante 48 h antes de cambiar el medio (Figura 3).

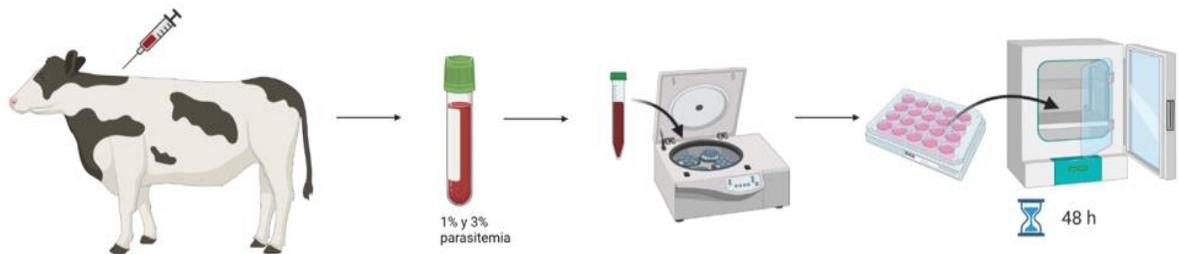


Imagen creada en Biorender.com por Edwin Hernández.

Figura 3. Representación del proceso realizado para comenzar el cultivo in vitro de *Babesia bigemina*.

El protocolo para establecer el cultivo de *Babesia bovis* (aislado de Puebla) fue muy similar al descrito para *Babesia bigemina* (aislado de Michoacán). En este caso, se obtuvo la sangre infectada cuando la parasitemia tenía un valor de 1.08% y se procedió de igual manera con el lavado de sangre y la siembra del material biológico para el inicio del cultivo *in vitro*.

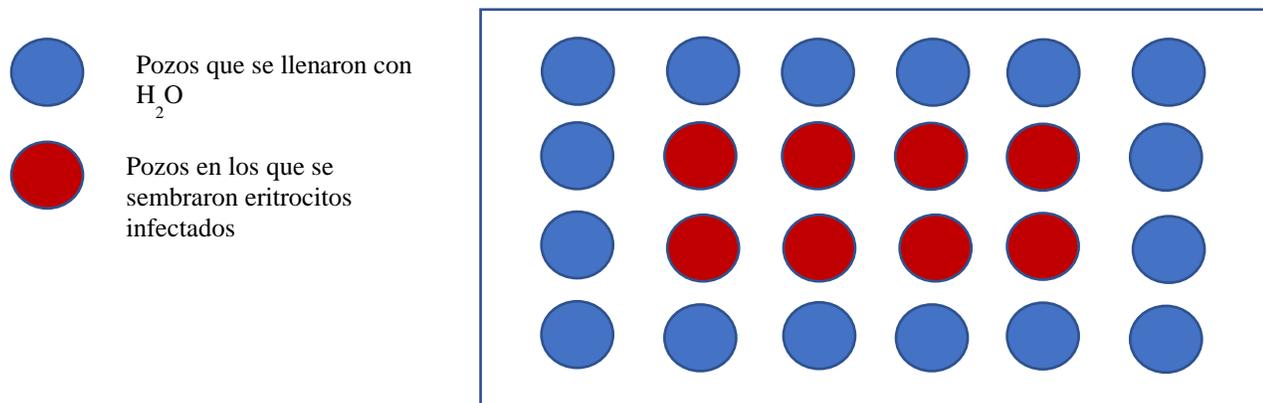


Figura 4. Acomodo del sembrado del cultivo de *Babesia* spp. en placa de 24 pozos.

El manejo de ambos cultivos se llevó a cabo de manera similar, el medio se reemplazó todos los días y la temperatura de incubación se mantuvo a 37 °C, con una atmósfera de 4.7%-4.8% de dióxido de Carbono (CO₂) (Vega *et al.*, 1985b; Galay *et al.*, 2012; Alcalá *et al.*, 2015) y en condiciones de humedad elevada (Alcalá *et al.*, 2015). En la Figura 4., se muestra la distribución de los pozos que se utilizó durante el cultivo en la placa de 24 pozos, aquellos ubicados en las orillas se rellenaron con agua para mantener la humedad y los pozos centrales se utilizaron para el sembrado de las células (Vega, C.A.: comunicación personal, 28 de septiembre de 2020).

La cantidad de células rojas infectadas se monitorizó diariamente al realizar el cambio de medio. Se tomaron 1-2 µl del paquete celular, con los cuales se realizó un frotis, el cual fue teñido con solución Giemsa (1:4 con agua corriente) durante 15 minutos, previa fijación con metanol absoluto (Alcalá *et al.*, 2015). Mediante el uso de un microscopio óptico y una cuadrícula se calculó el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP).

Selección de bovino donador para el mantenimiento de los cultivos primarios

Para conservar el cultivo a largo plazo, fue necesario realizar un proceso de evaluación de los eritrocitos sanos obtenidos de la sangre de bovinos donadores. Cinco ejemplares adultos (identificados con los números de arete: 9583, 9180, 8183, 9171 y 9584), mantenidos en el campus Amazcala de la Universidad, fueron muestreados, utilizando tubos con heparina de litio, y la sangre se procesó como se describió con anterioridad. Se sembraron los respectivos

eritrocitos de cada bovino con células infectadas del cultivo original, de modo que el PEP fuera del 1%. Los distintos cultivos se manejaron de manera similar al cultivo primario, completando un periodo de 2 semanas. Durante este tiempo, se realizaron conteos para la determinación del PEP y se analizaron estadísticamente para seleccionar el mejor donador.

Análisis *in vitro* de la actividad antimicrobiana

Los primeros ensayos de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo en las instalaciones de LINVAS, utilizando los cultivos primarios de *B. bigemina* (aislado de Michoacán) y *B. bovis* (aislado de Puebla). A partir de las placas de mantenimiento, se cuantificó la cantidad de eritrocitos infectados en cada respectivo pozo. Después, se hicieron diluciones en medio completo con eritrocitos sanos, de modo que el porcentaje se ajustara al

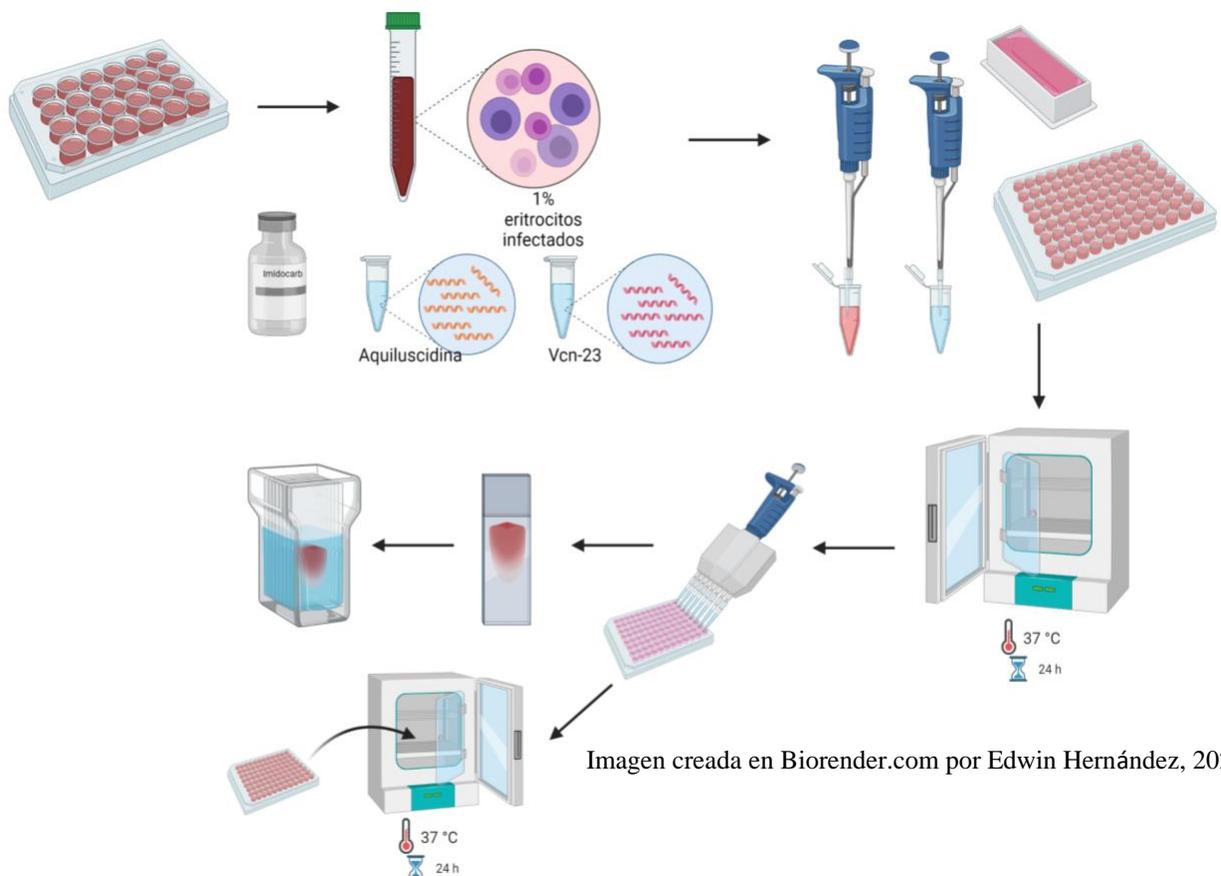


Figura 5. Esquema del procedimiento experimental utilizado para evaluar la actividad antibabesia *in vitro* de los péptidos Aquiluscidina y Vcn-23.

1% de eritrocitos infectados para comenzar el ensayo de inhibición en la placa de 96 pozos (Aboulaila *et al.*, 2012; Aboulaila *et al.*, 2020) (Figura 5). Ambos péptidos fueron agregados desde el día 0 (el día que se comienza el ensayo) y se realizó un total de cuatro aplicaciones (del día 0 al día 3), mientras que el cultivo celular se mantuvo hasta el cuarto día, como en el experimento de Galay *et al.*, en 2012 (Figura 6).

Día	0	1	2	3	4
	T	T	T	T	
		E	E	E	E

T: tratamiento con péptido
E: evaluación de % de eritrocitos infectados

Figura 6. Cronograma de los experimentos para evaluar el efecto antimicrobiano de los péptidos de *C. aquilus* contra *Babesia* spp.

Las concentraciones por evaluar de los péptidos fueron entre 1.25-20 μM , en una microplaca de 96 pozos, concentraciones similares que se han utilizado en ensayos *in vitro* con el péptido LZ1, derivado de la catelicidina de la serpiente *Bungarus fasciatus*, y la crotamina de *Crotalus durissus terrificus* contra *Plasmodium falciparum* (El Chamy Maluf *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2019), esto para el caso de *B. bigemina* (aislado de Michoacán). Para los ensayos con *B. bovis* (aislado de Puebla), se decidió incrementar ligeramente las concentraciones de ambos péptidos, por lo que se trabajaron en un rango de 1.56-25 μM . Los experimentos se hicieron por triplicado y, posteriormente, se llevó a cabo una réplica de estos. El índice de eritrocitos infectados se calculó diariamente a partir de frotis de paquete celular, los cuales fueron fijados con metanol absoluto y teñidos con Giemsa para observarse en el microscopio. Se contaron al menos 2000 células en cada frotis y se expresó el resultado a razón del porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) (Galaz *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2019; Aboulaila *et al.*, 2020). El proceso experimental completo se observa en la Figura 5.

Se comparó la cantidad de eritrocitos infectados de cada una de las concentraciones de los péptidos (ambos, el Vcn-23 y la Aquiluscidina) con los controles negativos (aquellos que no contenían tratamiento antibabesia) y positivo (tratamiento con dipropionato de imidocarb a dosis de 2 y 5 μM para *B. bigemina* [aislado de Michoacán]; y a 2 μM , para *B. bovis* [aislado de Puebla]). En la Figura 7 se muestra el diseño experimental para la

evaluación de la actividad antibabesia en una placa de cultivo de 96 pozos para *B. bigemina* (aislado de Michoacán); en la Figura 8 se aprecia el acomodo para el ensayo con *B. bovis* (aislado de Puebla).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O
B	H₂O	C-medio		1.25	2.5	5	10	20	2	5		H₂O
C	H₂O	C-medio		1.25	2.5	5	10	20	2	5		H₂O
D	H₂O	C-medio		1.25	2.5	5	10	20	2	5		H₂O
E	H₂O	C-medH₂O		1.25	2.5	5	10	20				H₂O
F	H₂O	C-medH₂O		1.25	2.5	5	10	20				H₂O
G	H₂O	C-medH₂O		1.25	2.5	5	10	20				H₂O
H	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O	H₂O

Figura 7. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra *B. bigemina* (aislado de Michoacán). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH₂O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con dipropionato de imidocarb. Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades µM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O				
B	H ₂ O	1.56	3.125	2	6.25	12.5	C-medio	25				H ₂ O
C	H ₂ O	1.56	3.125	2	6.25	12.5	C-medio	25				H ₂ O
D	H ₂ O	1.56	3.125	2	6.25	12.5	C-medio	25				H ₂ O
E	H ₂ O		1.56	3.125	C-med H ₂ O	6.25	12.5	25				H ₂ O
F	H ₂ O		1.56	3.125	C-med H ₂ O	6.25	12.5	25				H ₂ O
G	H ₂ O		1.56	3.125	C-med H ₂ O	6.25	12.5	25				H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O				

Figura 8. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra *B. bovis* (aislado de Puebla). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH₂O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con dipropionato de imidocarb. Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades μM .

En el Laboratorio de Control Global de Infecciones del Centro Nacional de Investigación en Enfermedades Protozoarias (NRCPD, por sus siglas en inglés) de la Universidad de Agricultura y Medicina Veterinaria de Obihiro, Hokkaido, Japón, se llevaron a cabo los ensayos de inhibición de crecimiento con los cultivos de *Babesia bovis* (cepa Texas) y *Babesia ovata* (cepa Miyake). El protocolo experimental fue similar al realizado para las especies evaluadas anteriormente, con ligeras modificaciones: el porcentaje inicial de parásitos para estos ensayos fue de 0.2%, debido a la alta tasa de crecimiento de los microorganismos en las condiciones específicas de este laboratorio; la droga usada como control en esta ocasión fue el diaceturato de dminazeno (DA) a concentración de 2 μM ; los péptidos se evaluaron en un rango de 1.56-25 μM (para el caso de *B. bovis* [cepa Texas], se utilizaron hasta la concentración de 50 μM); el medio utilizado fue GIT, sin suplementación con suero ni adición de antibiótico; y se añadió un control más, el de DMSO, a causa de que es el diluyente utilizado para resuspender el diaceturato de diminazeno. Quedando el diseño experimental como se representa en la Figura 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O								
B	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	2	C-medio			H ₂ O
C	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	2	C-medio			H ₂ O
D	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	2	C-medio			H ₂ O
E	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	C-DMSO	C-medH ₂ O			H ₂ O
F	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	C-DMSO	C-medH ₂ O			H ₂ O
G	H ₂ O		1.56	3.125	6.25	12.5	25	C-DMSO	C-medH ₂ O			H ₂ O
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O								

Figura 9. Diseño experimental de la caracterización de la actividad antibabesia de ambos péptidos contra *B. bovis* (cepa Texas) y *B. ovata* (cepa Miyake). Representación del acomodo de los tratamientos en la placa de 96 pozos (las letras A-H y los números 1-12, indican la denominación de filas y columnas, respectivamente, para la ubicación de cada pozo). C-medH₂O, control negativo con agua (usado como diluyente para reconstituir los péptidos, se utilizó el volumen más alto correspondiente a la mayor concentración de péptido); C-DMSO, control negativo con DMSO (diluyente utilizado para reconstituir el diacetato de dimanezo, se usó el mismo volumen que el requerido para el tratamiento con este fármaco); recuadros color anaranjado, Aquiluscidina; recuadros color verde, Vcn-23; recuadros color amarillo, control de eritrocitos infectados tratados con diacetato de diminazeno (DA). Todos los valores indicados en la tabla muestran la concentración en unidades μM .

Adicionalmente, se hicieron experimentos para calcular la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) utilizando aquellas en las que se comenzó a observar el efecto inhibitorio en los ensayos descritos previamente (12.5, 18.75 y 25 μM) para *B. ovata* (cepa Miyake) y (12.5, 18.75, 25 y 50 μM) para *B. bovis* (cepa Texas). Para este caso, se evaluó únicamente el último día en el cronograma experimental igualmente contando al menos 2000 células por frotis, y se hizo por triplicado. Finalmente, se obtuvieron fotografías de los frotis de *B. ovata* (cepa Miyake), tratadas con dosis correspondientes al IC₅₀, 2xIC₅₀, 4xIC₅₀ y control sin tratamiento. Estos frotis se obtuvieron a distintos tiempos: 10 min, 30 min, 1 h y 2 h, con la finalidad de observar cambios morfológicos y determinar el momento en que estos se comienzan a presentar después de la aplicación del péptido.

Se realizaron los análisis estadísticos, tales como medidas de tendencia central y dispersión, así como ANOVA de una vía y regresión no lineal para el cálculo de la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) utilizando el programa de GraphPad Prism 9. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Evaluación del mecanismo de acción de la Aquiluscidina

Análisis bioinformáticos

Para corroborar que hubiese elementos que nos permitieran sugerir que la apoptosis es una vía de muerte que puede presentarse en *Babesia*, se llevó a cabo una búsqueda bioinformática, en bases de datos, de secuencias de proteínas que estuvieran implicadas en este proceso. Con este propósito, se utilizaron los servidores de Protein (1988) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) y de PiroplasmaDB (Álvarez-Jarreta et al., 2024; disponible en <https://piroplasmadb.org/piro/app/>). Posteriormente, la secuencia obtenida fue analizada en el servidor de STRING (Szklarczyk et al., 2023; disponible en https://string-db.org/cgi/input?sessionId=btqyx3NG01DF&input_page_show_search=off) para obtener el interactoma predicho y verificar si los nodos implicados se relacionaban con el proceso de muerte celular por apoptosis.

Ensayo para determinación de vía de muerte: apoptosis

En una placa de cultivo celular de 96 pozos se sembraron, por triplicado, células rojas infectadas con *B. bovis* al 1% en M199 base durante 30 minutos a condiciones de 37 °C y 4.7% CO₂. Se utilizaron como controles células a las que no se les aplicó tratamiento; así como pozos con adición de H₂O, con un volumen igual a la utilizada en el tratamiento con los péptidos; y células tratadas con peróxido de Hidrógeno como inductor de apoptosis (H₂O₂) (Xang et al., 2016). Se utilizó una concentración de 50 µM. El material de los tres pozos se juntó en un tubo, se centrifugó a 2000 x G durante 5 minutos en una microcentrífuga y se descartó el sobrenadante.

Del paquete celular se extrajo el ADN de los parásitos utilizando el kit Isolate II Blood DNA Kit, Bioline, Cat. 5 y se procesaron las muestras tal y como indica el fabricante, brevemente: se lisó el paquete celular agregando 25 µl de proteinasa K, se añadieron 200 µl

de buffer de lisis G3 y se colocó el tubo en un agitador de vórtice (Vórtex®) durante 20 segundos; posteriormente, se incubó el tubo a 70°C durante 15 minutos. Se agregaron 210 µl de etanol absoluto (96%) y se mezcló mediante agitación en Vórtex®, el material del tubo se colocó en una columna (provista en el kit) y se centrifugó como indica el fabricante (11 000 x G durante 1 minuto). El sobrenadante fue descartado y se colocó la columna en un tubo colector; para llevar a cabo el lavado de la columna se utilizaron 500 µl de Buffer de lavado GW1 y se centrifugó a las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente. La columna se trasladó a un nuevo tubo colector y se repitió el proceso, esta vez adicionando 600 µl de Buffer de lavado GW2, el sobrenadante fue descartado. Se realizó un paso adicional de centrifugado y la columna fue colocada sobre un tubo de 1.5 ml. El Buffer de elución se precalentó a 70°C antes de usarse y se utilizaron 100 µl sobre la columna, se incubó 1 minuto y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. Por último, se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando GelRed como colorante y para observar la integridad del ADN. La fragmentación de esta molécula es uno de los eventos representativos de la apoptosis (Vanden Berghe et al., 2013; Villalpando-Rodríguez & Gibson, 2021).

