

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**  
**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

Caracterización de la proteína TCTP de *Babesia bigemina* y su expresión  
diferencial en las fases infectantes del parásito

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A:

**Mario Gahel Montiel González**

Director:

Dra. Minerva Camacho Nuez

Codirector:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

**POSGRADO**  
**EN CIENCIAS**  
**GENÓMICAS**

Ciudad de México, noviembre, 2025

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez  
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### CODIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Profesor-Investigador en la Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad Autónoma de Querétaro

### ASESORES

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez  
Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra  
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez  
Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **Agradecimientos**

Este proyecto llevó a cabo en el laboratorio 1 del Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con el apoyo de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) con número de CVU1073995.

## **Dedicatoria**

Dedico parte de este proyecto a mis padres y a mi familia por brindarme su apoyo y cariño incondicional, fundamentales para el cumplimiento de mis objetivos y para mi crecimiento personal. En especial, agradezco su constante motivación para superar mis metas y el respaldo emocional que me permitió concentrarme plenamente en mis estudios.

Agradezco profundamente a la Dra. Minerva Camacho Nuez por haber confiado en mí para llevar a cabo este valioso proyecto. Reconozco y valoro su disposición, dedicación, paciencia y los consejos brindados a lo largo del proceso. Sin sus correcciones precisas, fundamentadas en su amplia experiencia, no habría logrado concluir este trabajo. Gracias por su guía constante.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, por la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto y por su apoyo para concluir esta etapa. Le agradezco profundamente sus enseñanzas, su constante disponibilidad y sus palabras motivadoras, que fueron clave en este proceso.

También deseo agradecer a mis amigos de toda la vida, así como a aquellos que conocí durante mi paso por este posgrado, quienes estuvieron presentes a lo largo de todo este proceso. Les agradezco profundamente por brindarme su apoyo, por escucharme en cualquier momento y por ofrecerme consejos tanto personales como académicos.

Por último, agradezco y dedico esta tesis a Rosalía por “Motomami” y el estreno de Lux el día de mi titulación. Amé “Berghain”. La fuerza y energía de su arte me dieron la motivación necesaria para concluir esta tesis.

## Índice

Introducción.....	1
1.1.1 Babesiosis bovina .....	1
1.1.2 Signos en los bovinos.....	2
1.1.3 Transmisión de la babesiosis bovina.....	2
1.1.4 Distribución de la enfermedad.....	4
1.1.5 Ciclo de vida de <i>B. bigemina</i> .....	5
1.1.6 Proceso de invasión de <i>Babesia spp</i> a los eritrocitos.....	8
1.1.7.1 Métodos de control de la Babesiosis bovina .....	10
1.1.7.2 Control del vector .....	10
1.1.7.3 Control químico de la babesiosis bovina .....	13
1.1.7.4 Control inmunológico.....	14
1.1.8 Respuesta inmune en infecciones por <i>Babesia spp</i> . .....	16
1.1.8.1 Inmunidad adaptativa .....	17
1.1.9 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	18
1.1.9.1 Variación antigénica .....	19
1.1.9.2 Modulación del sistema inmune .....	20
Antecedentes particulares .....	22
1.2 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP). .....	22
1.2.3 Modificaciones Postraduccionales en TCTP .....	24
1.2.4 Estructura de general de TCTP.....	25
1.2.5 Funciones intracelulares y extracelulares de TCTP .....	27
1.2.5.1 Funciones intracelulares.....	27
1.2.5.2 Funciones extracelulares.....	28
1.2.6 TCTP en parásitos intracelulares .....	29
1.2.6.1 TCTP en <i>T. brucei</i> .....	29
1.2.6.2 TCTP en <i>T. gondii</i> .....	31
1.2.6.3 TCTP en <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	31
1.2.6.4 TCTP en <i>P. falciparum</i> . .....	32
1.2.6.5 TCTP en <i>B. bovis</i> .....	33
1.2.6.6 TCTP en <i>B. bigemina</i> .....	35

Justificación:.....	36
Hipótesis.....	37
Objetivo general .....	38
Objetivos particulares:.....	38
Estrategia experimental General.....	39
2. Materiales y Métodos .....	40
2.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína <i>BbTCTP</i> .....	40
2.2 Obtención de merozoitos <i>in vivo</i> y esporozoitos .....	41
2.3 Obtención de merozoitos <i>in vitro</i> .....	41
2.4. Extracción de ARN y obtención de cADN.....	42
2.5. Cuantificación de <i>Bbitctp</i> por qPCR .....	43
2.6 Extracción de proteínas totales de las fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .....	46
2.7 Concentración y cambio de buffers de los extractos proteicos.....	47
2.8 Cuantificación por el método de Bradford .....	48
2.9. Detección de <i>BbiTCTP</i> por Western Blot .....	49
2.10 Clonación del gen <i>Bbitctp</i> y <i>gp45</i> en el vector de expresión y análisis de las clonas.....	49
2.11 Transformación de <i>E. coli</i> Rosetta gami.....	51
2.12 Expresión y análisis de la solubilidad de las proteínas recombinates <i>rBbTCTP</i> y <i>rGP45</i> . .....	52
2.13 Purificación de las proteínas <i>rBbTCTP</i> y <i>rGP45</i> (incluir <i>GP45</i> ).....	53
2.14 Cuantificación por ELISA de <i>BbTCTP</i> en fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .....	53
2.15 Obtención de anticuerpos anti <i>rBbTCTP</i> de <i>B. bigemina</i> en bovinos .....	54
2.16 Obtención de anticuerpos anti <i>rGP45</i> de <i>B. bigemina</i> en conejos. ....	55
2.17 Inmunolocalización de <i>BbTCTP</i> de <i>B. bigemina</i> mediante microscopía confocal.....	55
Resultados .....	57
3.1 caracterización <i>in silico</i> a <i>BbTCTP</i> de <i>B. bigemina</i> .....	57
3.2 Análisis de la expresión de <i>Bbitctp</i> las fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .....	61
3.3 Abundancia de <i>BbTCTP</i> en las fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .....	63