Evaluación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar el efecto provocado por la Aquiluscidina en la generación de especies reactivas de oxígeno, se diseñó el siguiente ensayo: cubreobjetos de 12 mm de diámetro con un grosor de 0.13-0.17 mm (Pearl, PRL-7201-0013) se lavaron con detergente Dextran® al 2% y se enjuagaron 3 veces en agua destilada. Posteriormente, se remojaron en etanol absoluto y se flamearon para eliminar los residuos de etanol; finalmente, se esterilizaron por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos (Conejo-Cruz, 2023). Los cubreobjetos estériles se colocaron en el fondo de los pozos de una placa de cultivo de 24 pozos (NEST), después se trataron con poli-D-lisina (Gibco, A38904-1) a una concentración de 50 µg/ml durante 1.5 h a 37 °C. Subsecuentemente, se realizaron tres lavados con agua tridestilada estéril a los cubreobjetos en los pozos para eliminar el exceso de poli-D-lisina y se dejó secando la placa durante 2 h, destapada y dentro de la cabina de cultivo celular. En tubos de

1.5 ml colocaron cultivos consistentes en 5% de hematocrito con un 2% de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* en un volumen final de 630 μ l, a los cuáles se les añadieron, respectivamente: agua estéril (mismo volumen que la concentración evaluada de péptido, como control negativo), peróxido de hidrógeno (100 μ M, como control inductor de generación de especies reactivas de oxígeno) (Ward *et al.*, 1987; Park, 2016; Xiang *et al.*, 2016) y Aquiluscidina a una concentración de 20 μ M, misma que había demostrado tener actividad antimicrobiana contra esta especie de parásito. Las células se dejaron incubando durante 3 h a 37 °C y 5% de CO₂ en los pozos que contenían cubreobjetos tratados con poli-D-lisina. Se utilizó M199 base para este ensayo. Pasado este tiempo, se agregó la sonda fluores566cente Cell Rox (Invitrogen, C10444), 5 μ M y se dejó incubando la placa durante 30 minutos en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se lavaron los pozos con PBS estéril y se fijaron con paraformaldehído al 3.7% (diluido en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y cubierto de la luz. Posteriormente, se lavaron los pozos 1 vez con PBS estéril y se añadió DAPI (diluido 1:100 en PBS) sobre los pozos en donde se adhirieron las células, esto se hizo por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y con una agitación de 240 rpm, con PBS y se colocaron los cubreobjetos sobre una laminilla. Se preparó una solución de montaje (etanol 70%, agua destilada y glicerol, en la misma proporción) y se colocó el cubreobjetos con la cara, que tenía las células adheridas, hacia abajo. Se sellaron los bordes con barniz y se dejó secando toda la noche. Al día siguiente, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Como control del sistema, se utilizaron fibroblastos (cultivados en medio DMEM sin suero) tratados con H₂O₂ (100 μ M) y llevando a cabo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se tomaron fotografías de varios campos y se analizaron con el software ImageJ para determinar la intensidad media de fluorescencia. Los datos se analizaron posteriormente en GraphPad Prism 9.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de citotoxicidad

Tanto la Aquiluscidina como el Vcn-23 resultaron inocuos a bajas concentraciones, conservando el 100% de viabilidad celular a concentraciones de 12.5 μM . El porcentaje de células viables disminuyó conforme se aumentó la concentración de péptido con el que se trataron las células, es decir, hubo un efecto citotóxico dependiente de la dosis (Figura 5). La dosis letal 50 (DL₅₀) de la Aquiluscidina correspondió a 26.31 μM , en tanto que para el Vcn-23 fue de 56.27 μM .

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad coinciden con los publicados con anterioridad al evaluar el potencial citotóxico de distintas catelicidinas y sus péptidos derivados contra diversas líneas celulares. Tal es el caso de la crotalicidina (Ctn), que presentó una fuerte actividad citotóxica contra fibroblastos (IBR3G), teniendo una DL₅₀ con tan solo 6.25 μM ; en tanto que, sus derivados Ctn [1-14] y Ctn [15-34], fueron prácticamente inocuos a la concentración más alta evaluada, es decir, 100 μM (Falcao *et al.*, 2015). En el trabajo realizado por Cavalcante *et al.*, en 2017, se evaluó citotoxicidad de esta misma catelicidina y sus dos fragmentos ante células de riñón humano (HK-2), dando como resultado un menor efecto por parte de Ctn [1-14], cuya DL₅₀ fue de 400 μM , mientras que para Ctn [15-34] y Ctn fue de 50 y 3.12 μM , respectivamente. Estos resultados demuestran que el potencial citotóxico de cada péptido varía dependiendo del tipo celular contra el que se evalúan. Además, es notorio que las dosis a las que se presenta actividad citotóxica se modifican si el péptido evaluado es fragmentado, esto debido a la variación de sus características fisicoquímicas que influyen en su actividad biológica, como son carga, hidrofobicidad o grado de estructura secundaria adoptada (Dathe y Wieprecht, 1999).

Actividad antibabesia de los péptidos

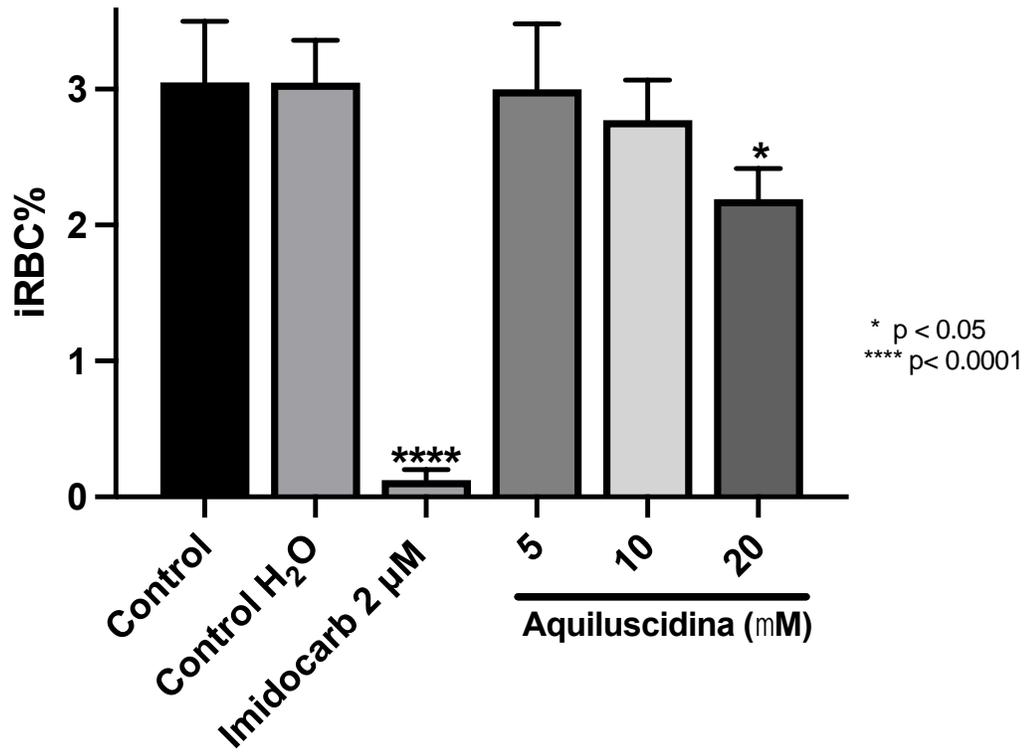
Al analizar la actividad antiparasitaria de ambas moléculas contra *Babesia bigemina* (aislado de Michoacán) en el ensayo de inhibición *in vitro*, con la catelicidina de *C. aquilus* (Aquiluscidina) se presentó una disminución en la cantidad de eritrocitos parasitados a la concentración más alta evaluada (20 μM) en comparación con los controles sin tratamiento y con agua (líquido en el cual fueron resuspendidos los péptidos), después de 96 h de incubación. En ambos controles, el PEP fue bastante similar (3.05%), mientras que, para esta

dosis de Aquiluscidina, se obtuvo un promedio de 2.19% de células infectadas, dando como resultado un 28.19% de inhibición en el crecimiento del parásito (Figura 10a). Al utilizar las concentraciones de 5 y 10 μM , los promedios de los porcentajes de eritrocitos infectados observados fueron de 3% y 2.77%, respectivamente (Figura 10a). Sin embargo, este decremento no resultó significativa al llevarse a cabo el análisis estadístico. Asimismo, ninguna de las concentraciones de menor rango presentó diferencias estadísticas con respecto a los controles de crecimiento.

Con relación al péptido derivado (Vcn-23), a pesar de que, a las tres mayores concentraciones (5, 10 y 20 μM), existieron ligeros decrementos en los porcentajes de células parasitadas (2.80%, 2.84% y 2.53%, respectivamente), estadísticamente estos resultados no fueron significativos (Figura 10b). Tampoco se presentaron diferencias a menores concentraciones. Respecto al tratamiento con dipropionato de imidocarb (2 μM), el promedio de crecimiento parasitario fue, únicamente, del 0.12%.

a)

Actividad de Aquiluscidina contra *B. bigemina*



b) Actividad de Vcn-23 contra *B. bigemina*

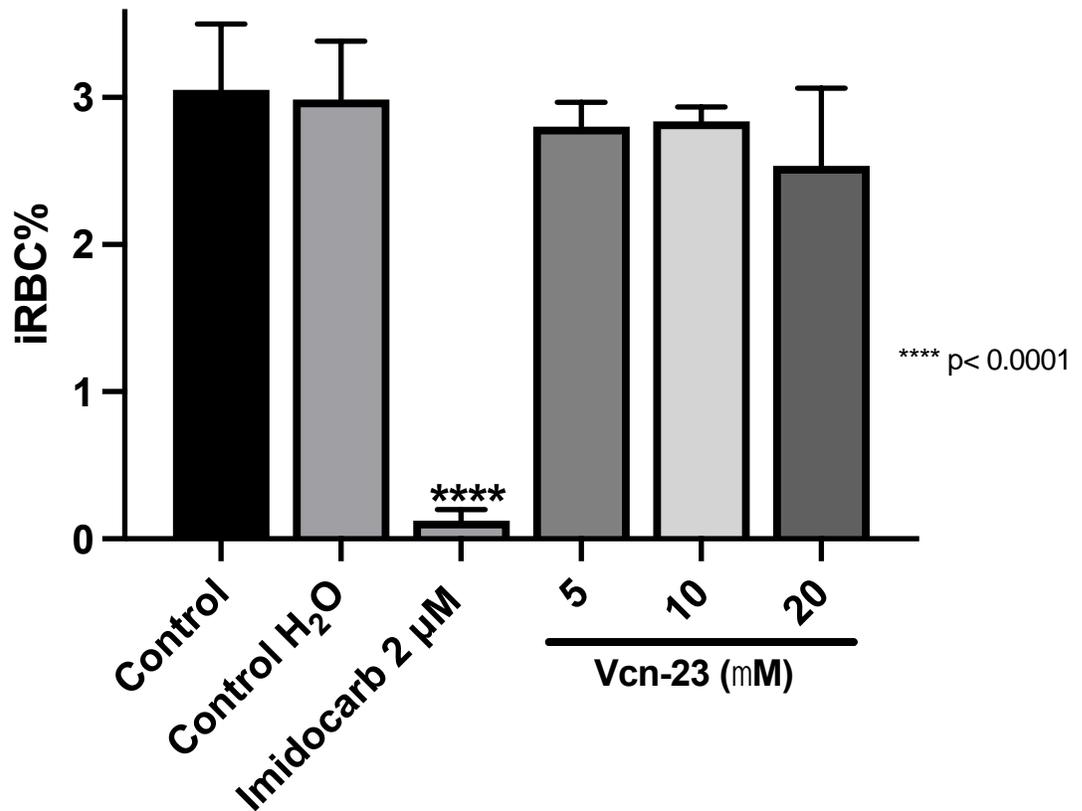


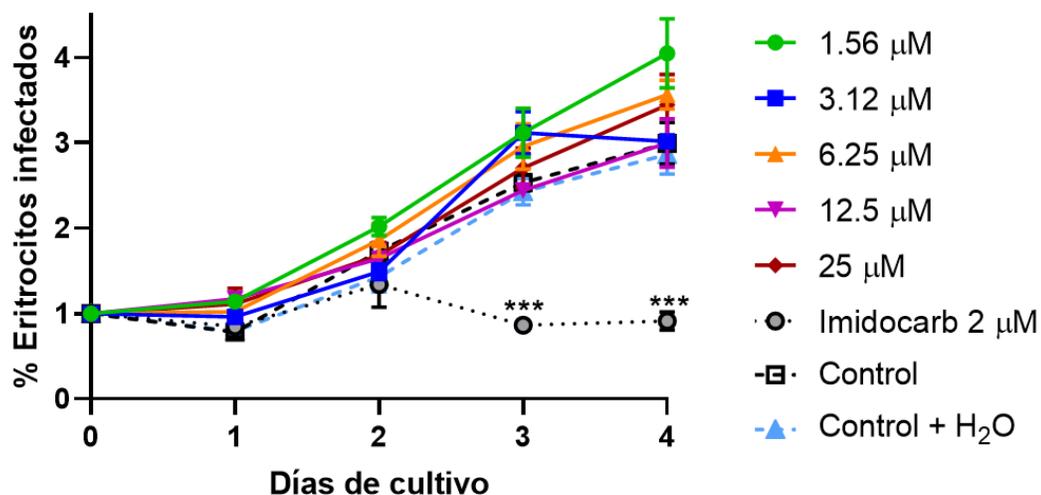
Figura 10. Porcentaje de eritrocitos infectados (iRBC%) por *B. bigemina* (aislado de Michoacán) resultantes a las 96 h de evaluación. a) Actividad de la Aquiluscidina y b) Actividad del Vcn-23. Se muestran las medias de los tratamientos y la desviación estándar de cada triplicado. En cada gráfica se muestran únicamente las 3 mayores concentraciones utilizadas de cada péptido, los tres controles: Control: sin tratamiento, Control H₂O: se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido, Imidocarb: tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * p < 0.05, **** p < 0.0001.

Con respecto a la evaluación de la actividad del Vcn-23 y la Aquiluscidina contra *B. bovis* (aislado de Puebla), los resultados obtenidos fueron relativamente similares en comparación con los observados para *B. bigemina* (aislado de Michoacán); aunque cabe destacar que, para este ensayo, se decidió modificar el rango de concentraciones (1.56-25 µM), considerando los resultados del experimento previamente descrito. Para el caso de la Aquiluscidina (Figura 11a), es posible apreciar que ninguna de las concentraciones evaluadas presentó actividad inhibitoria en comparación con los controles de crecimiento sin

tratamiento (línea punteada color negro y cuadro blanco) y control con agua (línea punteada y triángulo color azul claro). Con relación a la actividad mostrada en la Figura 11b, por el péptido Vcn-23, es perceptible que hay una ligera disminución en el porcentaje de eritrocitos infectados con los tratamientos a distintas concentraciones de los péptidos en comparación con los controles de crecimiento, Control, 2.99%; Control H₂O, 2.86%, a las 96 h. Esta reducción se hace un poco más evidente con la concentración más alta evaluada (PEP de 2.13% con 25 μ M, después de 96 h); sin embargo, ninguno de los tratamientos tuvo una diferencia estadística significativa con los grupos controles, por lo que se consideró que el Vcn-23 tampoco ejercía una actividad inhibitoria en el crecimiento *in vitro* de *B. bovis* (aislado de Puebla). Al mismo tiempo, es importante recalcar que el dipropionato de imidocarb no eliminó por completo al parásito cuando se utilizó a una concentración (2 μ M) que anteriormente había demostrado ser completamente eficiente para erradicar a *B. bigemina* (aislado de Michoacán); limitando su actividad, en el caso de *B. bovis* (aislado de Puebla), a mantener el porcentaje de eritrocitos infectados cercano al número utilizado para iniciar el experimento (0.91%, a las 96 h). Adicionalmente, su actividad antibabesia comenzó a ser significativamente notoria hasta el tercer día de tratamiento.

a)

Actividad de Aquiluscidina contra *B. bovis*



b) Actividad de Vcn-23 contra *B. bovis*

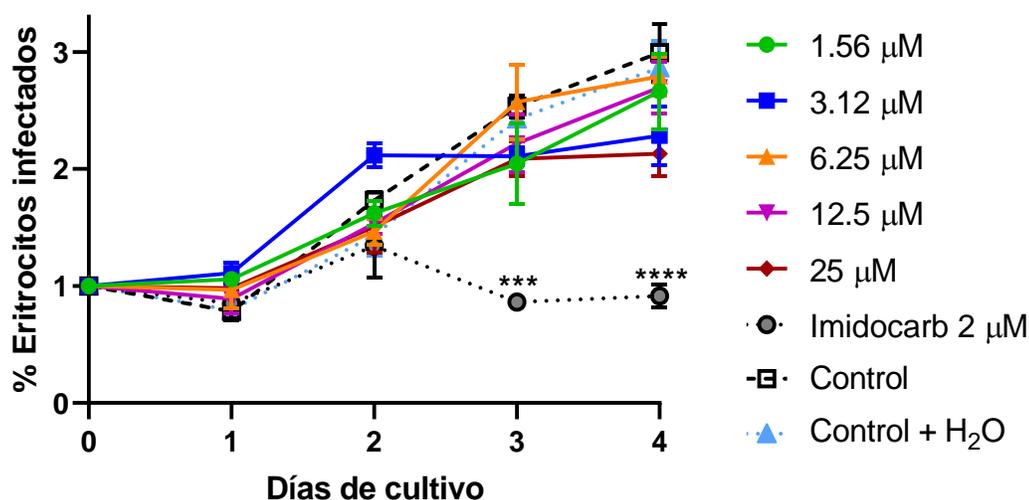


Figura 11. Resultado del ensayo contra *B. bovis* (aislado de Puebla) Porcentaje de eritrocitos infectados (iRBC%) observados durante los 4 días de evaluación. a) Actividad de la Aquiluscidina y b) del Vcn-23. Se muestran las medias de los tratamientos y la desviación estándar de cada triplicado. En cada gráfica se representan todas las concentraciones utilizadas de cada péptido, los tres controles: Control: sin tratamiento, Control H₂O: se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido, Imidocarb: tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

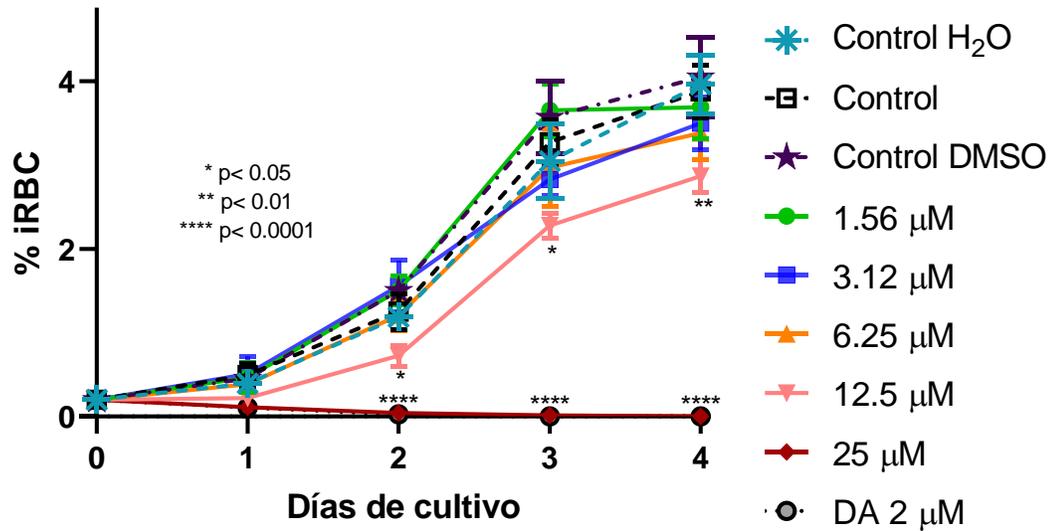
En cuanto a los ensayos realizados con *B. ovata* (cepa Miyake) y *B. bovis* (cepa Texas), se trabajó con medio GIT (sin adición de suero). Para el primer caso (Figura 12a), el tratamiento con la Aquiluscidina a la más alta concentración (25 μM , PEP de 0.11%), desde el día 1 de evaluación tuvo diferencia significativa en comparación con los controles de crecimiento: Control, 0.49%; Control H₂O, 0.39% y Control DMSO (diluyente del diacetato de diminazeno, al mismo volumen usado para este componente), 0.45%. A su vez, fue perceptible una disminución a las dos concentraciones inmediatamente anteriores (6.25 y 12.5 μM); no obstante, careció de significancia estadística. A partir del día 2, con 25 μM , se eliminó, casi por completo, la presencia de parásitos en los frotis, esto fue constante durante el resto del ensayo. Aunado a esto, a la concentración de 12.5 μM , la diferencia comenzó a ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$) a partir de este día de evaluación, con una reducción del 38.75%, tendencia que se mantendría hasta transcurridas las 96 h totales del experimento, disminuyendo el crecimiento parasitario en un 25.27% y 27.60%, en los

días 3 y 4, respectivamente. El resto de las concentraciones utilizadas, no tuvieron efecto antibabesia en ninguno de los días de evaluación.

Posteriormente, se realizó el ensayo para determinar la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de la Aquiluscidina contra *B. ovata*, utilizando aquellas dosis en las que se observó efecto antiparasitario (12.5 y 25 μM) e incluyendo una intermedia (18.75 μM) para el cálculo de este valor. Los porcentajes utilizados para este fin fueron los obtenidos a las 96 h, utilizando el denominado “Control H₂O” como referencia del 0% de inhibición del crecimiento. Como se observa en la Figura 12b, con la concentración más baja, se tuvo un PEP de 3.24%, que en comparación con el registrado para el control (3.86%), corresponde a un decremento del 16.91%. Con relación a las otras cantidades de péptido analizadas, se alcanzó un porcentaje de disminución de parásitos contados de 94.22% (PEP de 0.22%) y 99.66% (considerado como el 100% de inhibición, con un PEP de 0.01%) con 18.75 y 25 μM , respectivamente. Luego de hacer la regresión no lineal, con los concernientes puntos en la curva, se interpoló el valor que correspondería al 50% de inhibición del crecimiento de *B. ovata*, resultando en una IC_{50} de 14.48 μM (Figura 12c).

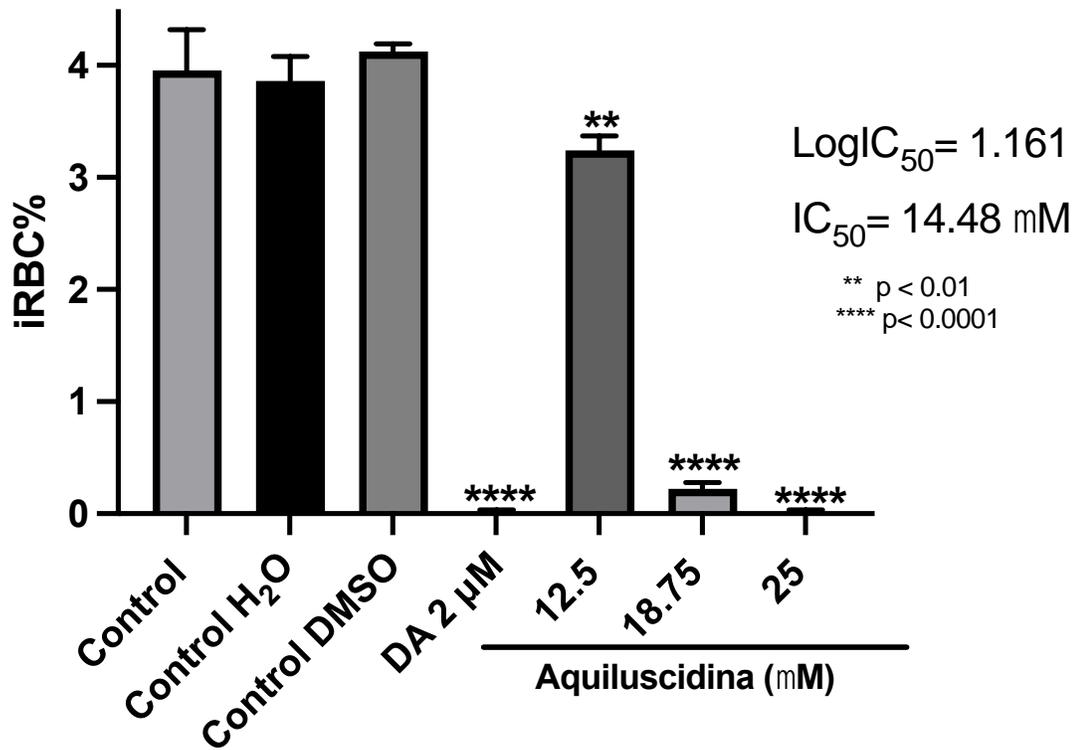
Por otra parte, el Vcn-23 fue incapaz de aminorar la cantidad de eritrocitos infectados a todas las concentraciones probadas, durante la totalidad del ensayo (Figura 12d); inclusive, la concentración de 50 μM careció de efecto antibabesia (datos no mostrados). El diaceturato de diminazeno (DA), provocó una eliminación total del parásito a partir de la segunda aplicación (Figura 12d).

a) Actividad de Aquiluscidina contra *B. ovata*



b) Actividad de Aquiluscidina contra *B. ovata*

b)



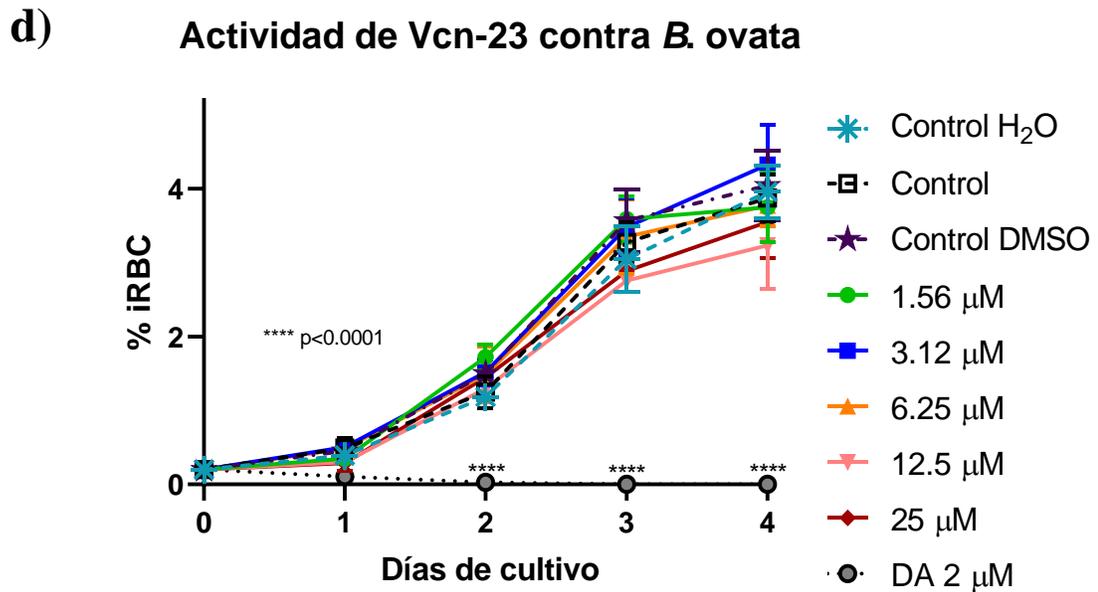
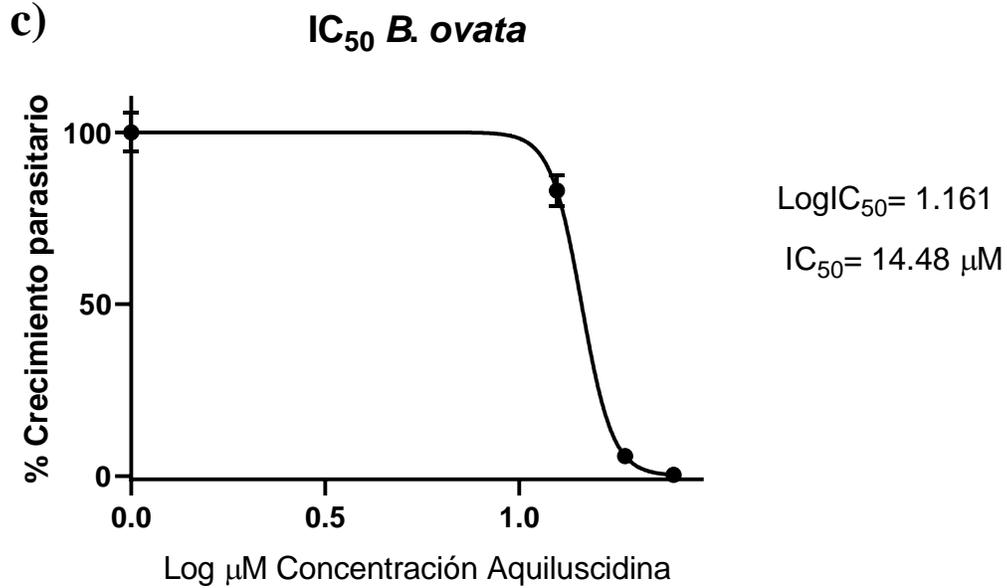
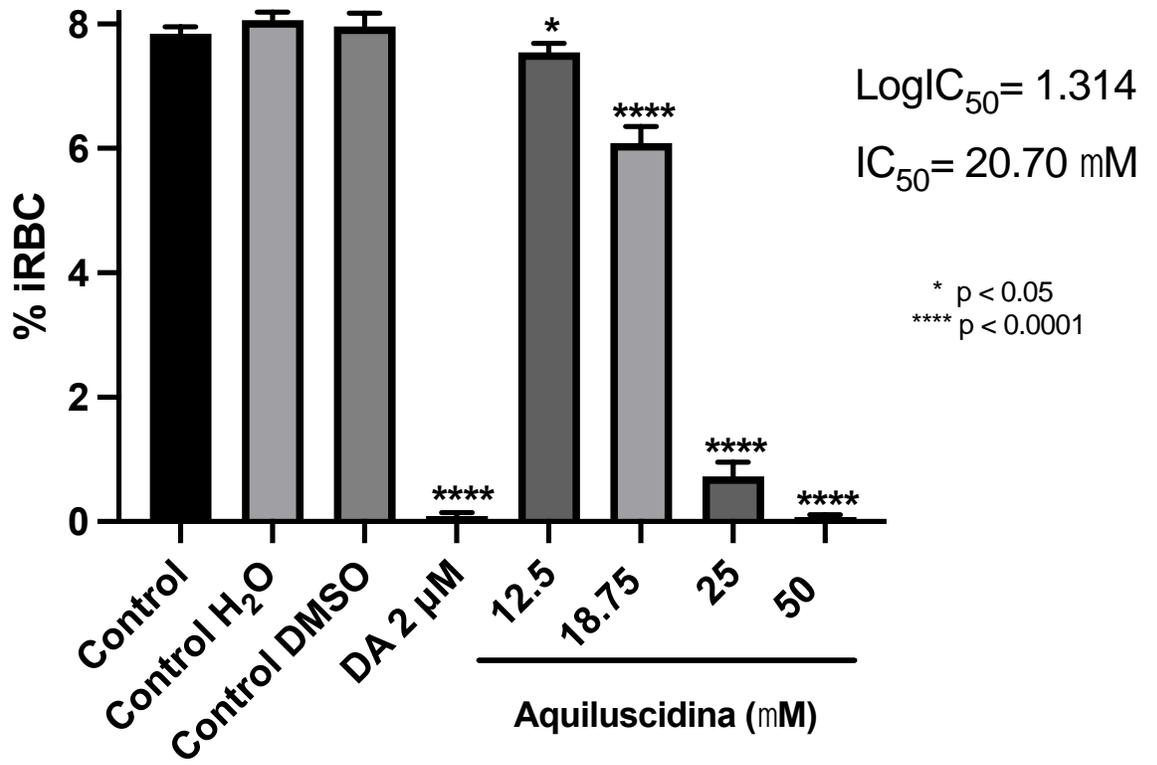


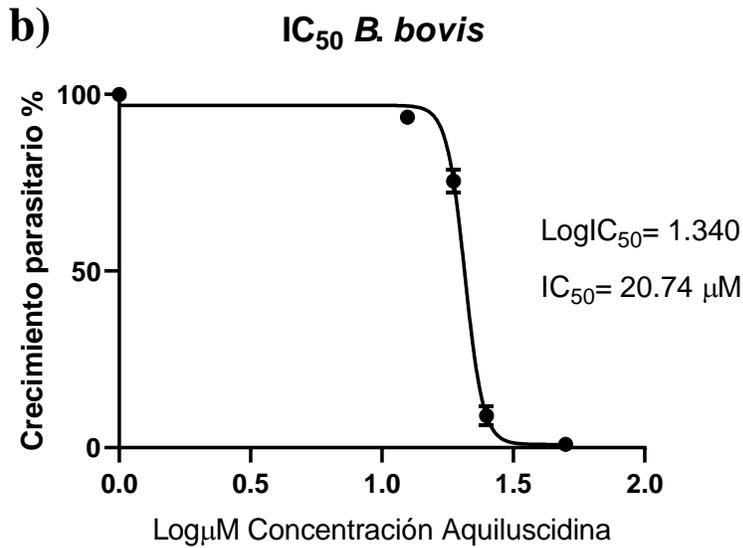
Figura 12. Actividad de los péptidos contra *B. ovata* (cepa Miyake). a) Efecto inhibitorio de la Aquiluscidina durante los 4 días de evaluación. b) Ensayo para la determinación de la IC₅₀ de la Aquiluscidina contra *B. ovata*, se muestran los resultados obtenidos a las 96 h, la IC₅₀ se expresa en unidades µM. c) Regresión no lineal para el cálculo de la IC₅₀ de la Aquiluscidina contra *Babesia ovata*. d) Actividad del Vcn-23 contra de *B. ovata*. En cada gráfica se representan los promedios y la desviación estándar de los triplicados de cada tratamiento con los péptidos y los controles: Control, sin tratamiento; Control H₂O, se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido; Control DMSO, mismo volumen que el tratamiento con DA; DA, diacetato de diminazeno, tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. iRBC%: porcentaje de eritrocitos infectados. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

En lo que concierne a los ensayos con *B. bovis* (cepa Texas), la Aquiluscidina mostró un efecto antiparasitario durante el experimento de cuatro días. Posteriormente, se procedió a realizar la determinación de la IC₅₀ utilizando las concentraciones de 12.5, 18.75, 25 y 50 µM (Figura 13a). El Control H₂O indicaría el 100% (PEP, 8.06 %) del crecimiento; a las dosis usadas se tuvo un PEP de 7.54 %, 6.08 %, 0.72 % y 0.06 %; lo que corresponde a una inhibición del 6.45 %, 24.54 %, 90.99 % y 99.04 % (considerado como 100%), respectivamente. Al interpolar los valores, se obtuvo una IC₅₀ de 20.74 µM (Figura 13b). La actividad antiprotozoaria de la Aquiluscidina fue dependiente de la concentración, siendo que en la más alta utilizada contra cada especie se logró, prácticamente, la completa inhibición del desarrollo parasitario tanto en *B. bovis* (cepa Texas) como en *B. ovata* (cepa Miyake).

Para el caso del Vcn-23, este péptido no tuvo un efecto antimicrobiano directo contra esta especie (Figura 13c). Sin embargo, es importante destacar que, durante los primeros días del ensayo, fue apreciable una disminución en la cantidad de parásitos detectados al microscopio; lamentablemente, esta actividad no pudo mantenerse a lo largo de la duración total del experimento y tampoco tuvo significancia estadística.

a) Actividad de Aquiluscidina contra *B. bovis*





c) Actividad de Vcn-23 contra *B. bovis*

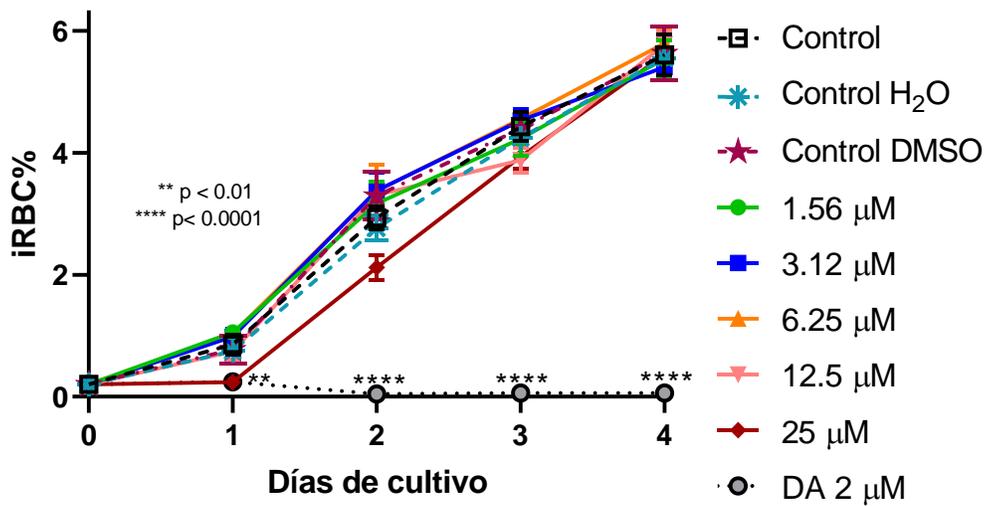


Figura 13. Actividad de los péptidos contra *B. bovis* (cepa Texas). a) Ensayo para la determinación de la IC₅₀ de la Aquiluscidina contra *B. bovis*, se muestran los resultados obtenidos a las 96 h, la IC₅₀ se expresa en unidades µM. b) Regresión no lineal para el cálculo de la IC₅₀ de la Aquiluscidina contra *Babesia bovis*. d) Actividad del Vcn-23 contra de *B. bovis*. En cada gráfica se representan los promedios y la desviación estándar de los triplicados de cada tratamiento con los péptidos y los controles: Control, sin tratamiento; Control H₂O, se agregó agua inyectable correspondiente al mismo volumen que el utilizado en la concentración más alta de péptido; Control DMSO, mismo volumen que el tratamiento con DA; DA, diacetato de diminazeno, tratamiento con la droga comercial comúnmente usada contra la babesiosis bovina. iRBC%: porcentaje de eritrocitos infectados. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Dunnett; * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

En estos ensayos, se analizó la acción antiparasitaria de los péptidos Aquiluscidina y Vcn-23 frente a las principales especies de *Babesia* que afectan al ganado bovino, las cuales tienen relevancia económica en la ganadería. Entre ellas, *B. bovis* se destaca por su alta patogenicidad y distribución global (Hakimi & Verocai, 2023); *B. bigemina*, es uno de los principales causantes de la piroplasmosis bovina y presenta el mayor índice de prevalencia en México, debido a su rápida propagación y prolongada permanencia en el torrente sanguíneo del bovino, provocando anemia hemolítica (Almazán *et al.*, 2022). Por otro lado, *B. ovata* es un parásito que se encuentra en el este de Asia, afectando a animales con sistemas inmunológicos debilitados, lo que ha motivado la búsqueda de mejores estrategias de control (Sivakumar *et al.*, 2016).

La Aquiluscidina demostró tener efecto antiparasitario contra todas las especies evaluadas, sin embargo, existen puntos importantes a destacar con respecto a los resultados observados. La actividad antibabesia de este péptido, en contra de *Babesia bovis* (cepa Texas) *Babesia ovata* (cepa Miyake), fue dependiente de la concentración. Asimismo, a las mayores cantidades utilizadas fue capaz de eliminar, prácticamente en su totalidad, la presencia de estos microorganismos en sus correspondientes evaluaciones y, además, fue posible calcular la IC₅₀, para ambos casos. Como se muestra en el Cuadro 1, estos valores de la concentración inhibitoria media máxima son comparables con los obtenidos en ensayos con otros componentes estudiados como candidatos a tratamientos contra *Babesia* spp., cuyos rangos se ubican entre 4.7 y 206 µM. Por otro lado, estos valores también permiten cotejar la efectividad de la Aquiluscidina con lo reportado para otros péptidos antimicrobianos contra protozoos. Tal es el caso de la clasificación propuesta por McGwire & Kulkarni, (2010) según la concentración de cada péptido que permite inhibir el crecimiento o eliminar algunas especies de protozoos. Estos datos se recabaron para *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. Considerando esta referencia, la Aquiluscidina tendría un valor de actividad de +2, lo que coincide con otras moléculas similares como Pexiganan, Magainina-2, Protegrina-1, Criptidina 1-4, entre otros (McGwire & Kulkarni, 2010).

Esto contrasta con el resultado que previamente obtuvimos con *B. bovis* (aislado de Puebla), en el cual ninguna de las concentraciones fue efectiva para inhibir su crecimiento.

Adicionalmente, en el experimento contra *B. bigemina* (aislado de Michoacán), únicamente se vio una disminución significativa al utilizar 20 μM ; no obstante, no se limitó por completo el crecimiento de este protozoo. Esta notoria diferencia podemos atribuirla a la presencia de alto contenido de suero (40%) en el medio en el que los últimos dos aislados fueron cultivados, lo cual pareciera ser una limitante para que el péptido lleve a cabo su actividad biológica de manera eficiente.