3.3.1 Clonación gen <i>Bbitctp</i> en el vector de expresión pColdII y caracterización de clonas transformadas. ....	63
3.3.2 Evaluación de la expresión de la proteína recombinante <i>rBbTCTP</i> y su purificación mediante cromatografía de afinidad. ....	65
3.3.3 Evaluación de anticuerpos para el reconocimiento de <i>BbTCTP</i> recombinante y nativa .....	67
3.3.4 Cuantificación de <i>BbTCTP</i> en las fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .....	70
3.4 Inmunolocalización de <i>BbTCTP</i> en merozoitos de <i>B. bigemina in vitro e in vivo</i> .....	72
3.4.1 Obtención de anticuerpos anti- <i>BbTCTP</i> .....	72
3.4.2 Clonación gen <i>gp45</i> en el vector de expresión pColdII y caracterización de clonas transformadas. ....	73
3.4.3 Análisis de la inducción de <i>rGP45</i> y su purificación mediante cromatografía de afinidad.....	74
3.4.5 Obtención de anticuerpos anti- <i>rGP45</i> .....	76
3.4.6 Inmunolocalización de <i>BbTCTP</i> en merozoitos <i>in vivo e in vitro</i> de <i>B. bigemina</i> .....	77
Discusión.....	80
Conclusiones.....	86
Referencias: .....	88
Anexos .....	98

## Índice de Tablas:

Tabla 1	Clasificación taxonómica.	1
Tabla 2	Algunos productos químicos utilizados para el control de <i>R. microplus</i> .	11
Tabla 3	Funciones, características estructurales, ubicación celular y análisis estructural de TCTP de algunas especies.	23
Tabla 4	Set de oligos de <i>Bbitctp</i> y <i>gapdh</i> utilizados en tiempo real.	44
Tabla 5	Cuantificación por pixeles de los amplicones de <i>Bbitctp</i> y <i>gapdh</i> .	45

## Índice de figuras

Figura 1	Distribución nacional de <i>R. microplus</i> en México.	5
Figura 2	Ciclo de vida de <i>B. bovis</i> .	7
Figura 3	Invasión al eritrocito por <i>B. bovis</i> .	9
Figura 4	Comparación visual de las estructuras tridimensionales predichas de los ortólogos de TCTP en diversos protozoarios parásitos.	26
Figura 5	Expresión de TCTP en merozoítos de <i>B. bovis</i> .	34
Figura 6	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de TCTP.	57
Figura 7	Estructura 3D de la proteína <i>BbTCTP</i> de <i>B. bigemina</i> generado por AlphaFold2.	58
Figura 8	Comparación de las secuencias de TCTP de parásitos del phylo Apicomplexa con <i>BbTCTP</i>	59
Figura 9	PCR en punto final y curva de <i>Bbitctp</i> y <i>gapdh</i> .	61
Figura 10	Expresión diferencial de <i>Bbitctp</i> de fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .	62
Figura 11	Amplicón de la región codificante de <i>Bbitctp</i> de <i>B. bigemina</i> .	64
Figura 12	Obtención de la construcción pColdII/ <i>Bbitctp</i> .	64
Figura 13	Análisis de la construcción pColdII/ <i>Bbitctp</i> .	65
Figura 14	Análisis de la expresión de <i>rBbTCTP</i> .	65
Figura 15	Análisis de la proteína recombinante <i>rBbTCTP</i> .	66
Figura 16	Western blot utilizando anticuerpos anti-TCTP.	67
Figura 17	Detección de la proteína nativa <i>BbTCTP</i>	69
Figura 18	Western blot de proteínas totales post clean-up de sangre infectada con <i>B. bigemina</i> (merozoítos <i>in vivo</i> ).	70
Figura 19	Abundancia de la proteína <i>BbTCTP</i> en fases infectantes de <i>B. bigemina</i> .	71
Figura 20	Purificación de <i>rBbTCTP</i>	72
Figura 21	Western blot de <i>rBbTCTP</i>	72

Figura 22	Construcción y análisis de pColdII/ <i>gp45</i> de <i>B. bigemina</i> .	74
Figura 23	Análisis de la expresión de rGP45	75
Figura 24	Purificación de rGP45.	75
Figura 25	Panel A: Localización de <i>Bb</i> /TCTP en merozoítos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	77
	Panel B: Controles de muestras de merozoítos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> incubadas con sueros preinmunes.	77

## Abreviaturas

<i>B. bigemina</i>	<i>Babesia bigemina</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
µg	Microgramos
µl	Microlitro
cADN	ADN complementario
pb	Pares de base
WB	Western Blot
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
mM	Milimolar
TBS	Solución salina tamponada con Tris
Rpm	Revolución por minuto
ml	Mililitro
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
ANOVA	Análisis de la varianza
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
TCTP	Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente
<i>Bb</i> /TCTP	TCTP de <i>B. bigemina</i>
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa

## Resumen

*Babesia bigemina* es un parásito intracelular obligado transmitido por garrapatas como *Rhipicephalus microplus*, ambos organismos causan pérdidas económicas considerables en la industria de la ganadería bovina en México y en todo el mundo. Los bovinos se infectan cuando una garrapata se alimenta y transmite a los esporozoítos de *B. bigemina*, los cuales penetran a los eritrocitos transformándose en merozoítos. Este parásito ha sido estudiado durante años, pero se desconoce el patrón de expresión de algunas proteínas durante las fases infectantes del parásito que corresponden a los merozoítos y esporozoítos, que pueden estar involucradas en el establecimiento de la infección aguda por *B. bigemina*. La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP, por sus siglas en inglés) es una proteína conservada en organismos eucariotas asociada a funciones tanto intracelulares como extracelulares. En parásitos intracelulares, TCTP cumple funciones importantes, como la modulación del sistema inmune, la resistencia a fármacos, el crecimiento y desarrollo de los parásitos, y la invasión celular. El objetivo del presente proyecto fue caracterizar la expresión y localización de *BbTCTP* en las fases infectantes de *B. bigemina*. Para cumplir dicho objetivo, se amplificó, clonó y secuenció la región codificante del gen *Bbitctp* de *B. bigemina*. La proteína codificada por esta secuencia se caracterizó *in silico* de la proteína, la cual mostró características similares a las reportadas en *Plasmodium falciparum* a nivel de secuencia y estructura 3D. En la parte experimental, se analizó la expresión del gen por RT-qPCR y la abundancia de la proteína por ELISA cuantitativa, en muestras de merozoítos *in vivo* e *in vitro*, así como en esporozoítos (todas las muestras se obtuvieron a partir de infecciones e infestaciones experimentales). Los resultados mostraron una mayor expresión tanto del gen como de la proteína en los merozoítos *in vivo*, seguido por los merozoítos *in vitro*, en comparación con los esporozoítos, en los cuales los valores fueron apenas cuantificables. Los ensayos de inmunolocalización de *BbTCTP* mostraron una distribución en el citoplasma tanto del parásito como de los eritrocitos infectados. Los resultados constituyen el primer reporte sobre el patrón de expresión diferencial de *BbTCTP* en las fases infectantes de *B. bigemina*, así como la localización celular de esta proteína.

## Abstract

*Babesia bigemina* is an obligate intracellular parasite transmitted by ticks such as *Rhipicephalus microplus*. Both organisms cause considerable economic losses in the cattle industry in Mexico and worldwide. Cattle become infected when a tick feeds on them and transmits *B. bigemina* sporozoites, which penetrate erythrocytes and transform into merozoites. This parasite has been studied for years, but the expression patterns of some proteins during the infective stages of the parasite, specifically the merozoites and sporozoites, remain unknown. These proteins may be involved in the establishment of acute *B. bigemina* infection. The Translational Controlled Tumour Protein (TCTP) is a conserved protein in eukaryotic organisms, with both intracellular and extracellular functions. In intracellular parasites, TCTP plays important roles, including modulating the immune system, conferring drug resistance, regulating parasite growth and development, and facilitating cell invasion. The objective of this project was to characterize the expression and localization of *Bb*TCTP in the infective stages of *B. bigemina*. To achieve this objective, the coding region of the *B. bigemina* *Bbitctp* gene was amplified, cloned, and sequenced. Using this sequence, an *in silico* characterization of the protein was performed, revealing characteristics similar to those reported for *Plasmodium falciparum* at the sequence and structural levels. In the experimental phase, gene expression was analyzed by RT-qPCR and protein abundance by quantitative ELISA in merozoite samples *in vivo* and *in vitro*, as well as in sporozoites (all samples were obtained from experimental infections and infestations). The results showed higher expression of both the gene and the protein in merozoites *in vivo*, followed by merozoites *in vitro*, compared to sporozoites, in which the values were barely quantifiable. Immunolocalization assays for *Bb*TCTP showed cytoplasmic distribution in both the parasite and infected erythrocytes. These results constitute the first report on the differential expression pattern of *Bb*TCTP during the infective stages of *B. bigemina*, as well as its cellular localization.

## Introducción

### 1.1.1 Babesiosis bovina

Una de las enfermedades de mayor relevancia en la industria de producción ganadera es la babesiosis bovina. El estudio de esta enfermedad se remonta a 1888, cuando Victor Babes describió por primera vez la presencia de microorganismos en la sangre de bovinos afectados por hemoglobinuria en Rumania, denominando al agente como *Haematococcus bovis*, posteriormente reclasificado como *B. bovis* (Bock *et al.*, 2004). En 1893, Theobald Smith y Fred Kilborne identificaron en Estados Unidos al agente causal de la fiebre de Texas, al que denominaron *Pyrosoma bigeminum* actualmente conocido como *B. bigemina*, y demostraron por primera vez la transmisión de un organismo patógeno desde artrópodos como *Boophilus annulatus* hacia un hospedador mamífero como los bovinos, describiendo así una de las enfermedades más importantes transmitida por vectores (Smith & Kilborne, 1893). Estos protozoos del género *Babesia* fueron descritos como parásitos obligados intracelulares, transmitidos principalmente por garrapatas (Wodaje *et al.*, 2019)

**Tabla 1: Clasificación taxonómica**

Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Sporozoasida</i>
Orden	<i>Eucoccidiorida</i>
Suborden	<i>Piroplasmorina</i>
Familia	<i>Babesiidae</i>
Género	<i>Babesia</i>
Especies	<i>B.bovis</i>
representativas en México	<i>B. bigemina</i> <i>B.divergens</i>

### 1.1.2 Signos en los bovinos

La babesiosis se caracteriza clínicamente por fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y, en casos graves, muerte de los bovinos infectados. Durante la fase aguda, se pueden llegar a detectar porcentajes de parasitemias de hasta un 3% de eritrocitos infectados por *B. bigemina*, teniendo un impacto marcado en la economía de la industria ganadera (Alvarez, J. A., *et al.*, 2019).