Los tratamientos con péptidos se han visto afectados por la disminución de su efectividad en ciertas condiciones, tales como presencia grandes cantidades de sales o enzimas séricas con acción proteolítica, lo que compromete su potencial antimicrobiano (Mohanram & Bhattacharjya, 2016; Pachón-Ibañez *et al.*, 2017; Browne *et al.*, 2020). El suero presenta, también, otro tipo de elementos, como albúmina o lipoproteínas, que pueden interactuar con los péptidos de defensa del hospedante (HDPs), lo que aminora su eficiencia microbicida (Schweizer, 2009). Esto se ha hecho evidente en el trabajo de Lichtenstein *et al.* (1986), en el que las defensinas humanas HNP disminuyeron su actividad citotóxica en un 30% y 75%, contra líneas celulares tumorales humanas y murinas, al usar suero fetal bovino en un porcentaje del 1% y 5%, respectivamente. Comúnmente, el potencial antimicrobiano directo de este tipo de compuestos es mostrado, principalmente, en ensayos libres de suero o con bajas concentraciones de este, lo que dificulta su evaluación en condiciones fisiológicas (Adade *et al.*, 2013; El Chamy Maluf *et al.*, 2016; Bandeira *et al.*, 2018). Por consecuencia, se hace énfasis en comprender la estructura de estas moléculas y en el diseño de derivados con mejor actividad en este tipo de condiciones (Pachón-Ibañez *et al.*, 2017).

Se han seguido distintas estrategias para solventar este inconveniente y mejorar el desempeño de los péptidos antimicrobianos en ambientes adversos, aumentar su estabilidad y reducir los efectos contra las células del hospedante, uno de los ámbitos más estudiados es la modificación a su conformación química (Nguyen *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018). Para el caso de péptidos con configuración de hélice- α , la amidación C-terminal es frecuentemente utilizada debido a que se ha reportado que aumenta la atracción electrostática hacia las membranas y la acción microbicida, otorga resistencia a la degradación enzimática y la adquisición de la estructura secundaria (Rivas *et al.*, 2008; Muera *et al.*, 2016; Greber & Dawgul, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Como muestra de ello, se ha detallado que esta amidación

C-terminal ha incrementado el efecto leishmanicida de la Decoralina, péptido del veneno de la avispa *Oreumenes decoratus* (Konno *et al.*, 2007).

Las dos catelicidinas de *C. aquilus* fueron adquiridas con esta modificación, tal como se hizo anteriormente (Hernández-Arvizu *et al.*, 2023). No obstante, la actividad antibabesia de la Aquiliscidina se vio alterada por la alta concentración de suero en el medio de cultivo. Se ha descrito que, pese a esta amidación, los péptidos lineales siguen siendo susceptibles a degradación por carboxipeptidasas presentes en el suero (Nguyen *et al.*, 2010). Tal como se mencionó previamente, también la interacción con otros componentes séricos puede interferir en el accionar de estas moléculas. Tanto la Aquiluscidina como el Vcn-23 presentan características similares a las mostradas por las catelicidinas de *C. durissus*, tales como una conformación helicoidal en el extremo N-terminal, proseguido de un segmento de carácter hidrofóbico y, la antes aludida, amidación C-terminal. Se caracterizó que estas propiedades fueron cruciales para en estos péptidos interactuaran con globulinas, albúmina y apolipoproteínas presentes en el suero (Pérez-Peinado *et al.*, 2019a; Pérez-Peinado *et al.*, 2019b). En vista de dicha similitud estructural, no se descarta la ocurrencia de este fenómeno durante los experimentos contra *B. bovis* (aislado de Puebla) y *B. bigemina* (aislado de Michoacán); aunque esto no implicaría, necesariamente que los péptidos se estén degradando al ser expuestos a ciertos porcentajes de suero. Estos factores, en conjunto, hacen que se requiera usar mayores concentraciones de péptidos para alcanzar dosis efectivas en los ensayos conducidos bajo este tipo de condiciones (Nguyen *et al.*, 2010), así como el cálculo de IC₅₀ más elevadas (Bandeira *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Análisis comparativo de las IC₅₀ obtenidas para la Aquiluscidina y otros compuestos evaluados contra *Babesia* spp.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) contra <i>B. bigemina</i>	IC ₅₀ (μM) contra <i>B. bovis</i>	IC ₅₀ (μM) contra <i>B. caballi</i>	IC ₅₀ (μM) contra <i>T. equi</i>	IC ₅₀ (μM) contra <i>B. ovata</i>	Referencia
<i>Syzygium aromaticum</i> (clavo)	8.7	109.8	19.6	60	-	Batiha et al., 2019
<i>Camellia sinensis</i> (té verde)	71.3	114	32.7	60.8	-	Batiha et al., 2019
Nerodilol	29.6	21	23.1	-	29.6	AbouLaila et al., 2010
Derivado de ciprofloxacina:						
3	13.7	32.9	14.9	30.9	-	
5	25.8	14.9	13.6	27.5	-	
10	33.9	34.9	21.1	22.3	-	Batiha et al., 2020
14	28.3	26.7	34.5	29.1	-	
15	26.6	4.7	33.9	29.1	-	
Atranorin	64.5	98.4	46.6	71.3	-	Beshbishy et al., 2020
Clindamicina	206	126.6	4.7	27.2	-	AbouLaila et al., 2012.
Aquiluscidina		20.70	-	-	14.48	Este trabajo

Complementando lo anterior, otras catelicidinas (incluyendo sus péptidos derivados), han sido evaluadas satisfactoriamente contra *Plasmodium* spp. y *Trypanosoma* spp., en presencia de un porcentaje de suero $\leq 10\%$ en el medio de cultivo. La acción microbicida, en estos casos, se ha presentado favorablemente, identificando IC₅₀ en intervalos entre 3.045–33.1 μM (Cauchard *et al.*, 2016; Mello *et al.*, 2017; Bandeira *et al.*, 2018; Fang *et al.*, 2019). En otras proteínas con actividad antiparasitaria, este hecho también ha quedado de manifiesto (El Chamy Maluf *et al.*, 2016). Conjuntamente, habría que considerar que, en el caso de algunos modelos de protozoos, la eficacia de los HDPs también se ve alterada dependiendo el estadio de desarrollo de los parásitos (Lynn *et al.*, 2011); en ocasiones, las etapas intracelulares, requieren de mayores concentraciones que aquellas extracelulares, por ejemplo (Bandeira *et al.*, 2018). Esto se ha evidenciado en ensayos contra *Leishmania* spp., en el que ciertos AMPs han sido eficientes contra los promastigotes a determinadas dosis; sin embargo, para eliminar a los amastigotes se han necesitado cantidades mayores (Marr *et al.*, 2016).

Aunado a lo descrito previamente, se debe contemplar que los péptidos antimicrobianos pueden tener distintos espectros de actividad dependiendo del tipo de microorganismo blanco, por lo que las características particulares de cada patógeno representan un rol crucial. A manera de ejemplificación, sirva el caso de los péptidos AMP1 y AMP2, derivados del longicin (defensina identificada en *H. longicornis*), cuando se analizó su actividad contra *B. bovis* y *B. bigemina* a una concentración de 50 μM . El péptido AMP1 demostró un efecto inhibitorio del crecimiento de *B. bigemina* ($p < 0.05$), mientras que el AMP2 disminuyó la cantidad de parásitos en comparación con el control, sin embargo, no tuvo significancia estadística. Ninguno de los dos péptidos inhibió el crecimiento de *B. bovis*. Se justificó este hallazgo, principalmente, con la desigual cantidad de merozoitos resultantes, aspecto condicionado por la talla de cada especie, después de realizada la fisión binaria y a las diferencias en las condiciones de cultivo. Ambas circunstancias serían favorables para el crecimiento de esa cepa de *B. bovis* (Tsuji *et al.*, 2012). Además, algunos factores de virulencia, representativos de cada clase microorganismos, también influyen en su susceptibilidad a ciertos componentes. Este es el caso de la producción de metaloproteasas en determinados protozoos, que les confieren resistencia ante diversos mecanismos

inmunitarios, como la acción de defensinas y catelicidinas, lo que les permite subsistir (Kulkarni *et al.*, 2006). Esta clase de moléculas se han identificado en *B. bovis* y, de hecho, la inhibición de su actividad enzimática tiene consecuencias negativas en el crecimiento de este microorganismo (Munkhjargal *et al.*, 2016). Por lo tanto, la efectividad de la actividad antimicrobiana directa de los péptidos de defensa del hospedante depende de diversos factores.

Todo lo descrito con anterioridad podría explicar la falta de efecto antimicrobiano de los péptidos de *C. aquilus* contra *B. bovis* (asclado de Puebla), y el ligero efecto de la Aquiluscidina observado en contra de *B. bigemina* (aislado de Michoacán), ambas obtenidas a partir de infección experimental, ejemplificando la susceptibilidad de una especie ante el tratamiento con estos componentes. También es probable que la calidad de los sueros utilizados en el cultivo aumente las variables entre experimentos. Además, se ha reportado que la susceptibilidad de *B. bovis* hacia los componentes con actividad antibabesia depende de la cantidad de suero con que se suplemente el cultivo *in vitro*. De modo que, a menor porcentaje de suero en el medio, menor concentración de fármaco es requerida para inhibir el crecimiento de este parásito. Es probable que este efecto sea igualmente relacionado a la interacción de los medicamentos con la albúmina sérica bovina (Bork *et al.*, 2005). Esto podría tener relación con el menor efecto inhibitorio del dipropionato de imidocarb (2 μM) en *B. bovis* en comparación con *B. bigemina*.

A pesar de esto, es posible explicar la razón por la cual la Aquiluscidina sí presentó efecto inhibitorio en el crecimiento de *B. bigemina*. Anteriormente, se determinó que el Ctn [15-34], fragmento C-terminal de la molécula de la catelicidina Ctn (crotalicidina), tenía mayor estabilidad en suero que su péptido parental. Después de incubarse por 24 h a 37 °C, se identificó que el Ctn [15-34] poseía una vida media en suero de 770 minutos, mucho más que el péptido del cual se deriva que registró solamente 71 minutos como vida media. También se destaca que el fragmento N-terminal, Ctn [1-14], cuya estructura completa se conforma por una α -hélice, fue el más susceptible a inactivación por el efecto del suero, ya que únicamente permaneció estable por 21 minutos (Falcao *et al.*, 2015). Posteriormente, se describió que la estabilidad en suero encontrada en Ctn [15-34] era resultado de un conjunto de factores característicos de esta molécula, mismas que se mencionaron con anterioridad:

un arreglo helicoidal N-terminal que se continúa con un fragmento hidrofóbico, además de la amidación C-terminal con la que fue sintetizado (Pérez-Peinado *et al.*, 2019b). De manera adicional para este derivado, se caracterizó su interacción con 5 proteínas séricas con funciones de unión o transporte categorizadas como apolipoproteínas, globulinas y de la superfamilia de la albúmina. Se detalló que este mecanismo de interacción se daría por la presencia de los aminoácidos hidrofóbicos del péptido y la capacidad de unión de las proteínas séricas a compuestos con esta característica. Por lo tanto, la estabilidad en suero presentada por el Ctn [15-34] también sería consecuencia de su asociación con estos elementos (Pérez- Peinado *et al.*, 2019a).

Adicionalmente, se conoce que la acción antimicrobiana de los péptidos se lleva a cabo de forma rápida; por ejemplo, se ha registrado que las catelicidinas ocasionan alteraciones en *Trypanosoma* spp., dentro de los primeros 15 minutos posteriores a su aplicación (Cauchard *et al.*, 2016). Por consecuencia, el tiempo en el que la Aquiluscidina permanecería viable en el medio de cultivo con suero, podría ser suficiente para ocasionar daños en la estructura de *Babesia*.

Los péptidos antimicrobianos son capaces de actuar contra este tipo de microorganismos, debido a ciertas modificaciones que los parásitos causan en los eritrocitos una vez que los han infectado. Por ejemplo, se ha caracterizado que los eritrocitos experimentan una serie de cambios en su estructura membranal posterior a la infección con *P. falciparum*. Entre estas alteraciones, se distinguen la apariencia dentada, con una superficie conformada por protuberancias y hendiduras, estructuras visualizadas por medio de microscopía electrónica. Estas modificaciones podrían estar relacionadas con la adhesión de los eritrocitos al endotelio vascular (Aikawa *et al.*, 1985). También se ha descrito que las alteraciones en la forma de la membrana plasmática de los eritrocitos pueden variar dependiendo la especie de *Plasmodium* que las infecte, sin embargo, de manera general se describen: hendiduras, invaginaciones, formación de vesículas y protuberancias. La probable función de estas modificaciones es el transporte y la expresión de antígenos y proteínas del parásito (que pudieran ser necesarias para la adhesión a endotelios) en la superficie de los glóbulos rojos (Aikawa, 1988).

Los fosfolípidos en las membranas de los eritrocitos infectados con *P. falciparum* experimentan una modificación en cuanto al tipo y cantidad de cada uno en comparación con las células rojas no infectadas. Entre estas alteraciones, se encuentran la disminución de ácidos grasos poliinsaturados que los conforma, una considerable reducción en la presencia de esfingomielina y colesterol en la cara externa de la membrana, un aumento en la cantidad de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, existe también un descenso en la presencia de ácidos linoleico, docosaheptaenoico y araquidónico y un aumento de ácido oleico y palmítico. Esto traería como consecuencia un aumento de la fluidez membranal y una configuración que se acerca a la que presentan los trofozoítos y esquizontes del parásito (Hsiao *et al.*, 1991). Lo descrito anteriormente podría ser un proceso necesario para la conformación de nuevas membranas parasitarias requeridas durante la etapa de reproducción asexual de *Plasmodium* (Elabbadi *et al.*, 1997). En otros trabajos, se ha identificado el incremento de fosfatidilserina en la superficie del eritrocito infectado por trofozoítos, lo mismo ocurre con los niveles de fosfatidiletanolamina, en conjunto con la disminución de fosfatidilcolina. Un descenso en la esfingomielina y mayor presencia de fosfatidilserina se aprecian en la región externa de la membrana de células que contienen esquizontes (Maguire *et al.*, 1991). Se ha determinado que, durante la etapa de trofozoíto, su membrana presenta un aumento en el contenido de fosfatidiletanolamina, fosfolípido que puede derivarse de la descarboxilación de fosfatidilserina (Elabbadi *et al.*, 1997). En conjunto, estos cambios conformacionales serían fundamentales para que los péptidos antimicrobianos tuvieran efecto selectivo sobre los eritrocitos infectados y, además, pudieran mostrar afinidad hacia la membrana del parásito dentro del eritrocito (Gelhaus *et al.*, 2008; El Chamy Maluf, 2016). Algunas de las alteraciones mencionadas previamente, también se han identificado en glóbulos rojos bovinos que han sido parasitados por *B. bovis* (Gohil *et al.*, 2010).

Anteriormente, el Vcn-23 evidenció una capacidad microbicida a bajas concentraciones contra distintas cepas de bacterias, ensayos en los que, en ciertos casos, precisó de menor concentración que la Aquiluscidina y presentando menor potencial citotóxico y hemolítico (Hernández-Arvizu *et al.*, 2023). Esto confirma que las características fisicoquímicas del Vcn-23 le confieren un buen espectro de actividad comparable con el

mostrado por catelicidinas completas, propiedad que resulta relevante si se considera que es una molécula de menor tamaño y, por consecuencia, más fácil de producir y a un menor costo. Sin embargo, respecto a los resultados que se obtuvieron en el ensayo antibabesia, el Vcn-23 demostró una pérdida de efectividad en comparación con la Aquiluscidina, siendo incapaz de disminuir la cantidad de parásitos observados en los frotis con cada una de las concentraciones utilizadas. Esta falta de actividad microbicida puede deberse principalmente al menor carácter catiónico, característica crucial en los péptidos antimicrobianos. La disminución de esta actividad se ha observado en varios derivados de AMP's que, al ver modificados el tamaño, la secuencia y sus propiedades fisicoquímicas al compararse con los péptidos de los cuales se originan, tienden a ser menos eficientes o a no causar inhibición en el crecimiento de los patógenos (Wei *et al.*, 2015). En otros estudios, los fragmentos de péptidos antimicrobianos o sus derivados han mostrado una menor capacidad microbicida en contra de protozoarios intracelulares. Esto se identificó para Ctn [1-14] y Ctn [15-34], fragmentos de la crotalicidina (Ctn), resultaron ineficientes contra el epimastigote de *T. cruzi*, siendo que su péptido parental tuvo una dosis efectiva media de 4.47 μM ; aunado a esto, cuando se analizó su efecto contra el tripomastigote de este parásito, la crotalicidina necesitó de una concentración media efectiva 43 veces menor que la requerida para Ctn [15-34] y 150 veces más baja que para Ctn [1-14] (Bandeira *et al.*, 2018), exhibiendo una pronunciada diferencia entre las moléculas derivadas y el péptido nativo.

Esta diferencia también es apreciable en péptidos antimicrobianos de otras fuentes animales, así como sus derivados. Tal es el caso del péptido longicin, identificado en la garrapata *Haemaphysalis longicornis*, el cual resultó eficiente en los ensayos *in vitro* contra *Theileria equi* inhibiendo prácticamente por completo su crecimiento a partir del segundo día requiriendo 1.0 μmol de péptido. Cuatro péptidos derivados de longicin fueron sintetizados (P1, P2, P3 y P4) y evaluados. Ninguno de los tres primeros pudo emular la actividad mostrada por el péptido parental, siendo únicamente P4 quien tuvo actividad parasiticida, reduciendo de forma importante la cantidad de eritrocitos infectados para el día 4 de la infección y necesitando para ello 5.0 μmol (Tsuji *et al.*, 2007). A pesar de la baja concentración precisada por P4 y de su enorme potencial antiprotozoario cabe mencionar que, para igualar el efecto observado por el péptido del cual se origina, se necesitó aplicar 5

veces la cantidad utilizada por longicin, confirmando que los péptidos derivados son, en su mayoría, ligeramente menos eficientes que aquellos de los cuales se generan.

Finalmente, considerando los resultados obtenidos tanto para la Aquiluscidina como para el Vcn-23, es de importancia señalar lo siguiente: a pesar de que ambos péptidos demostraron una nula actividad hemolítica contra eritrocitos de mamíferos (Hernández-Arvizu et al., 2023), esto no fue exactamente igual a su potencial citotóxico contra células nucleadas. Para el caso de la Aquiluscidina, su DL_{50} fue de 26.31 μ M, que es bastante cercana a sus IC_{50} contra *B. ovata* (cepa Miyake) y *B. bovis* (cepa Texas). Esto podría considerarse una limitante para su utilización. A su vez, el hecho de que este efecto antibabesia se haya presentado mayormente en ensayos en los que no se adicionó suero, condiciona su evaluación en condiciones fisiológicas. No obstante, son este tipo de aspectos los que han motivado a hipotetizar que la acción microbicida no es su principal función en la defensa del hospedante. En ensayos in vivo, en los que no ha habido evidencia de su efecto antimicrobiano directo, se ha reportado su acción como moléculas moduladoras de la respuesta inmune (Mansour et al., 2014; Hancock et al., 2016). Para ejercer este mecanismo, estos péptidos no requieren del contacto con las membranas de las células, lo que repercute en su inocuidad y en la presentación de resistencia por parte de los patógenos, consecuencia de su interacción con los receptores asociados al sistema inmunitario. Además, para este fin se utilizan menores concentraciones y su efecto no se ve afectado por las condiciones fisiológicas (Gupta et al., 2015; Hancock et al., 2016; Penney & Li., 2018; van Dijk et al., 2018). Esta función ha sido, principalmente, atribuida a las catelicidinas, con acción sobre los mecanismos innatos y adaptativos (Davidson et al., 2004; Gupta et al., 2015; Penney & Li, 2018). Con este fundamento, se han diseñado los reguladores de defensa innata (IDR) que han demostrado tener actividad en infecciones causadas por protozoos (Achtman et al., 2012p; Haney et al., 2013). A pesar de que no se evaluó esta función en las catelicidinas de *C. aquilus*, es probable que estas moléculas puedan tener efecto sobre la respuesta inmune en los hospedantes infectados por *Babesia* spp.

Mecanismo de acción de la Aquiluscidina

Para identificar los cambios morfológicos que se presentan en *Babesia* posterior al tratamiento con la Aquiluscidina, se obtuvieron fotografías de *B. ovata* (cepa Miyake) a diferentes tiempos y usando las concentraciones que se mencionaron en la sección de la metodología. En las imágenes se pueden apreciar el acortamiento del tamaño celular y la hipercondensación de la cromatina. Estas alteraciones, con la concentración de $4xIC_{50}$, se presentaron desde los 10 minutos. Con la dosis de IC_{50} y $2xIC_{50}$, esto fue perceptible a partir de los 30 min (Figura 14). Estos hallazgos pudieran sugerir un mecanismo de acción que conduzca al parásito a la muerte celular por apoptosis. En *B. bovis* (cepa Texas), se observaron cambios similares después de la aplicación de $50 \mu M$ de Aquiluscidina en menos de 30 minutos (Figura 15).