Los bovinos infectados que se recuperan permanecen infectados de forma persistente con bajos niveles de parasitemia durante hasta 22 meses, lo que permite la transmisión continua a través de garrapatas hacia los bovinos y la permanencia en el ambiente de esta enfermedad. En regiones con presencia constante de los vectores, la reinfección temprana mantiene niveles subclínicos de parasitemia, generando inmunidad de por vida (Giglioti *et al.*, 2024; Alvarez, J. A., *et al.*, 2019).

La susceptibilidad clínica varía según factores como raza, edad y estado nutricional del bovino (Bock *et al.*, 1997; Jonsson *et al.*, 2000), siendo los animales jóvenes más resistentes gracias a un fenómeno conocido como “resistencia inversa a la edad” que es un claro ejemplo de inmunidad pasiva (Zintl *et al.*, 2005). Cabe destacar que, pueden presentarse casos clínicos en terneros entre los 30 y 120 días de edad, coincidiendo con la disminución de anticuerpos presentes en el calostro y leche materna, es decir que los animales jóvenes que se alimentan de madres inmunizadas cuentan con protección pasiva dada por los anticuerpos de la madre (Giglioti *et al.*, 2016). No obstante, aquellos que reciben una transferencia insuficiente de anticuerpos generan poca inmunidad contra el parásito, así como los animales adultos o bovinos inmunocomprometidos son los más vulnerables a la infección por *Babesia* (Rimal *et al.*, 2025).

### 1.1.3 Transmisión de la babesiosis bovina

La transmisión de la babesiosis bovina está principalmente asociada a garrapatas del género *Boophilus*, recientemente reclasificadas como *Rhipicephalus*. *Rhipicephalus microplus* es el vector más importante y el más ampliamente distribuido a nivel mundial. Esta especie, junto con otras, se considera endémica de regiones tropicales y subtropicales, presentes en Australia, África, Asia, el sur de

Europa y América del Sur y Central, donde las garrapatas del género *Rhipicephalus* sirven como vectores de enfermedades (Bock *et al.*, 2004).

La dispersión de *R. microplus* en África se ve limitada por la presencia de *Rhipicephalus decoloratus* (Wodaje *et al.*, 2019). En ese continente, *B. bigemina* presenta una mayor distribución que *B. bovis*, debido a la capacidad vectorial adicional que le brindan garrapatas como *R. decoloratus* y *Rhipicephalus evertsi*. Por su parte, *Boophilus annulatus* actúa como vector principal en regiones del norte de África, Medio Oriente, Turquía y Europa. En contraste, *Babesia divergens*, de distribución más restringida, es transmitida exclusivamente por *Ixodes ricinus* en Europa, lo que limita su distribución geográfica. Este panorama resalta la importancia de los vectores en la transmisión de *Babesia spp.* y su relevancia en el desarrollo de estrategias de control (Bock *et al.*, 2004).

En México, la babesiosis bovina representa un problema endémico en regiones ganaderas de clima tropical y subtropical, donde aproximadamente el 75 % del hato nacional se encuentra expuesto a garrapatas y a las enfermedades que transmiten. Entre las especies más prevalentes causantes de la babesiosis en México se encuentran *B. bigemina* y *B. bovis* (Mosqueda *et al.*, 2012). Las distintas especies de *Babesia* se transmiten por garrapatas duras; además, estas se propagan a los huevos de las garrapatas mediante transmisión transovárica. Los vectores más comunes para la transmisión de *B. bigemina* son *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus*, mientras que otros menos comunes, pero considerados vectores competentes, son *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus geigy* y *Rhipicephalus evertsi*. Por otro lado, los vectores comunes de *B. bovis* son *R. microplus* y *R. annulatus*, y como vector poco común pero competente se encuentra *R. geigy*. Como ya se mencionó, *B. bigemina* y *B. bovis* pueden transmitirse entre garrapatas por vía transovárica. La diferencia entre estas especies de *Babesia* en cuanto a la transmisión radica en que *B. bovis* únicamente se puede transmitir a los bovinos en los estadios larvarios de las garrapatas, mientras que *B. bigemina* se transmite en los estadios de ninfa y adulto (Gray *et al.*, 2019; Wodaje *et al.*, 2019).

Además de la transmisión transovárica, se ha documentado la transmisión transestadial llevada a cabo por algunos géneros de *babesia*, en la cual el parásito sobrevive a través de las distintas fases del ciclo de vida de la garrapata, desde larva hasta adulto (Ravindran *et al.*, 2023). Esta modalidad es particularmente relevante en la persistencia de la infección en poblaciones de garrapatas, incluso en ausencia de hospedadores infectados. La eficiencia de transmisión también puede verse influenciada por factores como la densidad de garrapatas, la susceptibilidad genética del hospedador, la temperatura ambiental y la humedad, que afectan tanto la biología del vector como la viabilidad del parásito (Antunes *et al.*, 2017).