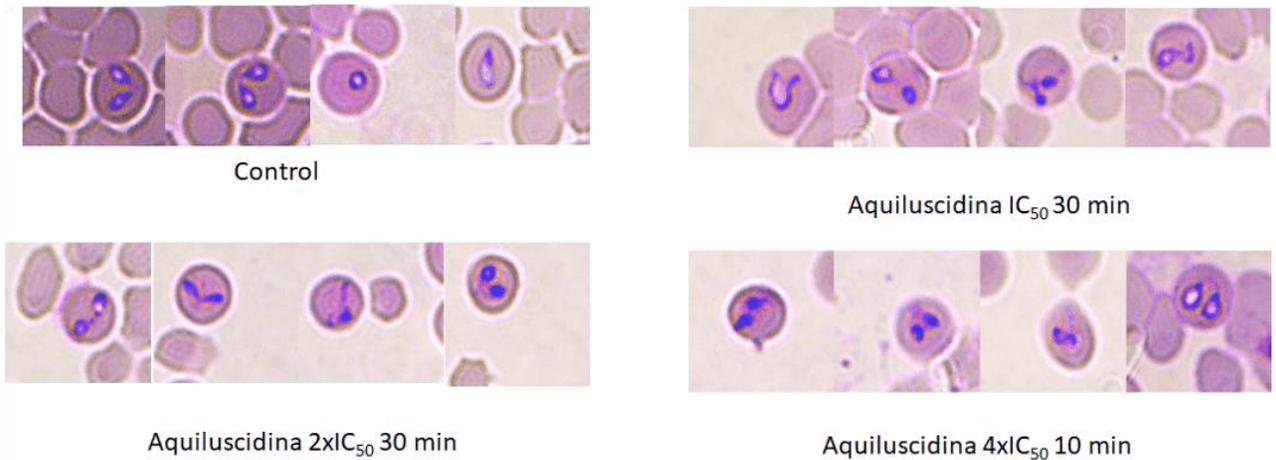


Figura 14. Morfología de *B. ovata* observada después del tratamiento con IC_{50} , $2xIC_{50}$ y $4xIC_{50}$ de Aquiluscidina a los tiempos en los que se notó la actividad de los péptidos sobre el parásito. Además del encogimiento de las estructuras correspondientes a los merozoitos en comparación con el control sin tratamiento, se evidencia una mayor condensación de la cromatina en las células afectadas por la Aquiluscidina. Tinción Giemsa. 100X. [Fotografía].

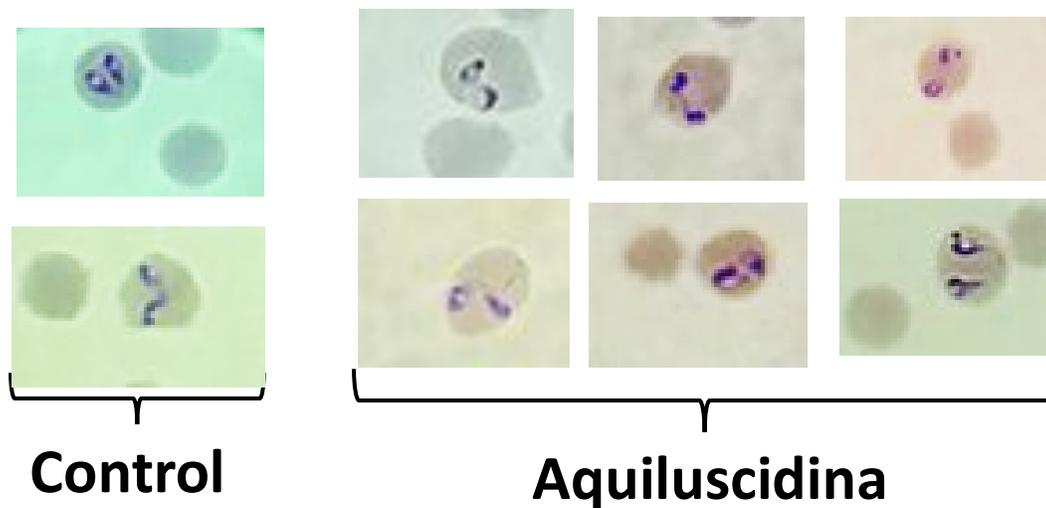


Figura 15. Morfología de *B. bovis* observada ~28 minutos después del tratamiento con 50 μM de Aquiluscidina. Se destaca un encogimiento de las estructuras correspondientes a los merozoitos en comparación con el control sin tratamiento. Tinción Giemsa. 100X. [Fotografía].

En el trabajo publicado por Vandana *et al.*, (2020), se evaluaron 5 derivados del compuesto Z-FA-FMK, un inhibidor de la metacaspasa-2 de *P. falciparum* (denominada PfMCA-2); de manera más importante, el designado como SS-5, provocó distorsiones morfológicas posterior a 36 h de exposición con el parásito, incluso con la concentración de 1.5 μM . Finalmente, se determinó que el efecto antipalúdico de esta molécula es mediante la inducción de apoptosis al microorganismo. Algunas de las imágenes obtenidas durante nuestro experimento coinciden al realizar la comparación visual con las obtenidas por Vandana *et al.* (2020). En otras investigaciones, péptidos con conformación α -helicodiales, como la Mellitina han inducido distintos tipos de muerte celular en *T. cruzi*. Este compuesto provocó autofagia en epimastigotes y apoptosis en tripomastigotes. En ambos casos, el tratamiento con el péptido provocó alteraciones morfológicas como la formación de vesículas membranales y aumento de tamaño de la mitocondria. En el caso de los tripomastigotes, también presentaron fragmentación del ADN tanto nuclear como mitocondrial, lo que se relacionó con una muerte celular tipo apoptosis. Para los epimastigotes, se identificó la formación de autofagosomas, concluyendo con muerte por autofagia. Lo que demuestra que la vía de muerte provocada por un mismo péptido puede culminar en la presentación de alteraciones morfológicas que varían dependiendo la etapa de desarrollo de un mismo tipo de protozoo (Adade *et al.*, 2013).

La catelicidina equina, eCATH1, provocó cambios en la morfología de *T. b. brucei* y *T. equiperdum* después de 15 minutos de tratamiento (2x IC₅₀). Los tipomastigotes de estas especies modificaron su forma ahusada característica y se mostraron redondos y con aspecto hinchado. Este efecto se hizo más evidente conforme incrementó el tiempo de exposición al péptido, puesto que, transcurrida 1 h, se apreció una separación del flagelo del resto de la estructura celular. Adicionalmente, pudo observarse formación de ampollas en la membrana celular y en organelos, así como vacuolización citoplasmática. Algunos de estos cambios requirieron, únicamente, 5 minutos de exposición a eCATH1 (Cauchard *et al.*, 2016).

Al observar estos resultados, se procedió con la estrategia experimental que permitiera atribuir la eliminación de los parásitos a un tipo de muerte celular específico. Para ello, se realizó una búsqueda BLAST en el servidor de Piroplasma DB para encontrar proteínas implicadas en el proceso de apoptosis que estuvieran reportadas para *Babesia* spp. Se encontró la siguiente secuencia:

Caspase domain family protein [*Babesia bovis* T2Bo]

NCBI Reference Sequence: XP_001609635.1

>XP_001609635.1 Caspase domain family protein [*Babesia bovis* T2Bo]

MQGFGEENPPGSNSFGNGDQSVQVVKTTKFNVANLADYLSSMSGPNCRVV
VQQVEQGSEMAKQLDRALADMQQRKSSAGSDGIPVSQGVIPQHMLPVNSPVAPV
QLSTQEESAVPQATQDRRVSRHEFTGAVTTSMVQSSCETFTSSNVHCGQPGEKHR
VSSLLMQLKRVNITPCSSLDERGSDHVQHSTVDTYASLNENNLRLFQKDMGKSDIQ
ESCTLSNGSQECNLKVETAASVIPQETPHVDRHPEPTFGDIGSTHANSASSFDEHVQ
FTPKSNFVESSVSQQLPPEIYMDNHGESRMVRRFATKGPSDPSPANKSPCGTAAMG
PSLNTTTPSSQCPTRTVLTTPKSGPRRKAVVVGCSYSGDSKASLRGPCNDAILFATAL
ITHMGFEADDILLVDTPEASVYIQQLVYLASAQTPINAPARNGNRQKTGVIGGM
IGGLIGDFLSRIPDVELDIPMLMLDSPGNPVAENLPTRANILKALRWMVNGLRP
GDSAVFYFSGHAVQIDDMGWEGEGYDEALVPCDYMEHGDPSRGLIPAQQIRQLV
QSVGRSSQVTVVLDTVGMQTALDPAGRSGPWRYIKGAMLRGMWPLADATGKMQ
RAVYDPEVWTNGNMQQQLVLPKFLPAMQVDCTSALIDGFISNTEDKSSNSICIAA
APFDDVAVEAMFRPMSLTDRPIMRITTQGEQVVCHGVFTYCLVATLTRDRTSKR

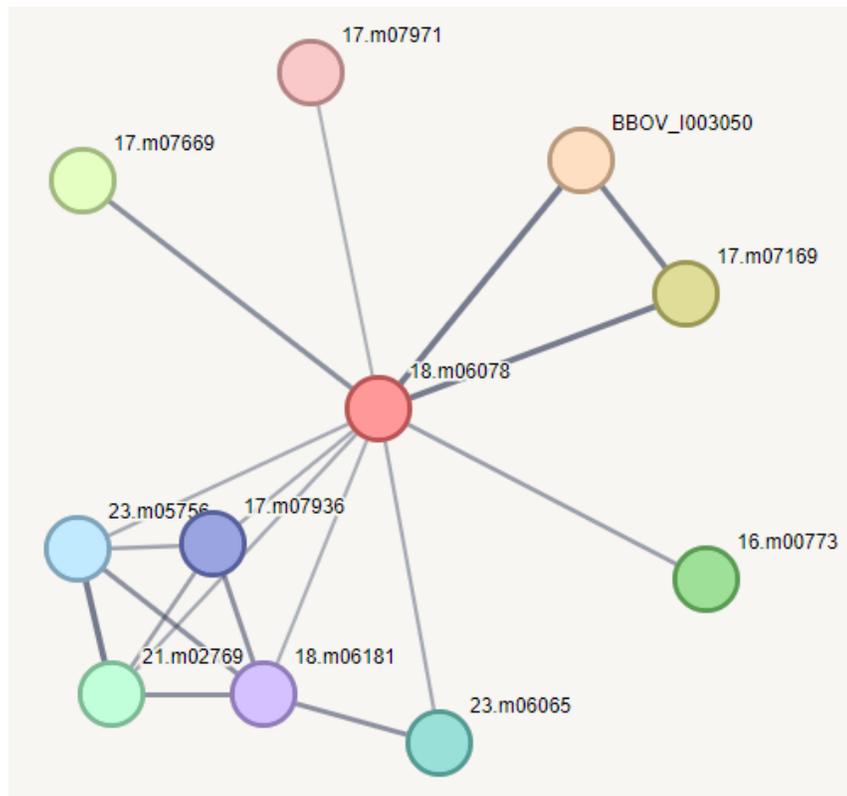
GGITVRELVAGIQRCQYLRGTRMPKLRQMCEATIHPAGLASLDNFFVSPWGGRL
LPERARRPGVENSYKSLSAGLGAFLLTVNEAWMQLHTEGRMRAAEQREKFGRMRS
AVVNGSRMVTADLRQMMASQGYVSRRPSAAIMIGQVPSRQRSAAGKSWCGQPQ
YPHQYMAQDFNMPHHA VYSMSPMVMNPSGQYHPMGQDYVVDQHGMMYPSH
HVAQPMQREYYVAEPTAQFCGYPPQFVPGTFAQHVQHVQPPRQQQTCRSNTAAL
FKGSNHQPQHVGRTRTSACRPMGMKFAEPITSAMISQLPVHPGYN

Esta secuencia muestra una proteína con un dominio de cisteín-aspartato-proteasa (Caspasa), moléculas cuya activación está involucrada en la ejecución de la apoptosis como vía de muerte celular (Elmore, 2007). Para corroborar que la actividad de esta proteína se relacionara con este fenómeno, se evaluó en el servidor de String para generar el interactoma predicho y analizar si hay participación de elementos que puedan sugerir la ocurrencia de apoptosis en este modelo. En este interactoma, se encontraron algunos elementos que se ven implicados en procesos como la regulación de la fase de ejecución de la apoptosis, la regulación de la muerte celular y la regulación positiva de la muerte celular (Figuras 16a y 16b).

Por ontología génica se enriquecieron las proteínas relacionadas con este proceso celular. Se encontraron varias proteínas que estarían relacionadas con la fase de ejecución de la apoptosis, su regulación e, inclusive, la inhibición de la muerte celular programada (Figura 16c). Esto mostraría que existen elementos para proponer que la muerte por apoptosis en *Babesia* es viable y podría ser evaluada como resultado a la exposición a la Aquiluscidina.

En otros tipos de protozoos, como *L. donovani*, se ha demostrado que los promastigotes experimentan un tipo de muerte celular, similar a la apoptosis. En este proceso, se ha identificado la participación de proteínas con actividad de caspasa, posterior a la exposición de los parásitos a un inductor de apoptosis (Das *et al.*, 2001). En otros ensayos, también se reportó la presencia de proteasas con actividad de caspasa 3 y 7 en líneas de *L. major* que fueron tratadas con pexiganan; un péptido en conformación de hélice α , derivado de la magainina 2 (*Xenopus laevis*). Consecuentemente, se puede presentar una muerte tipo apoptosis como resultado de la acción de un péptido antimicrobiano (Kulkarni *et al.*, 2006).

a)



Predicted Functional Partners:

	BBOV_I003050	Hypothetical protein; Belongs to the BI1 family
	17.m07169	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain containing protein; Encoded by transcript BBOV_III001680A; pred...
	17.m07669	Calpain family cysteine protease domain containing protein; Belongs to the peptidase C2 family
	16.m00773	Phosphotransferase; Encoded by transcript BBOV_I000860A; predicted by jigsaw SP:Q02155: Hexokinase (EC 2.7.1.1). {...
	21.m02769	Transitional endoplasmic reticulum atpase; Belongs to the AAA ATPase family
	23.m06065	Uncharacterized protein; Encoded by transcript BBOV_IV007770A; predicted by jigsaw
	23.m05756	Transitional endoplasmic reticulum atpase; Cell division control protein 48, putative; Encoded by transcript BBOV_IV008...
	17.m07936	ATPase, AAA family protein; Encoded by transcript BBOV_III010880A; predicted by jigsaw
	18.m06181	26S proteasome regulatory subunit N10; Uncharacterized protein; Encoded by transcript BBOV_II002240A; predicted by ...
	17.m07971	Uncharacterized protein; Encoded by transcript BBOV_III011390A; predicted by jigsaw

Your Current Organism:

Babesia bovis

NCBI taxonomy Id: [5865](#)

Other names: *B. bovis*

b)

17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010468	Regulation of gene expression
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010562	Positive regulation of phosphorus metabolic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010660	Regulation of muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010661	Positive regulation of muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010662	Regulation of striated muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010663	Positive regulation of striated muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010665	Regulation of cardiac muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010666	Positive regulation of cardiac muscle cell apoptotic process
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010830	Regulation of myotube differentiation
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010831	Positive regulation of myotube differentiation
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010941	Regulation of cell death
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0010942	Positive regulation of cell death
17.m07669	5865.XP_001611895.1	GO Process	GO:0014902	Myotube differentiation
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:0097190	Apoptotic signaling pathway
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:0097193	Intrinsic apoptotic signaling pathway
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:0097305	Response to alcohol
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:0097306	Cellular response to alcohol
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:0110096	Cellular response to aldehyde
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1900117	Regulation of execution phase of apoptosis
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901214	Regulation of neuron death
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901216	Positive regulation of neuron death
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901654	Response to ketone
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901655	Cellular response to ketone
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901698	Response to nitrogen compound
17.m07169	5865.XP_001611303.1	GO Process	GO:1901699	Cellular response to nitrogen compound



Search Download Help My Data

c)

There are multiple matches for 'apoptosis' filtered for genesets found in '*Babesia bovis*'. Please select one from the list below and press Continue to proceed.

Genesets:

- Curated ontologies
- From publications
- GO Process
- Pfam
- InterPro

Term	Category	Proteins	Description
<input checked="" type="checkbox"/> GO:0097194	GO Process	4	Execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> GO:1900117	GO Process	4	Regulation of execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> GO:1900119	GO Process	3	Positive regulation of execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> GO:0006921	GO Process	2	Cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> GO:2001270	GO Process	1	Regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> GO:2001272	GO Process	1	Positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis
<input type="checkbox"/> PF01027	Pfam	2	Inhibitor of apoptosis -promoting Bax1
<input type="checkbox"/> IPR007918	InterPro	1	Mitochondrial distribution/morphology family 35/ apoptosis
<input type="checkbox"/> PF05093	Pfam	1	Cytokine-induced anti- apoptosis inhibitor 1, Fe-S biogenesis

Figura 16. Resultado de la evaluación de la proteína con dominio de caspasa de *B. bovis* (*T2Bo*) en el servidor de String. a) Interactoma predicho, se muestran como círculos de varios colores los nodos participantes en la interacción. b) Procesos biológicos en los que se ven implicados los interactores predichos. c) Relación de elementos presentes en los conjuntos génicos de *B. bovis* (*T2Bo*) después de la búsqueda con el proceso biológico de "apoptosis", se observa el número de proteínas cuya descripción podría relacionarse con este tipo de muerte celular.

Detección de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y evaluación de la integridad del ADN

Se utilizó peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) como estimulante de producción de especies reactivas de oxígeno y para inducir la muerte celular por apoptosis, como se ha hecho con

distintos modelos celulares (Singh et al., 2007) , incluidos protozoos (Das *et al.*, 2001). En los primeros ensayos, que incluían la medición de las especies reactivas de Oxígeno (ROS, por su acrónimo en inglés), como control del funcionamiento del sistema, se utilizaron fibroblastos, divididos en dos grupos: control (sin tratamiento) y a los que se les aplicaron 100 μM de de peróxido de Hidrógeno. Después de 1.5 h, se visualizaron las células en el microscopio. La tinción con DAPI permite observar los núcleos de las células, en ambos grupos (Figuras 17a y 18a). En el caso de los fibroblastos que no se expusieron al peróxido, se aprecia que no hay generación importante de ROS (Figura 17b). Contrariamente, en las células que se trataron con H_2O_2 , hay una señal (observada como color verde) que indica la generación de ROS y su acumulación, principalmente, en el núcleo de las células (Figura 18b). Posterior al análisis semicuantitativo con los programas ImageJ y GraphPad Prism 9, se evidencia una diferencia estadística significativa ($p < 0.0001$) en cuanto a la estimación de la intensidad media de fluorescencia (Figura 19).

Una vez confirmada la funcionalidad de esta estrategia experimental, se procedió a trabajar con el cultivo *in vitro* de *B. bigemina* (aislado de Michoacán). En un primer experimento, utilizando, nuevamente, 100 μM de H_2O_2 como control para la generación de especies reactivas de Oxígeno, se incubaron los eritrocitos infectados con 20 μM de Aquiluscidina (concentración que, previamente, ya había demostrado ser efectiva contra esta especie). Células parasitadas a las que únicamente se les añadió agua al medio, al mismo volumen que el correspondiente al tratamiento con la Aquiluscidina, fungieron como control negativo. Como se aprecia en la Figura 20b, después de 4 h, la señal detectada en los parásitos a los que se les colocó agua no es de gran intensidad. Asimismo, en los tratamientos con el peróxido de Hidrógeno y la Aquiluscidina se observa fluorescencia color verde en su correspondiente imagen (Figuras 21b y 22b). En la comparativa de la intensidad media de fluorescencia, se hace notoria la diferencia de ambos tratamientos con el control negativo; esta semejanza tuvo significancia estadística en todas las comparaciones (Figura 23).

Por último, se llevó a cabo el mismo protocolo; sin embargo, se realizó la lectura a las 24 h. Además, las concentraciones de Aquiluscidina evaluadas fueron los valores de IC_{50} obtenidos para *B. bovis* (cepa Texas) y *B. ovata* (cepa Miyake), 20.70 y 14.48 μM , respectivamente. En la Figura 24 , se evidencian las imágenes obtenidas para el control

negativo (H₂O). Una producción de ROS, fácilmente detectable, posterior a la aplicación de 14.48 µM de Aquiluscidina, quedó de manifiesto en la Figura 25. A su vez, el tratamiento con 20.70 µM de este péptido también produjo una señal de fluorescencia, indicativa de la presencia de ROS (Figura 26); aunque, fue en menor medida. Finalmente, la Figura 27 muestra la diferencia estadística de la intensidad media de fluorescencia calculada con cada uno de los componentes utilizados; constatando que existe una considerable producción de especies reactivas de Oxígeno después de la exposición a la catelicidina.