Cabe destacar que la babesiosis bovina es considerada la enfermedad transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial, debido a su alta morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas, especialmente en países tropicales y en vías de desarrollo. Por último, el impacto económico, médico y veterinario de esta enfermedad es mayormente causado por las dos especies de *Babesia* anteriormente mencionadas (Ayehu Menegsha., 2020).

#### **1.1.4 Distribución de la enfermedad**

La distribución geográfica de la babesiosis bovina corresponde a la distribución del vector, en México se han descrito 77 especies de garrapatas de importancia en la industria del ganado bovino como *R. micropluss*, *R. anulatus*, *R. decoloratus* y *R. evertsi*. Estas garrapatas se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones climáticas favorecen el establecimiento y permanencia del vector junto con los patógenos que transmiten como la babesiosis bovina (SENASICA, 2025). En el territorio nacional *R. microplus* se distribuye en al menos el 65.96% del territorio nacional. Mientras que un 30.60% del territorio se encuentra libre del vector, lo cual corresponde a aquellos estados donde las condiciones climáticas no favorecen su desarrollo, por último, el 3.44% del territorio nacional, se encuentra en fase de erradicación, tal como se observa en la figura 1 (SENASICA, 2025).



**Figura 1: Distribución nacional de *R. microplus* en México** (Imagen tomada de SENASICA, 2025).

La industria ganadera representa una de las más importantes actividades económicas en México, debido a que este país es uno de los principales exportadores de carne a nivel mundial, tan solo del año 1989 and 2009 se exportó en promedio más de 1 millón de cabezas de ganado hacia los Estados Unidos (Peel *et al.*, 2012). Por esta razón, las infestaciones por garrapatas representan severas pérdidas económicas a la industria ganadera, debido a que las exportaciones de cabezas de ganado y la movilización de este a nivel nacional, se ven limitadas por la presencia del vector y otras enfermedades (González Sáenz Pard & Hernández Ortiz, R, 2012). Las pérdidas económicas estimadas para los estados unidos son de 2.260 millones de dólares lo que corresponde al 10% de las ganancias totales, a nivel global las pérdidas económicas por garrapatas y los patógenos que transmiten van desde los \$ 13,9 mil millones y US\$ 18,7 mil millones de dólares (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

### 1.1.5 Ciclo de vida de *B. bigemina*

El desarrollo del ciclo de vida de *Babesia* es complejo y comprende distintas etapas que ocurren en dos hospederos: las garrapatas y los bovinos, donde se desarrollan los estadios sexuales y asexuales, respectivamente (Fig. 2). El ciclo inicia cuando

los esporozoítos de *Babesia* son transmitidos por las garrapatas a bovinos sanos. Los esporozoítos penetran la membrana de los eritrocitos mediante el uso del complejo apical del parásito, que contiene organelos especializados como roptrias y micronemas, encargados de secretar proteínas implicadas en la adhesión e invasión al eritrocito, tal como se muestra en la figura 3 (Jalovecka et al., 2019; Cuy-Chaparro et al., 2023).

Una vez dentro del eritrocito, los esporozoítos se transforman en trofozoítos, los cuales posteriormente se dividen por fisión binaria para dar lugar a dos merozoítos lo que comprende a la fase asexual del parásito. Después, el eritrocito se lisa, lo que permite la liberación de los merozoítos, los cuales infectan nuevos eritrocitos sanos, perpetuando la infección en los bovinos, cabe mencionar que una parte de los merozoítos se transforman en gametocitos (Fig. 2) (Mosqueda et al., 2012).

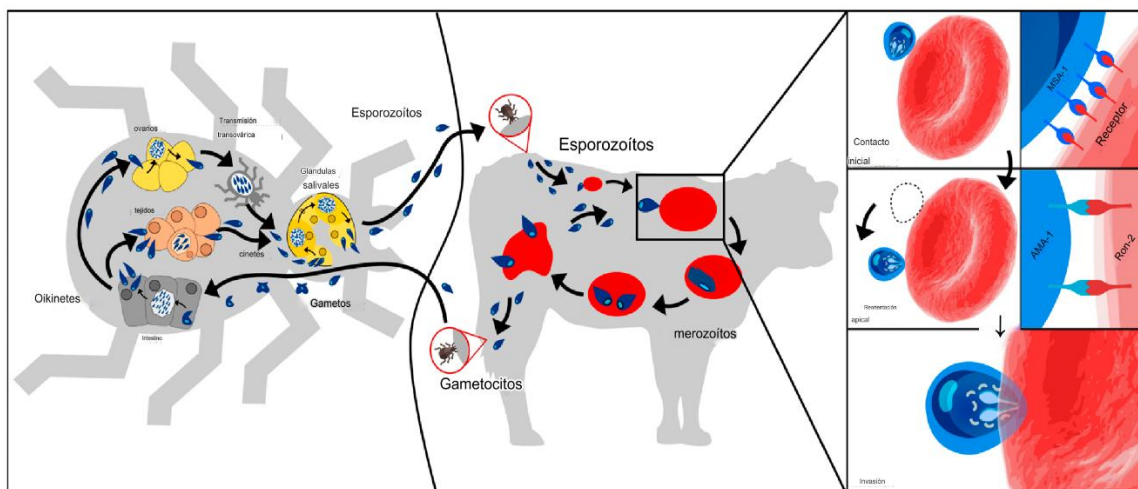
Durante estas fases infectivas (Merozoítos y esporozoítos), *Babesia* se replica en el citoplasma del eritrocito. Además, *Babesia spp.* expresa proteínas de superficie variables (VMSA y VESA) que permiten al parásito evadir la respuesta inmune del hospedero y mantener infecciones a largo plazo (Jalovecka et al., 2019; Rathinasamy et al., 2019).

En las garrapatas, la infección inicia cuando estas se alimentan de bovinos infectados con *Babesia spp.* ingiriendo gametocitos y merozoítos. En el intestino de la garrapata se da la formación de los gametos que se fusionan para formar cigotos móviles denominados ookinetos o cigotos, los cuales presentan una forma alargada con una cabeza similar al pico de una flecha, lo que le ayuda a penetrar al intestino de la garrapata (Jalovecka et al., 2019).

Dentro de las células intestinales, el cigoto pasa a ser cineto, el cual se disemina por la hemolinfa hacia distintos tejidos de la garrapata, incluyendo glándulas salivales y ovarios (Fig. 2). En este último ocurre la transmisión transovárica, infectando los huevos de la garrapata. Este mecanismo de transmisión transovárica asegura la persistencia del parásito en generaciones sucesivas del vector (Jalovecka et al., 2019; Cuy-Chaparro et al., 2023).

Las garrapatas, ovopositan huevos infectados, posteriormente estos eclosionan a larvas e infestan un bovino sano, en el hospedante estos ectoparásitos desarrollan su próximo estadio que son las ninfas, en estas los cinetos invaden las glándulas salivales y se desarrollan como esporogonia, durante el cual se forman esporozoítos. Dicha fase permanece latente durante la muda de la garrapata de huevo a larva y posteriormente a ninfa, lo que permite la transmisión transestadial y asegura que el siguiente estadio del vector pueda transmitir la infección (Jalovecka et al., 2019). Una vez que la garrapata infectada se alimenta nuevamente, los esporozoítos son liberados en la saliva incitando al bovino.

Una de las principales diferencias en el ciclo de vida de *B. bigemina* y *B. bovis* es que *B. bovis* se consideran infecciosos entre 2 y 3 días después de ser transmitidos a las larvas de las garrapatas, y que en *R. microplus*, *B. bovis* no puede sobrevivir ni se transmite más allá del estadio larval. Por otro lado, *B. bigemina* alcanza la madurez aproximadamente 9 días después de que la larva de la garrapata se adhiere al bovino y las ninfas de garrapata son las responsables de transmitir a *B. bigemina* (Mosqueda et al., 2012).



**Figura 2: Ciclo de vida de *B. bovis*.** Hospedante: el vector (garrapata) y el hospedante vertebrado (bovino). En la garrapata, el parásito desarrolla su estadio sexual, comenzando con la formación de gametos que se fusionan en el intestino para formar ookinetes móviles, los cuales invaden las células intestinales y generan cinetos. Estos cinetos se diseminan hacia los ovarios (transmisión transovárica) y las glándulas salivales (transestadial), donde se desarrollan esporozoítos. En el bovino, los esporozoítos invaden a los eritrocitos mediante proteínas como AMA-1,

RON2 y MSA-1, transformándose en trofozoítos y después en merozoítos, perpetuando la infección. La figura también resalta las proteínas implicadas en el contacto inicial, reorientación apical e invasión, que son blancos clave para el diseño de vacunas sintéticas (Cuy-Chaparro et al., 2023).

En particular, se han identificado péptidos conservados derivados de *Babesia* como MSA-1, AMA-1 y RON2 que presentan capacidad de unión a eritrocitos bovinos y contienen epítomos B y T, lo que los convierte en candidatos prometedores para vacunas sintéticas. Estos péptidos han demostrado inhibición significativa de la invasión eritrocitaria *in vitro*, y algunos inducen una respuesta Th1 duradera (Cuy-Chaparro et al., 2023).

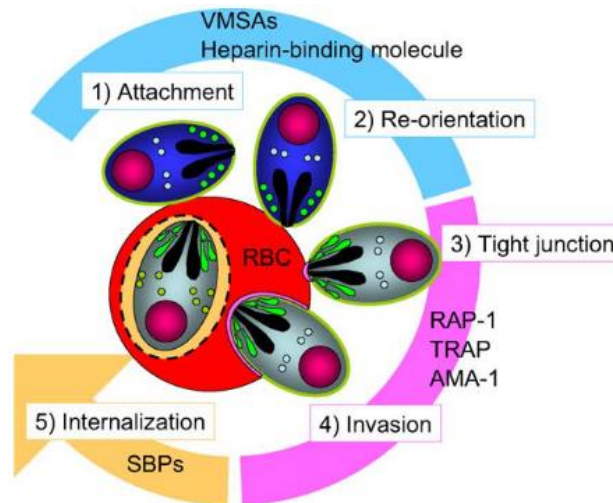
Además, lo anteriormente mencionado destaca como es que los esporozoítos y merozoítos, representan puntos estratégicos para el desarrollo métodos de control como las vacunas bloqueadoras de la transmisión (Rathinasamy et al., 2019; Cuy-Chaparro et al., 2023).