La elevación en la producción de ROS se relaciona con ciertos tipos de muerte celular; en determinadas ocasiones, se ha descrito su rol en la activación y ejecución de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021). Frecuentemente, al acrecentarse los niveles mitocondriales de ROS, se activa la vía intrínseca de este tipo de muerte celular programada. Esto puede suceder como consecuencia de fallas en el proceso de la fosforilación oxidativa o en los mecanismos con funciones antioxidantes (Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021).

En un modelo un tanto distinto, como *C. albicans*, se reportó que el tratamiento con el péptido Papiliocin (derivado de la mariposa *Papilio xuthus*) estimuló la generación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (particularmente, radical hidroxilo), lo que conllevó a la presentación de apoptosis; incluyendo algunos de los eventos claves de este proceso, como fragmentación del ADN y pérdida del potencial mitocondrial (Hwang *et al.*, 2011). La batroxidina, catelicidina encontrada en la glándula de veneno de *B. atrox*, indujo el incremento en la detección de ROS en el epimastigote de *T. cruzi* posterior a 6 h de incubación. Este aumento fue más notorio al extender la exposición al péptido a 24 h. A este hallazgo se le suma el decremento en la detección del potencial transmembranal mitocondrial, con una ligera disminución a las 6 h y con mayor diferencia, con el grupo control, después de 24 h. En ambos casos, se utilizó la IC₅₀ calculada (11.3 µM). No obstante, debido a las alteraciones en la membrana plasmática parasitaria, se identificó la necrosis como vía de muerte celular (Mello *et al.*, 2017). De manera similar, la crotalicidina (de *C. durissus*) tuvo efecto sobre el nivel de ROS detectadas en los epimastigotes de *T. cruzi*, con un notable incremento a las 24 h; a su vez, el potencial mitocondrial decayó como consecuencia del tratamiento con el péptido. En este estudio, también se determinó la

necrosis como resultado final de la interacción del péptido con el parásito (Bandeira *et al.*, 2018). En esquizontes y gametocitos de *P. falciparum* se describió un aumento en la generación de ROS después del tratamiento con SS-5. Este acrecentamiento fue detectable a las 2 h, pero fue aún más intenso después de 24 h. Al conjuntarse con otros resultados, se identificó que el parásito se sometía a muerte por apoptosis (Vandana *et al.*, 2020).

A pesar de ser uno de los eventos que puede conducir a la presentación de apoptosis, el incremento en los niveles de ROS también es un hallazgo en otros tipos de muerte celular, como la necroptosis. Inclusive, se propone que, debido a la participación de este tipo de componentes en estos distintos procesos de muerte, es probable que tengan un papel importante en el entrecruzamiento de estas vías (Villalpando-Rodriguez & Gibson, 2021).

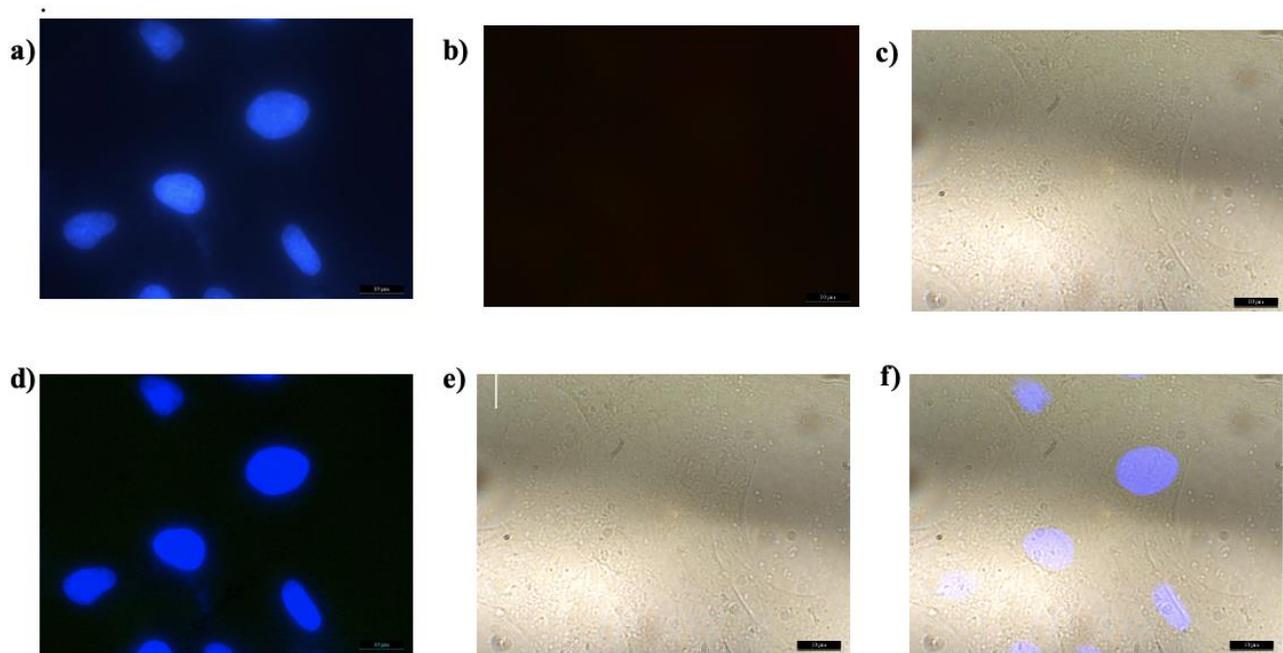


Figura 17. Control de fibroblastos sin tratamiento incubados durante 1.5 h a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

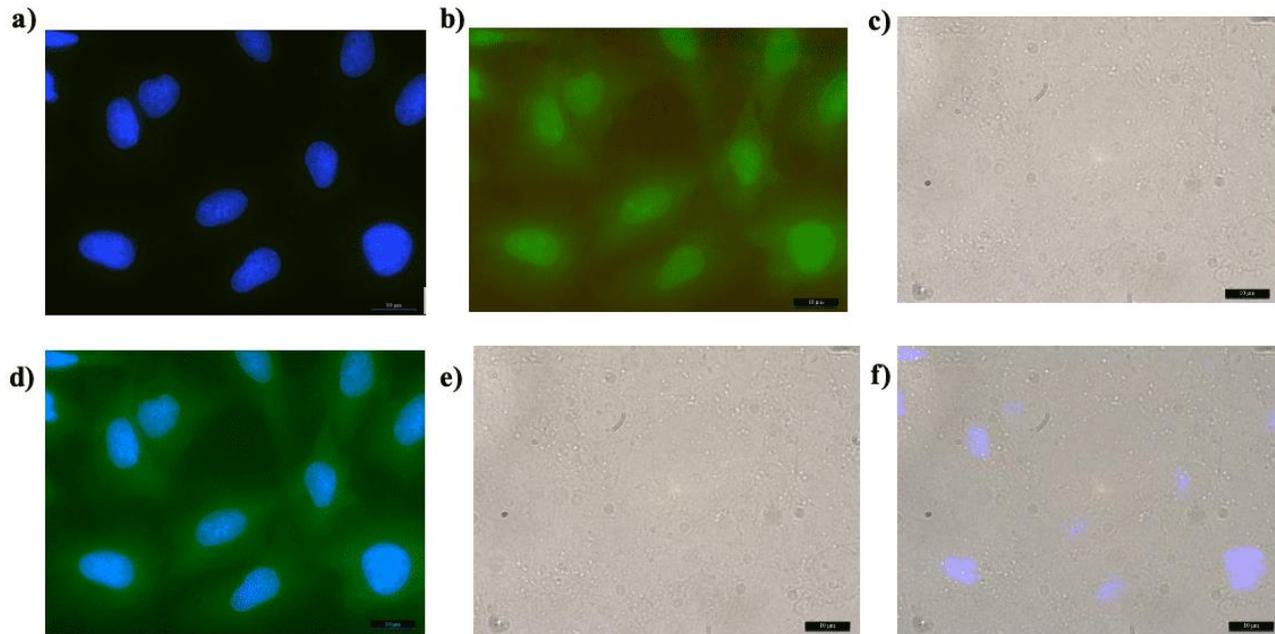


Figura 18. Tratamiento de fibroblastos con 100 μM de H_2O_2 durante 1.5 h a 37 $^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

Detección de ROS en fibroblastos 1.5 h

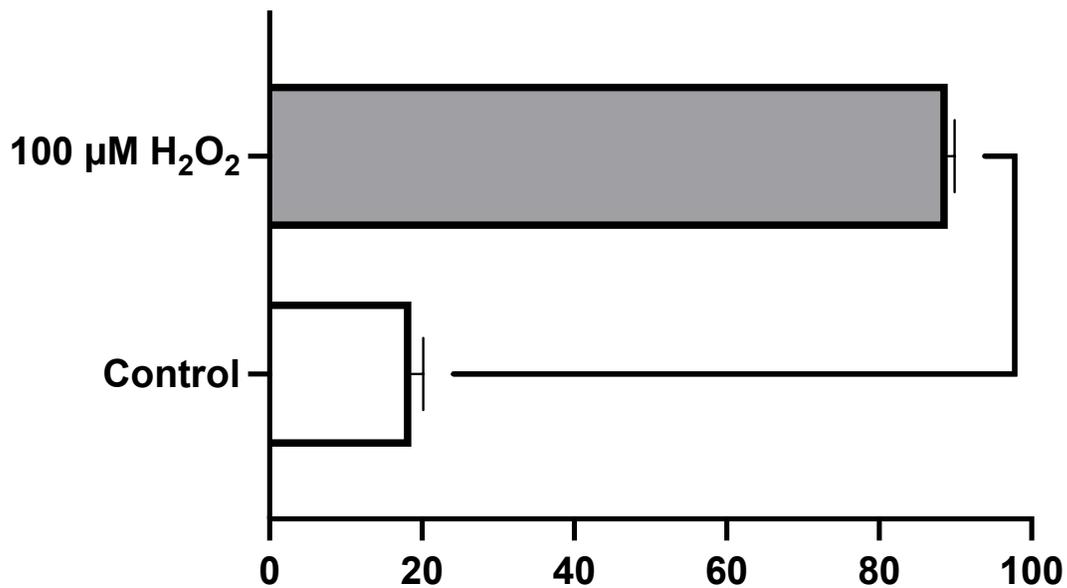


Figura 19. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a fibroblastos después de 1.5 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico (prueba de t). ****, $p < 0.0001$.

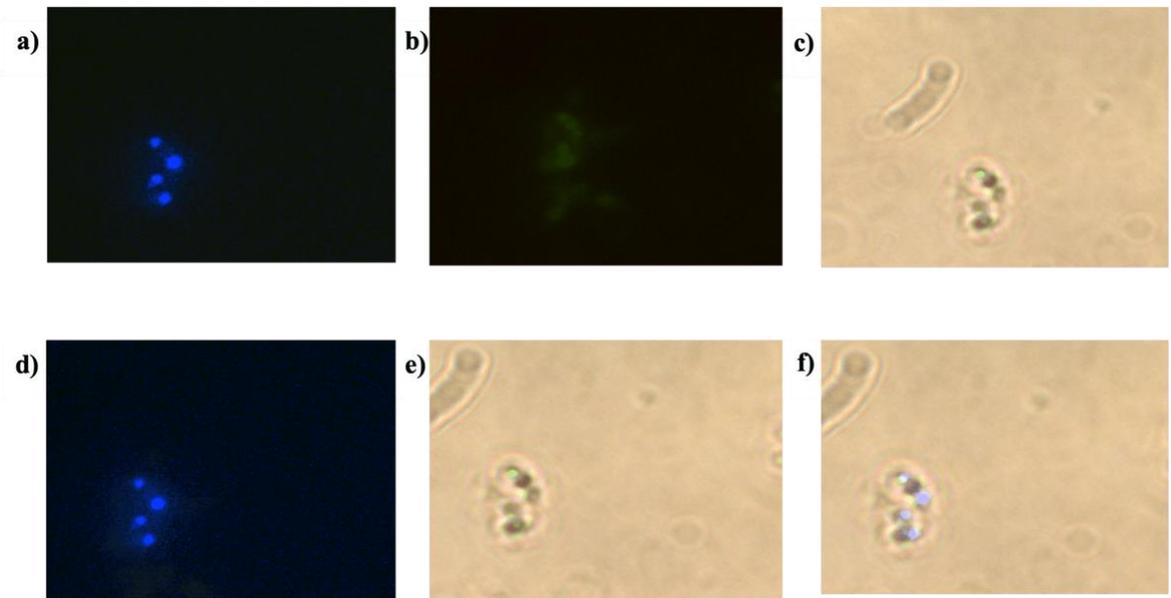


Figura 20. Control de *B. bigemina* sin tratamiento incubados durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

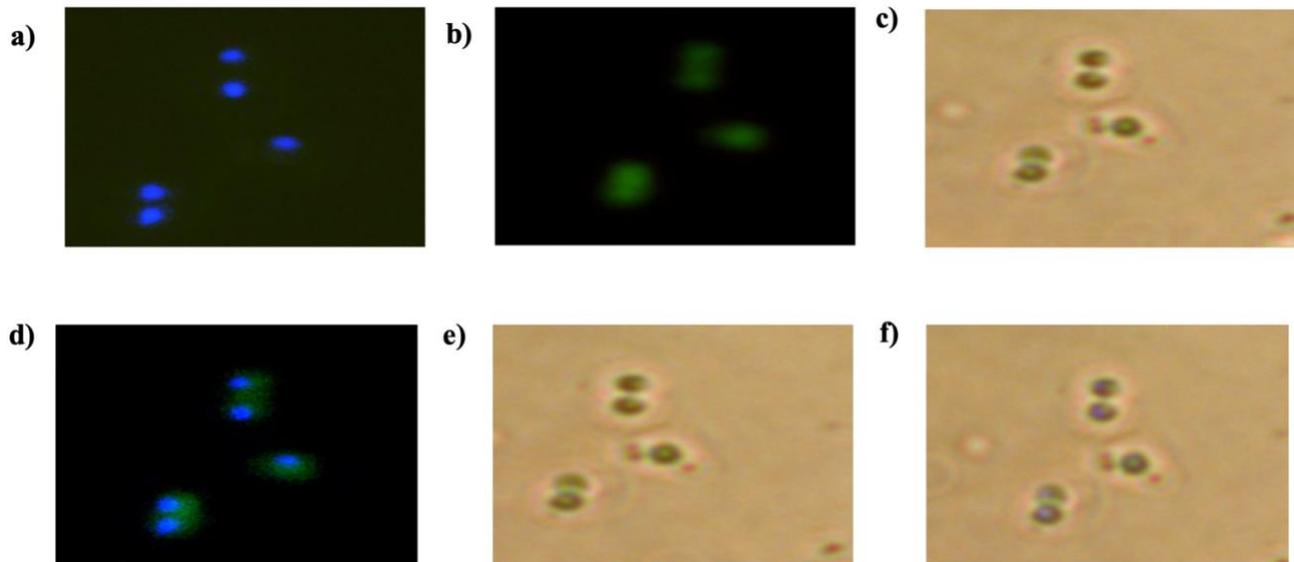


Figura 21. Tratamiento de *B. bigemina* con 100 μM de H₂O₂ durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

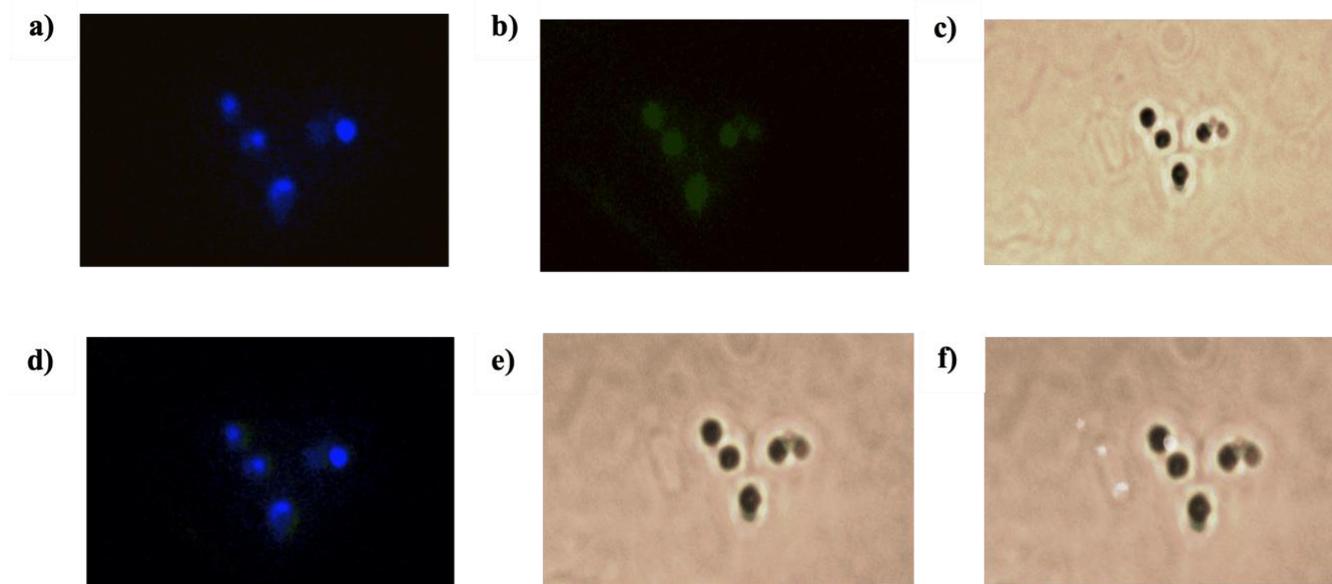


Figura 22. Tratamiento de *B. bigemina* con 20 μM de Aquiluscidina durante 4 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

Detección de ROS en *B. bigemina* a las 4 h

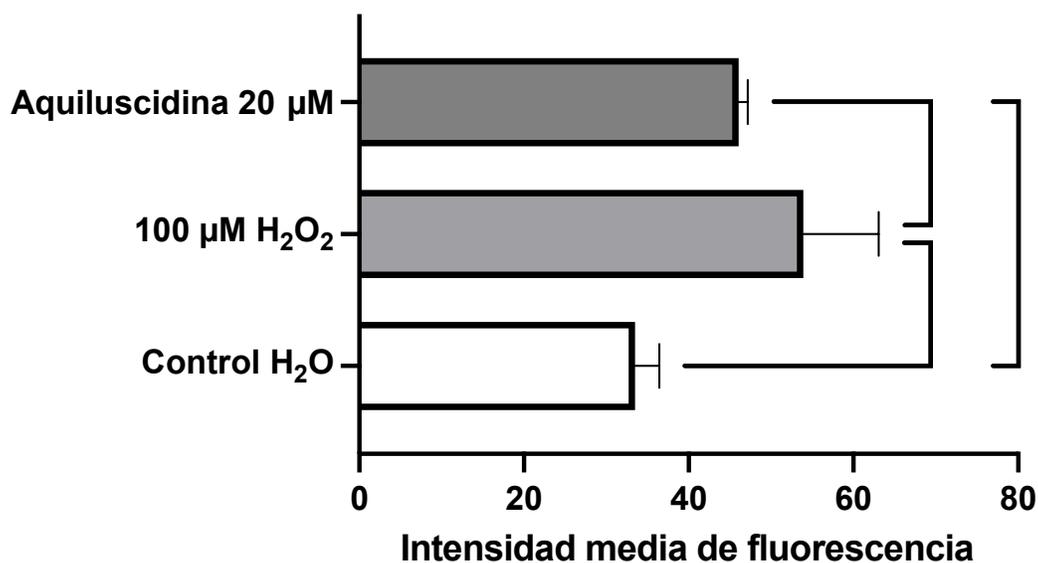


Figura 23. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a *B. bigemina* después de 4 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico ANOVA con prueba de Tukey. ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