#### **1.1.6 Proceso de invasión de *Babesia spp* a los eritrocitos**

El proceso de invasión eritrocitaria por *Babesia spp* (Fig. 3), particularmente *B. bovis*, constituye una etapa vital en el desarrollo asexual del ciclo de vida de este parásito ya que a diferencia de otros apicomplexas como *Plasmodium*, los esporozoítos de *Babesia spp*. invaden directamente a los eritrocitos del hospedador. La invasión se lleva a cabo mediante una secuencia de eventos determinantes que involucran la interacción de proteínas del parásito con receptores presentes en la membrana del eritrocito. En la fase inicial, los merozoítos extracelulares se adhieren a la superficie del eritrocito mediante proteínas de superficie como los antígenos MSA (del inglés, merozoite surface antigens), pertenecientes a la familia VMSEA (MSA-1, MSA-2a1, MSA-2a2, MSA-2b y MSA-2c) (Florin-Christensen et al., 2002; Suarez et al., 2000).

Posteriormente, *Babesia* se reorienta para posicionar su complejo apical compuesto por rhoptrias, micronemas y cuerpos esféricos, hacia la membrana del eritrocito. En esta etapa se secretan proteínas implicadas en la invasión, tales como RAP-1 (rhoptry-associated protein 1), AMA-1 (apical membrane antigen 1) y TRAP (thrombospondin-related anonymous protein), las cuales promueven la formación

de una unión estrecha (tight junction) y la penetración por el parásito. RAP-1 es una proteína conservada y capaz de inducir respuestas inmunes humorales, mientras que AMA-1 y TRAP contienen dominios adhesivos como von Willebrand A y trombospondina tipo 1, que interactúan con receptores como los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) presentes en la superficie del eritrocito (Yokoyama et al., 2006; Gaffar et al., 2004).



**Figura 3: Invasión al eritrocito por *B. bovis*.** 1) Attachment (fijación): Unión del merozoíto mediado por MSA-1, MSA, mediante la unión con ácido siálico y glicosaminoglicanos sulfatados del eritrocito. 2) Reorientación: posicionamiento del complejo apical compuesto por rohoptrias, micronemas y cuerpos esféricos para la secreción de proteínas de invasión. 3) Formación de unión estrecha (tight junction): interacción entre el complejo apical y la membrana del eritrocito, posteriormente se da la secreción de proteínas como RAP-1, AMA-1 y TRAP. 4) Invasión: El merozoíto penetra la membrana del eritrocito en esta etapa se liberan proteínas desde los cuerpos esféricos que facilitan la entrada y adaptación intracelular. 5) internalización: Establecimiento en el citoplasma del eritrocito, para la posterior multiplicación por fisión binaria, posteriormente los merozoítos salen de la célula, invaden otros eritrocitos. Imagen tomada de Yokoyama et al., 2006.

Una vez dentro del eritrocito, el parásito libera proteínas a través de los cuerpos esféricos, como SBP-1, SBP-2 y SBP-3, las cuales se hipotetiza que modifican intracelularmente al eritrocito estableciendo una interacción directa con el hospedante. La multiplicación asexual ocurre por fisión binaria, dando como resultado, nuevos merozoítos que salen al lisis la célula y reinfectan otros eritrocitos (Yokoyama et al., 2006).

### **1.1.7.1 Métodos de control de la Babesiosis bovina**

Los principales países productores de ganado bovino se encuentran en América, destacando Brasil, Argentina y México como líderes en producción. En 2019, Brasil reportó una producción anual de 214,659,840 cabezas de ganado, seguido por México con 35,224,960 y Argentina con 54,460. Esta actividad representa un pilar económico fundamental para dichos países, debido a la obtención de productos como carne, cuero y leche, lo que los posiciona como principales exportadores de ganado y sus derivados a nivel mundial. En este contexto, las enfermedades parasitarias como la babesiosis bovina constituyen una amenaza significativa para la salud animal y el comercio internacional, ya que las infecciones por *Babesia spp.* están asociadas a cuadros clínicos que comprometen el estado nutricional, la productividad y la supervivencia del ganado infectado (Ferreira *et al.*, 2022).

La babesiosis bovina, causada principalmente por *B. bovis* y *B. bigemina*, es endémica en regiones tropicales y subtropicales del continente americano, donde las condiciones climáticas favorecen la proliferación de su vector. Ante esta situación, se han desarrollado diversas estrategias de control para mitigar el impacto de la enfermedad en la industria ganadera. Los principales métodos incluyen:

#### **1.1.7.2 Control del vector**

Las garrapatas del género *Rhipicephalus*, especialmente *R. microplus*, son consideradas una de las mayores amenazas para la industria debido a su capacidad para transmitir patógenos como *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.* Estas infestaciones afectan directamente la productividad de la industria del ganado bovino.

Los métodos más comunes de control incluyen la aplicación de acaricidas como organofosforados, piretroides, amidinas y fenilpirazoles (Tabla 2), los cuales se emplean para reducir las infestaciones por garrapatas en bovinos y por lo tanto disminuir la transmisión de enfermedades. Estos productos actúan interrumpiendo el ciclo de vida de las garrapatas, logrando desde la reducción de infestaciones hasta su eliminación completa en algunos casos, lo que contribuye a disminuir la incidencia de babesiosis bovina (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

Tabla 2: Algunos productos químicos utilizados para el control de *R. microplus*.