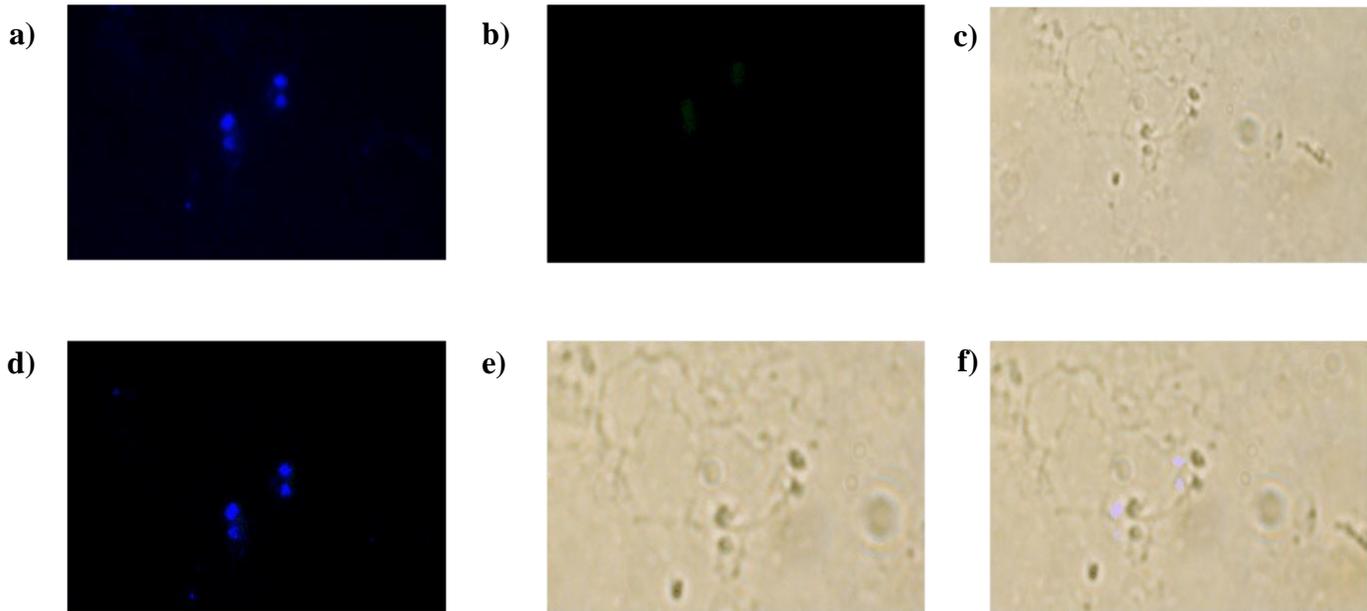


Figura 24. Control de *B. bigemina* sin tratamiento incubados durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) resultado de la incubación con Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

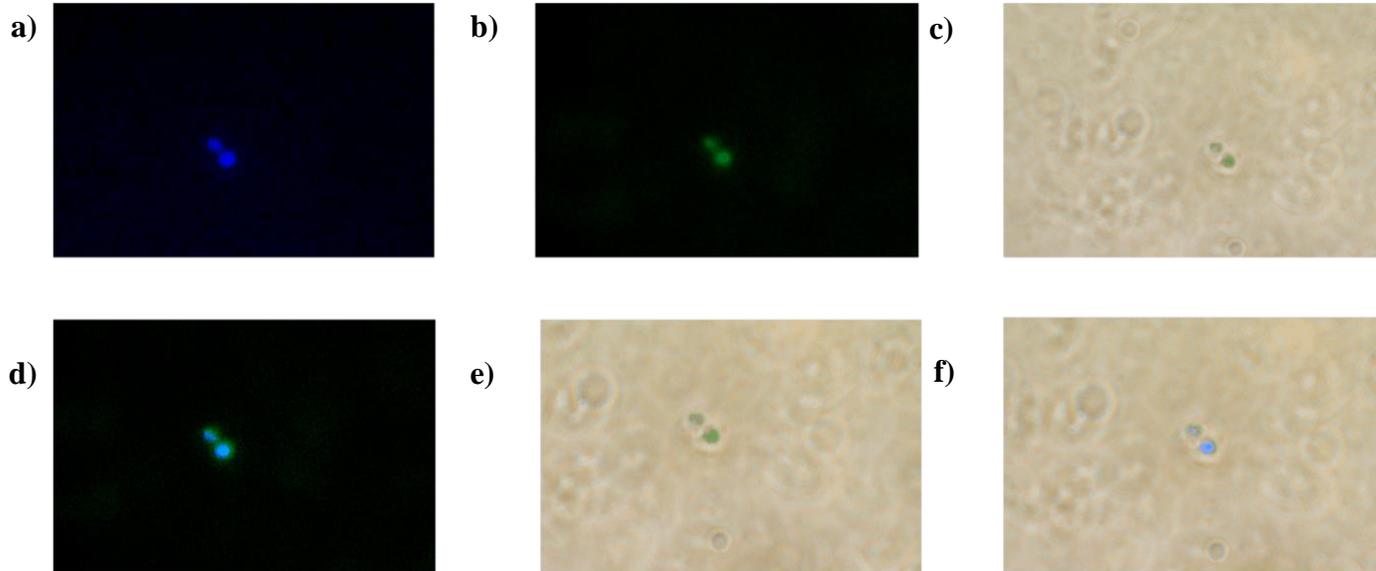


Figura 25. Tratamiento de *B. bigemina* con 14.48 μ M de Aquiluscidina durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

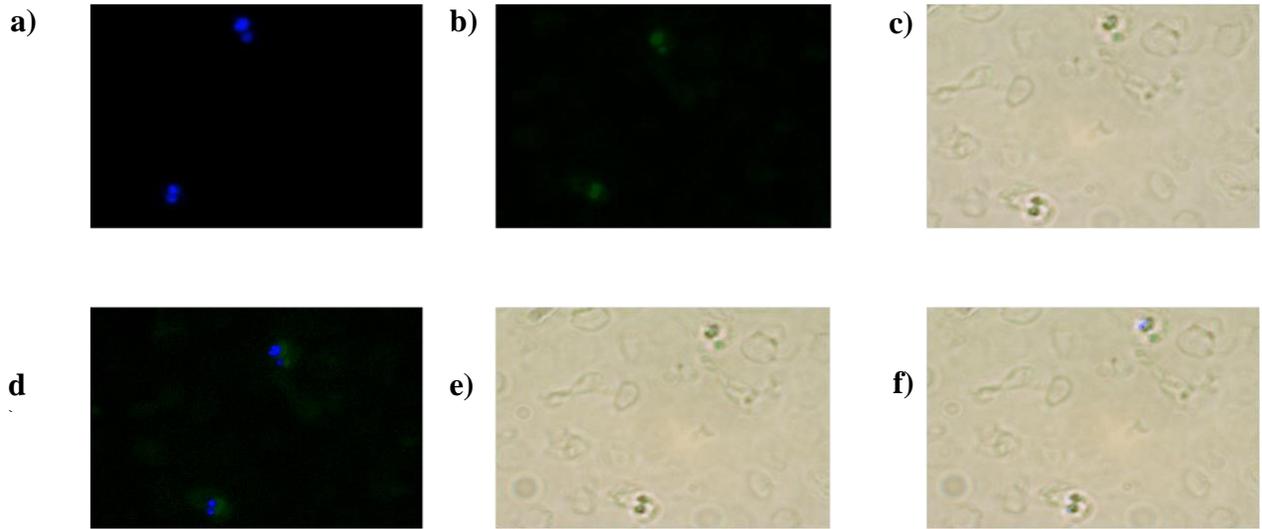


Figura 26. Tratamiento de *B. bigemina* con 20.70 μM de Aquiluscidina durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 . Las células se incubaron con Cell Rox y DAPI. Se observa en la parte superior a) el resultado de la incubación con DAPI, b) células que fluorescen por la presencia de especies reactivas de oxígeno detectadas con la sonda Cell Rox y c) el campo claro. Fila inferior, la unión de los canales mostrados anteriormente, d) DAPI + Cell Rox, e) campo claro + Cell Rox y f) DAPI + campo claro + Cell Rox.

Detección de ROS en *B. bigemina* a las 24 h

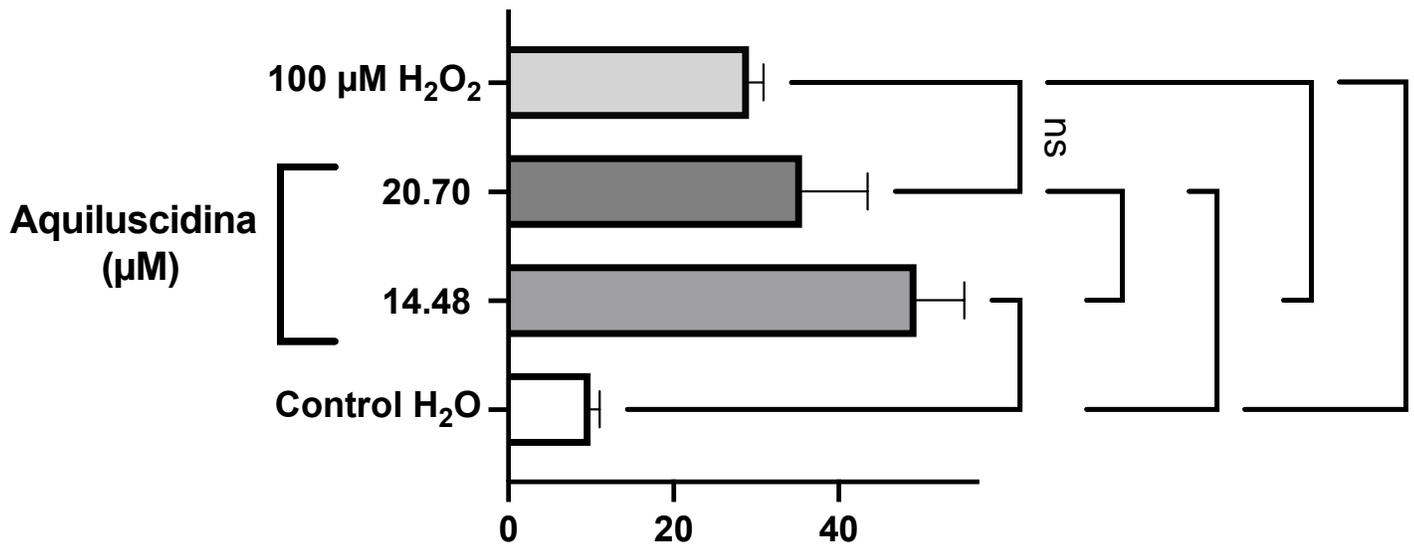


Figura 27. Resultado de la detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al analizar las fotografías de los tratamientos aplicados a *B. bigemina* después de 24 h. Se muestra la intensidad media de fluorescencia calculada con el software ImageJ y el análisis estadístico ANOVA con prueba de Tukey. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Por último, para evaluar la integridad del ADN, se utilizó un inductor de apoptosis (H_2O_2) que se ha probado en otros modelos celulares y que, a la concentración usada, induce muerte celular programada detectable en menos de 8 h. El ensayo con *B. bovis* fue llevado a cabo utilizando una concentración de 50 μM de Aquiluscidina, 1.6 mM de H_2O_2 y los controles de medio de cultivo con y sin adición de suero. Se sembraron en placa de 96 pozos, por triplicado y se incubaron durante 7 h a 37 °C y 5% de CO_2 . Sin embargo, al momento de revisar la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%, no se observó fragmentación atribuible a la aplicación de los tratamientos durante el tiempo del ensayo (Figura 28).

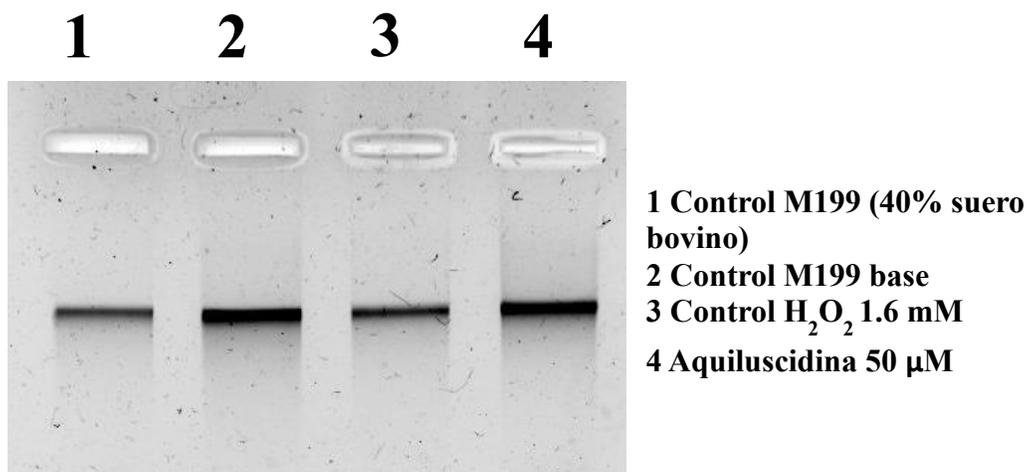


Figura 28. Gel de agarosa para evaluación de la integridad del ADN posterior a la incubación con el peróxido de Hidrógeno (inductor de apoptosis) y 50 μM de Aquiluscidina durante 7 h.

En un abordaje similar al realizado en este protocolo experimental, Das *et al.*, (2001), incubaron promastigotes de *L. donovani* con 4 mM de H_2O_2 durante 2, 4 y 6 h. Al analizar la integridad en un gel de agarosa, se hizo evidente la degradación en cada uno de los tiempos evaluados; sin embargo, esto fue más perceptible a las 6 h. Contrariamente, nuestro ensayo no permitió identificar el patrón de barrido que demostrara la degradación del material genético. Esto puede atribuirse a varias razones, la primera, la concentración de H_2O_2 que utilizamos fue mucho menor, lo cual parece repercutir de forma importante. Sin embargo, también se destaca que las consecuencias detectables, después de la exposición a un compuesto específico, en distintos modelos celulares presentan variables en diversos

aspectos. Por ejemplo, se ha descrito que la concentración de peróxido de Hidrógeno requerida para la inducción de apoptosis difiere entre cada modelo celular. Y, en ciertas condiciones, la falta o el exceso de este compuesto pueden conducir a la presentación de otras vías de muerte (Xiang *et al.*, 2016). A esto hay que sumar que los péptidos tienen efectos diversos dependiendo las características del microorganismo en cuestión, provocando muerte celular por mecanismos diferentes en las distintas etapas de una misma especie de protozoo (Adade *et al.*, 2013). Además, el tiempo que requiere cada línea celular para comenzar el proceso, mostrar las características representativas de la apoptosis y finalizar este evento, se debe estandarizar en cada ensayo para poblaciones celulares en específico (Sundquist *et al.*, 2006). Probablemente, con la cantidad de H₂O₂ utilizada en este ensayo, la fragmentación del ADN sería un hallazgo que se encontraría transcurrido mayor cantidad de tiempo.

Para finalizar, teniendo en cuenta estas variables y la información revisada con anterioridad, es probable que la Aquiluscidina tenga efectos diversos en cada especie de *Babesia* que resulte susceptible a su actividad. De igual forma, la concentración del péptido y las características fenotípicas de los microorganismos también influyen en el resultado final. En último término, existen eventos que se asocian a más de un tipo de muerte celular, lo que puede llevar a asumir la presentación de alguno en particular sin considerar todas las posibilidades. Es por esto por lo que se sugiere un enfoque más completo que permita generar los datos necesarios para afirmar la existencia de un proceso de manera más contundente (Vanden Berghe *et al.*, 2013). En relación con lo antes expuesto, es probable que la Aquiluscidina esté interactuando con los patógenos y alterando varias de sus estructuras, ocasionando diversos eventos que conlleven a la eliminación de los microorganismos mediante más de un mecanismo. Es crucial indagar con mayor profundidad en su actividad, en conjunto con su función inmunomoduladora, para comprender su potencial antibabesia y la aplicabilidad en el futuro.

VII. CONCLUSIONES

* La Aquiluscidina tiene actividad antimicrobiana *in vitro* contra *B. bovis* y *B. ovata* con una IC₅₀ de 14.48 y 20.70 µM, respectivamente y el efecto sobre los parásitos es observable en cuestión de minutos.

*La acción microbicida de la Aquiluscidina sobre *Babesia bigemina* involucra un incremento en la generación de especies reactivas de Oxígeno, el cual detectable a las 4 y 24 h posteriores a la exposición al péptido y esto estaría relacionado con la subsecuente muerte celular del parásito.

* El Vcn-23 no presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Babesia* spp.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AbouLaila, M., Menshawy, S., Shaaban, S., Sorour, S., Ishiyama, A., Iwatsuki, M., Otaguro, K., Ōmura, S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2020). Evaluation of the *in vitro* inhibitory effects of prumycin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Egyptian Veterinary Medical Society of Parasitology Journal (EVMSPJ)*, 16(1), 131–141. <https://doi.org/10.21608/evmspj.2020.128688>

AbouLaila, M., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Ueno, A., Nakano, Y., Yokoyama, M., Yoshinari, T., Nagano, D., Katayama, K., El-Bahy, N., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2012). Apicoplast-targeting antibacterials inhibit the growth of *Babesia* parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3196–3206. <https://doi.org/10.1128/AAC.05488-11>

AbouLaila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2010). Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology international*, 59(2), 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.02.006>

Achtman, A. H., Pilat, S., Law, C. W., Lynn, D. J., Janot, L., Mayer, M. L., Ma, S., Kindrachuk, J., Finlay, B. B., Brinkman, F. S. L., Smyth, G. K., Hancock, R. E. W., & Schofield, L. (2012). Effective adjunctive therapy by an innate defense regulatory peptide in a preclinical model of severe malaria. *Science Translational Medicine*, 4(135). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003515>

Adade, C. M., Oliveira, I. R., Pais, J. A., & Souto-Padrón, T. (2013). Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 69, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.011>

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>

Aikawa, M. (1988). Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. 64, 173–181.

Aikawa, M., Udeinya, I. J., Rabbege, J., Dayan, M., Leech, J. H., Howard, R. J., & Miller, L. H. (1985). Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *The Journal of protozoology*, 32(3), 424–429. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04038.x>

Alcalá, Y., Álvarez, J. A., Cruz, C., Escutia, I., Figueroa, J. V., Liébano, E., López, M. E., Neri, S., Ramírez, G., Rojas, C., Vega, C.A. (2015). Capítulo 13: Cultivo y mantenimiento de parásitos vivos. En: Rodríguez VRI (Ed.) **TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PARÁSITOS CON IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA Y VETERINARIA**. 1ª. Edición. AMPAVE / CONASA. México, D.F. 494 pp. Diciembre del 2015. © Impreso 03-2015-072412191500-01 (pp. 404-460; 98 Referencias del capítulo).

Almazán, C., Scimeca, R. C., Reichard, M. V., & Mosqueda, J. (2022). Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(2), 168. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020168>

Alvarez-Jarreta, J., Amos, B., Aurrecoechea, C., Bah, S., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E. Y., Belnap, R., Blevins, A., Böhme, U., Brestelli, J., Brown, S., Callan, D., Campbell, L. I., Christophides, G. K., Crouch, K., Davison, H. R., DeBarry, J. D., Demko, R., Doherty, R., ... Zheng, J. (2024). VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center in 2023. *Nucleic acids research*, 52(D1), D808–D816. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1003>

Bandeira, I. C. J., Bandeira-Lima, D., Mello, C. P., Pereira, T. P., De Menezes, R. R. P. P. B., Sampaio, T. L., Falcão, C. B., Rádis-Baptista, G., & Martins, A. M. C. (2018). Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. *Parasitology*, 145(8), 1059–1064. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001846>

Batiha, G. E., Beshbishy, A. M., Tayebwa, D. S., Shaheen, H. M., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Inhibitory effects of *Syzygium aromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(5), 949–958. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.016>

Bednarska, M., Bajer, A., Drozdowska, A., Mierzejewska, E. J., Tolkacz, K., & Welc-Fałęciak, R. (2015). Vertical transmission of *Babesia microti* in BALB/c mice: Preliminary report. *PLoS ONE*, 10(9), 11–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137731>

Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., & Vaidya, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(1), 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00300-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00300-6)

Beshbishy, A. M., Batiha, G. E., Alkazmi, L., Nadwa, E., Rashwan, E., Abdeen, A., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2020). Therapeutic Effects of Atranorin towards the Proliferation of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2), 127. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020127>

Beugnet, F., & Moreau, Y. (2015). Babesiosis. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 627–639. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>

Bork, S., Okamura, M., Matsuo, T., Kumar, S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2005). Host serum modifies the drug susceptibility of *Babesia bovis* *in vitro*. *Parasitology*, 130(5), 489–492. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006821>

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M. D. P., Black, D. S., Walsh, W. R., & Kumar, N. (2020). A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>

Buck, A. K., Elmore, D. E., & Darling, L. E. O. (2019). Using fluorescence microscopy to shed light on the mechanisms of antimicrobial peptides. *Future Medicinal Chemistry*, 11(18), 2445–2458. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0095>.

Cauchard, S., Van Reet, N., Büscher, P., Goux, D., Grötzinger, J., Leippe, M., Cattoir, V., Laugier, C., & Cauchard, J. (2016). Killing of trypanozoon parasites by the equine cathelicidin eCATH1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2610–2619. <https://doi.org/10.1128/AAC.01127-15>

Cavalcante, C. S. P., Falcão, C. B., Fontenelle, R. O. S., Andreu, D., & Rádis-Baptista, G. (2017). Anti-fungal activity of Ctn[15-34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. *Journal of Antibiotics*, 70(3), 231–237. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.135>

Cavani, L., Braz, C. U., Giglioti, R., Okino, C. H., Gulias-Gomes, C. C., Caetano, A. R., Oliveira, M. C. S., Cardoso, F. F., & de Oliveira, H. N. (2020). Genomic Study of *Babesia bovis* Infection Level and Its Association With Tick Count in Hereford and Braford Cattle. *Frontiers in immunology*, 11, 1905. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01905>

Chen, D., Copeman, D. B., Burnell, J., & Hutchinson, G. W. (2000). Helper T cell and antibody responses to infection of CBA mice with *Babesia microti*. *Parasite Immunology*, 22(2), 81–88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2000.00279.x>

Collett, M. G. (2000). Survey of canine babesiosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 180–186. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.710>

Conejo-Cruz, A. G. (2023). Análisis de la vía de internalización de un nanosistema funcionalizado con extractos fluorescentes de *Eysenhardtia polystachya* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Das, M., Mukherjee, S. B., & Shaha, C. (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of cell science*, 114(Pt 13), 2461–2469. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2461>

Dathe, M., Wieprecht, T. (1999). *Structural features of helical antimicrobial peptides : their potential to modulate activity on model membranes and biological cells*. 1462, 71–87.

Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S., Bowdish, D. M., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E., & Speert, D. P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(2), 1146–1156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1146>

De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>

El Chamy Maluf, S., Dal Mas, C., Oliveira, E. B., Melo, P. M., Carmona, A. K., Gazarini, M. L., & Hayashi, M. A. F. (2016). Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. *Peptides*, 78, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.013>

El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., Stephen Adeyemi, O., Nadwa, E., Rashwan, E., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2020). Safety and efficacy of hydroxyurea and eflornithine against most blood parasites *Babesia* and *Theileria*. *PloS one*, 15(2), e0228996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228996>

Elabbadi, N., Ancelin, M. L., & Vial, H. J. (1997). Phospholipid metabolism of serine in *Plasmodium*-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochemical Journal*, 324(2), 435–445. <https://doi.org/10.1042/bj3240435>

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Samiei, A., Abbasi, A., Shafipour, A., & Esmailnejad, N. (2018). Histopathological changes and oxidative damage in hepatic tissue of rats experimentally infected with *Babesia bigemina*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *21*(3), 517–524. <https://doi.org/10.24425/124285>

Falcao, C. B., De La Torre, B. G., Pérez-Peinado, C., Barron, A. E., Andreu, D., & Rádís-Baptista, G. (2014). Viperidins: A novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. *Amino Acids*, *46*(11), 2561–2571. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1801-4>

Falcao, C. B., Pe, C., Torre, B. G. De, & Mayol, X. (2015). *Structural Dissection of Crotalidicin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01142>

Fang, Ya-qun, Chuan-bin, S., Ning, L., Hui-min, Y. A. O., Chen-bo, L., Ren, L. A. I., & Xiu-wen, Y. A. N. (2017). In vivo antimalarial activity of synthetic hepcidin against *Plasmodium berghei* in mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *15*(3), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30032-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30032-8)

Fang, Y., He, X., Zhang, P., Shen, C., Mwangi, J., Xu, C., Mo, G., Lai, R., & Zhang, Z. (2019). In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity of LZ1, a Peptide Derived from Snake Cathelicidin. *Toxins*, *11*(7), 379. <https://doi.org/10.3390/toxins11070379>

Fang, D. C., & McCullough, J. (2016). Transfusion-Transmitted *Babesia microti*. *Transfusion Medicine Reviews*, *30*(3), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2016.04.002>

Fuentes Paredes, F. M., Mendoza-Yanavilca R., Rosales-Fernández A., Cisneros-Tarmeño, R. A. (2008). Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Galay, R. L., Maeda, H., Aung, K. M., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., Igarashi, I., ... Fujisaki, K. (2012). Anti-babesial activity of a potent peptide fragment derived from longicin of *Haemaphysalis longicornis*. *Tropical Animal Health and Production*, *44*(2), 343–348.

Gelhaus, C., Jacobs, T., Andrä, J., & Leippe, M. (2008). The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(5), 1713–1720. <https://doi.org/10.1128/AAC.01342-07>

- Giovati, L., Ciociola, T., Magliani, W., & Conti, S. (2018). Antimicrobial peptides with antiprotozoal activity: current state and future perspectives. *Future medicinal chemistry*, *10*(22), 2569–2572. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0460>
- Goddard, A., Leisewitz, A. L., Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A. T., & Schoeman, J. P. (2016). Excessive pro-inflammatory serum cytokine concentrations in virulent canine babesiosis. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150113>
- 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 in parasitology*, *26*(12), 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>
- Gupta, K., Kotian, A., Subramanian, H., Daniell, H., & Ali, H. (2015). Activation of human mast cells by retrocyclin and protegrin highlight their immunomodulatory and antimicrobial properties. *Oncotarget*, *6*(30), 28573–28587. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5611>
- Haines, L. R., Thomas, J. M., Jackson, A. M., Eyford, B. A., Razavi, M., Watson, C. N., Gowen, B., Hancock, R. E. W., & Pearson, T. W. (2009). Killing of trypanosomatid parasites by a modified bovine host defense peptide, BMAP-18. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *3*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000373>
- Hakimi, H., & Verocai, G. G. (2023). *Babesia bovis*. *Trends in parasitology*, *39*(8), 708–709. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.05.003>
- Hancock, R. E. W., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, *16*(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>
- Hernández-Arvizu, E. E. (2019). Identificación y caracterización del efecto antimicrobiano de la catelicidina de *Crotalus aquilus* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Hernández-Arvizu, E. E., Silis-Moreno, T. M., García-Arredondo, J. A., Rodríguez-Torres, A., Cervantes-Chávez, J. A., & Mosqueda, J. (2023). Aquiluscidin, a Cathelicidin from *Crotalus aquilus*, and the Vcn-23 Derivative Peptide, Have Anti-Microbial Activity against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Microorganisms*, *11*(11), 2778. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112778>
- Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford III, P. J. Krause, and D. H. Persing. (2000). Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*:451–469

Hsiao, L. L., Howard, R. J., Aikawa, M., & Taraschi, T. F. (1991). Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal*, 274 (Pt 1) (Pt 1), 121–132. <https://doi.org/10.1042/bj2740121>

Hwang, B., Hwang, J. S., Lee, J., Kim, J. K., Kim, S. R., Kim, Y., & Lee, D. G. (2011). Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochemical and biophysical research communications*, 408(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.125>

Jacobs, T., Bruhn, H., Gaworski, I., Fleischer, B., & Leippe, M. (2003). NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), 607–613. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.607-613.2003>

Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology*, (November 2018). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>

Krause, P. J., & Vannier, E. (2012). Transplacental Transmission of Human Babesiosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 20(6), 365–367. <https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e3182769089>

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

Kumari, V., Sankar, S., Prasad, K. M., Kashif, M., Kalia, I., Rai, R., Singh, A. P., & Pandey, K. C. (2020). A Nonpeptidyl Molecule Modulates Apoptosis-like Cell Death by Inhibiting *P.falciparum* Metacaspase-2. *Biochemical Journal*, 1323–1344. <https://doi.org/10.1042/bcj20200050>

Kulkarni, M. M., McMaster, W. R., Kamysz, E., Kamysz, W., Engman, D. M., & McGwire, B. S. (2006). The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Molecular microbiology*, 62(5), 1484–1497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05459.x>

Kulkarni, M. M., McMaster, W. R., Kamysz, W., & McGwire, B. S. (2009). Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15496–15504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809079200>

Lacerda AF, Pelegrini PB, De Oliveira DM, Vasconcelos EAR, Grossi-De-Sá MF. (2016). Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. *Front. Microbiol.* 7, 91.

Luque-Ortega, J. R., Hof, W., Veerman, E. C. I., Saugar, J. M., & Rivas, L. (2008). Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell- penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *The FASEB Journal*, 22(6), 1817–1828. <https://doi.org/10.1096/fj.07-096081>

Lynn, M. A., Kindrachuk, J., Marr, A. K., Jenssen, H., Panté, N., Elliott, M. R., Napper, S., Hancock, R. E., & McMaster, W. R. (2011). Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of leishmanolysin in parasite survival. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(5), e1141. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001141>

Maguire, P. A., Prudhomme, J., & Sherman, I. W. (1991). Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 102 Pt 2, 179–186. <https://doi.org/10.1017/s0031182000062466>

Mansour, S. C., Pena, O. M., & Hancock, R. E. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends in immunology*, 35(9), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.07.004>

Marr, A. K., Cen, S., Hancock, R. E., & McMaster, W. R. (2016). Identification of Synthetic and Natural Host Defense Peptides with Leishmanicidal Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 2484–2491. <https://doi.org/10.1128/AAC.02328-15>

McGwire, B. S., Olson, C. L., Tack, B. F., & Engman, D. M. (2003). Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *Journal of Infectious Diseases*, 188(1), 146–152. <https://doi.org/10.1086/375747>

Mello, C. P., Lima, D. B., Menezes, R. R. P. P. B. de, Bandeira, I. C. J., Tessarolo, L. D., Sampaio, T. L., Falcão, C. B., Rádis-Baptista, G., & Martins, A. M. C. (2017). Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon*, 130, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.031>

van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 731, 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

Miller, D. M., Swan, G. E., Lobetti, R. G., & Jacobson, L. S. (2005). The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(3), 146–150. <https://doi.org/10.4102/jsava.v76i3.416>

- Mohanram, H., & Bhattacharjya, S. (2016). Salt-resistant short antimicrobial peptides. *Biopolymers*, *106*(3), 345–356. <https://doi.org/10.1002/bip.22819>
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(5), 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Mosqueda J., Olvera-Ramirez A., Aguilar-Tipacamu G., & Canto G. J. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(10), 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>
- Munkhjargal, T., Ishizaki, T., Guswanto, A., Takemae, H., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2016). Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. *Veterinary parasitology*, *221*, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.024>
- Nascimento, F. D., Sancey, L., Pereira, A., Rome, C., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Nader, H. B., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I. L. S., Coll, J., Hayashi, M. A. F., Inserm, U., Bonniot, I. A., & Butantan, I. (2012). *The Natural Cell-Penetrating Peptide Crostamine Targets Tumor Tissue in Vivo and Triggers a Lethal Calcium-Dependent Pathway in Cultured Cells*.
- Nassar, Y., & Richter, S. (2017). Babesiosis Presenting as Acute Liver Failure. *Case Reports in Gastroenterology*, *11*(3), 769–773. <https://doi.org/10.1159/000485373>
- Nguyen, L. T., Chau, J. K., Perry, N. A., de Boer, L., Zaat, S. A., & Vogel, H. J. (2010). Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS one*, *5*(9), e12684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012684>
- Oliveira-Júnior, N. G., Freire, M. S., Almeida, J. A., Rezende, T. M. B., & Franco, O. L. (2018). Antimicrobial and proinflammatory effects of two viperidins. *Cytokine*, *111*(April), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.011>
- Okła, H., Jasik, K. P., Słodki, J., Rozwadowska, B., Słodki, A., Jurzak, M., & Pierzchała, E. (2014). Hepatic tissue changes in rats due to chronic invasion of *Babesia microti*. *Folia biologica*, *62*(4), 353–359. https://doi.org/10.3409/fb62_4.353
- Owen, J., Punt, J., Stanford, S. A., Jones, P. (2014) *Kuby. Inmunología*. México. D.F. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. De C. V.
- Pachón-Ibáñez, M. E., Smani, Y., Pachón, J., & Sánchez-Céspedes, J. (2017). Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 323–342. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux012>

Panteleev, P. V., Bolosov, I. A., Kalashnikov, A., Kokryakov, V. N., Shamova, O. V., Emelianova, A. A., Balandin, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Combined antibacterial effects of goat cathelicidins with different mechanisms of action. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02983>

Park W. H. (2016). Exogenous H₂O₂ induces growth inhibition and cell death of human pulmonary artery smooth muscle cells via glutathione depletion. *Molecular medicine reports*, 14(1), 936–942. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5307>

Penney, J., & Li, J. (2018). Protegrin 1 Enhances Innate Cellular Defense via the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Pathway. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00331>

Pérez-Peinado, C., Defaus, S., Sans-Comerma, L., Valle, J., & Andreu, D. (2019a). Decoding the human serum interactome of snake-derived antimicrobial peptide Ctn[15-34]: Toward an explanation for unusually long half-life. *Journal of Proteomics*, 204(February), 103372. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.022>

Pérez-Peinado, C., Dias, S. A., Mendonça, D. A., Castanho, M. A. R. B., Veiga, A. S., & Andreu, D. (2019b). Structural determinants conferring unusual long life in human serum to rattlesnake-derived antimicrobial peptide Ctn[15-34]. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 25(8), e3195. <https://doi.org/10.1002/psc.3195>

Pretzel, J., Mohring, F., Rahlfs, S., & Becker, K. (2015). Antiparasitic Peptides. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/10>

Protein [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] - [cited 2024 Sep 08]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

Rajakpshage, B. K., Yamasaki, M., Murakami, M., Tamura, Y., Lim, S. Y., Osuga, T., Sasaki, N., Nakamura, K., Ohta, H., & Takiguchi, M. (2012). Analysis of energy generation and glycolysis pathway in diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate in vitro. *The Japanese journal of veterinary research*, 60(2-3), 51–61.

Reuling, I. J., de Jong, G. M., Yap, X. Z., Asghar, M., Walk, J., van de Schans, L. A., Koelewijn, R., Färnert, A., de Mast, Q., van der Ven, A. J., Bousema, T., van Hellemond, J. J., van Genderen, P. J. J., & Sauerwein, R. W. (2018). Liver Injury in Uncomplicated Malaria is an Overlooked Phenomenon: An Observational Study. *EBioMedicine*, 36, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.018>

Ristic, M. (1981). Babesiosis. In: Ristic, M., McIntyre, I. (eds) *Diseases of Cattle in the Tropics*. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol 6. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-6895-1_35

Rivas-Santiago, B., & Torres-Juarez, F. (2018). Antimicrobial peptides for the treatment of pulmonary tuberculosis, allies or foes? *Current Pharmaceutical Design*, 24(10), 1138–1147. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180327162357>

Salay, L. C., Nobre, T. M., Colhone, M. C., Zaniquelli, M. E. D., Ciancaglini, P., Stabeli, R. G., Leite, J. R. S. A., & Zucolotto, V. (2011). Dermaseptin 01 as antimicrobial peptide with rich biotechnological potential: Study of peptide interaction with membranes containing *Leishmania amazonensis* lipid-rich extract and membrane models. *Journal of Peptide Science*, 17(10), 700–707. <https://doi.org/10.1002/psc.1392>

Shimamoto, Y., Sasaki, M., Ikadai, H., Ishizuka, M., Yokoyama, N., Igarashi, I., Hoshi, F., & Kitamura, H. (2012). Downregulation of hepatic cytochrome P450 3A in mice infected with *Babesia microti*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 241–245. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0036>

Singh, M., Sharma, H., & Singh, N. (2007). Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 7(6), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.07.003>

Sivakumar, T., Igarashi, I., & Yokoyama, N. (2016). *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology. *Veterinary parasitology*, 229, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.006>

Smith, T., & Kilborne, F.L. (1893). Investigations into the Nature, Causation and Prevention of Texas or Southern Cattle Fever. United States Dept. of Agriculture Bureau of Animal Industry, Bulletin No. 1, 1977–300.

Smith, R. D., James, M. A., Ristic, M., Aikawa, M., & Vega y Murguía, C. A. (1981). Bovine babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble *Babesia bovis* antigen. *Science (New York, N.Y.)*, 212(4492), 335–338. <https://doi.org/10.1126/science.7209532>

Souto-Pradrón, T. (2002). The surface charge of trypanosomatids. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 74(4), 649–675. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000400007>

Sundquist, T.; Moravec, R.; Niles, A.; O'Brien, M.; Riss, T. (2006) Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*, 16, 18–21.

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Tizard, I.R. (2009). *Inmunología Veterinaria*. Barcelona, España. Elsevier España, S. L.

Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L., & Andreu, D. (2012). Antimicrobial Peptide Action on Parasites. *Current Drug Targets*, 13(9), 1138–1147. <https://doi.org/10.2174/138945012802002393>

Torres-Juarez, F., Cardenas-Vargas, A., Montoya-Rosales, A., González-Curiel, I., Garcia-Hernandez, M. H., Enciso-Moreno, J. A., Hancock, R. E., & Rivas-Santiago, B. (2015). LL-37 immunomodulatory activity during *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Infection and immunity*, 83(12), 4495–4503. <https://doi.org/10.1128/IAI.00936-15>

Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H., Jr, & Fujisaki, K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infection and immunity*, 75(7), 3633–3640. <https://doi.org/10.1128/IAI.00256-07>

van Dijk, A., Hedegaard, C. J., Haagsman, H. P., & Heegaard, P. M. H. (2018). The potential for immunoglobulins and host defense peptides (HDPs) to reduce the use of antibiotics in animal production. *Veterinary research*, 49(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0558-2>

Vandana, Shankar, S., Prasad, K. M., Kashif, M., Kalia, I., Rai, R., Singh, A. P., & Pandey, K. C. (2020). A nonpeptidyl molecule modulates apoptosis-like cell death by inhibiting *P. falciparum* metacaspase-2. *The Biochemical journal*, 477(7), 1323–1344. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200050>

Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., & Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods (San Diego, Calif.)*, 61(2), 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.011>

Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C., & Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.008>

Vargas-Miranda, V., Ambriz-García, D., Navarro-Maldonado, M., Trejo-Córdova, A., Rodríguez-Esquível, G., González-Viera, M. (2018). Manejo de Animales del Bioterio de la UAM-I. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Iztapalapa, CDMX.

Vega, C. A., Buening, G. M., Green, T. J., & Carson, C. A. (1985a). In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *American journal of veterinary research*, 46(2), 416–420.

Vega, C. A., Buening, G. M., Rodriguez, S. D., Carson, C. A., & McLaughlin, K. (1985b). Cryopreservation of *Babesia bigemina* for in vitro cultivation. *American journal of veterinary research*, 46(2), 421–423.

Vetrivel, U., Nagarajan, H., & Thirumudi, I. (2018). Design of inhibitory peptide targeting Toxoplasma gondii RON4-human β -tubulin interactions by implementing structural bioinformatics methods. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(4), 3236–3246. <https://doi.org/10.1002/jcb.26480>

Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.048>

Villalpando-Rodriguez, G. E., & Gibson, S. B. (2021). Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 9912436. <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>

Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., Wang, A., Lin, D., & Lai, R. (2008). Snake Cathelicidin from *Bungarus fasciatus* Is a Potent Peptide Antibiotics. *PLoS ONE*, 3(9), e3217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003217>

Ward, J. F., Evans, J. W., Limoli, C. L., & Calabro-Jones, P. M. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *The British journal of cancer. Supplement*, 8, 105–112.

Wei, L., Gao, J., Zhang, S., Wu, S., Xie, Z., Ling, G., Kuang, Y. Q., Yang, Y., Yu, H., & Wang, Y. (2015). Identification and characterization of the first cathelicidin from sea snakes with potent antimicrobial and antiinflammatory activity and special mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16633–16652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642645>

Wickramasekara Rajapakshage, B. K., Yamasaki, M., Hwang, S. J., Sasaki, N., Murakami, M., Tamura, Y., Lim, S. Y., Nakamura, K., Ohta, H., & Takiguchi, M. (2012). Involvement of mitochondrial genes of Babesia gibsoni in resistance to diminazene aceturate. *The Journal of veterinary medical science*, 74(9), 1139–1148. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0056>

Wormser, G. P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klempner, M. S., Krause, P. J., Bakken, J. S., Strle, F., Stanek, G., Bockenstedt, L., Fish, D., Dumler, J. S., & Nadelman, R. B. (2006). The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(9), 1089–1134. <https://doi.org/10.1086/508667>

Xiang, J., Wan, C., Guo, R., & Guo, D. (2016). Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types?. *BioMed research international*, 2016, 7343965. <https://doi.org/10.1155/2016/7343965>

Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>

Zhang, H., Xia, X., Han, F., Jiang, Q., Rong, Y., Song, D., & Wang, Y. (2015). Cathelicidin-BF, a novel antimicrobial peptide from *Bungarus fasciatus*, attenuates disease in a dextran sulfate sodium model of colitis. *Molecular Pharmaceutics*, *12*(5), 1648–1661. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00069>