<b>Familia química</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Moléculas químicas</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Modos de uso</b>
<b>Organofosforados</b>	Inhiben la acetilcolinesterasa, provocando parálisis	Coumaphos, Diazinon	Eficaces, amplio espectro	Alta toxicidad, resistencia frecuente, residuos en carne/leche	Aspersión, baño de inmersión
<b>Piretroides</b>	Alteran canales de sodio en membranas neuronales	Deltametrina, Cipermetrina	Baja toxicidad en mamíferos, acción rápida	Resistencia generalizada, efecto residual limitado	Aspersión, pour-on
<b>Fenilpirazoles</b>	Bloquean canales GABA, inhibiendo la transmisión nerviosa	Fipronil	Alta eficacia, acción prolongada	Costosos, toxicidad ambiental potencial	Tópico, pour-on
<b>Lactonas macrocíclicas</b>	Modulan canales de cloro mediados por glutamato	Ivermectina, Moxidectina	Acción sistémica, amplio espectro	Residuos en leche/carne, resistencia emergente, eficacia variable	Inyectable, pour-on, oral
<b>Amidinas</b>	Activan receptores octopaminérgicos	Amitraz	Eficaz contra cepas resistentes	Toxicidad en humanos, uso restringido por normativas	Aspersión, baño de inmersión

Información tomada y modificada de Alonso-Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2022).

No obstante, el uso desmedido y prolongado de acaricidas ha generado múltiples efectos desfavorables, entre los que destacan la selección de poblaciones de garrapatas resistentes a acaricidas, la contaminación de productos cárnicos y lácteos con residuos químicos, y por último un impacto ambiental considerable

debido a la acumulación de estos compuestos en suelos y cuerpos de agua, aunado a la reducción de insectos en las zonas donde se usan (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012; Alonso-Díaz & Fernández-Salas, 2022).

Como alternativa al control químico, se han desarrollado vacunas contra antígenos de las garrapatas, consideradas una opción más sostenible, amigable con el medio ambiente y específica para el control de infestaciones por garrapatas y la prevención de enfermedades transmitidas por estas. Las vacunas están diseñadas con base en antígenos específicos, como la glicoproteína de membrana Bm86, expresada principalmente en el intestino medio de hembras de *R. microplus* (Bastos *et al.*, 2010).

El uso de vacunas basadas en la proteína Bm86 de la garrapata, como Gavac®, TickGARD® e Ixovac®, ha demostrado reducir significativamente la cantidad de garrapatas que concluyen su repleción, disminuir el porcentaje de ovoposición y afectar la supervivencia de las hembras repletas (Abbas, M. N *et al.*, 2023). Adicionalmente el silenciamiento de *Bm86* mediante ARNi tiene como efecto una menor eficiencia reproductiva y mayor mortalidad post repleción (Bastos *et al.*, 2010).

Entre las ventajas de estas vacunas se encuentran su especificidad, la reducción del uso de acaricidas y la disminución del riesgo de residuos químicos en productos de origen animal. Además, al interferir con la capacidad digestiva del vector, las vacunas pueden contribuir indirectamente a la reducción de la transmisión de *Babesia spp.* en zonas endémicas. Sin embargo, su eficacia como estrategia única ha sido cuestionada, debido a que no eliminan completamente las infestaciones y su efectividad puede variar según la cepa de garrapata, la raza bovina y el estado inmunológico del hospedante. Una de las principales razones de esta variabilidad es la presencia de polimorfismos en el gen *Bm86* entre diferentes aislados de la misma especie de *R. microplus*, lo que afecta el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos (Bastos *et al.*, 2010; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Estos polimorfismos pueden alterar la secuencia de los epítomos inmunogénicos, reduciendo la eficacia de las vacunas.

Asimismo, las vacunas requieren múltiples aplicaciones para mantener niveles protectores adecuados, y su aplicación no garantiza la eliminación de la garrapata, por lo cual no excluye el uso de los métodos de control químicos (INIFAP, 2022).

### **1.1.7.3 Control químico de la babesiosis bovina**

El control químico es uno de los métodos más utilizados para controlar la babesiosis bovina en animales de campo e infecciones inducidas. Estos compuestos químicos se utilizan con fines tanto terapéuticos como profilácticos, especialmente en zonas donde la Babesiosis se considera endémica, en las cuales su aplicación busca reducir la parasitemia y prevenir la aparición de signos clínicos graves causados por la enfermedad. Existe una amplia gama de compuestos químicos con actividad antiparasitaria, los cuales difieren en sensibilidad, especificidad y toxicidad.

Los primeros fármacos utilizados fueron el sulfato de quinuronio, amicarbalida, azul tripán y dipropionato de imidocarb. Sin embargo, varios de estos compuestos han dejado de ser distribuidos debido a dificultades en su fabricación, comercialización y efectos adversos sobre los productos de origen animal, como la decoloración de la carne y la presencia de residuos farmacológicos persistentes en dichos productos (Mosqueda *et al.*, 2012; Rimal *et al.*, 2025).

Actualmente, los compuestos mayormente utilizados son el dipropionato de imidocarb y el acetato de diminazeno. Ambos presentan actividad contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. caballi*, y se administran por vía parenteral en dosis específicas dependiendo del peso del animal (Suarez *et al.*, 2011; Todorovic *et al.*, 1975). El imidocarb, además de su efecto terapéutico, puede utilizarse como quimioprofiláctico en bovinos expuestos a zonas donde la babesiosis es endémica (Mosqueda *et al.*, 2012).

Diversos estudios han demostrado que el uso combinado de fármacos mejora la eficacia terapéutica reduce el riesgo de resistencia, como en el caso de combinaciones de imidocarb con atovaquona o 17-DMAG, que han mostrado sinergia en la inhibición de *Babesia spp.* (Suarez *et al.*, 2019). No obstante, el uso excesivo o indiscriminado de estos compuestos puede estimular la aparición de

cepas resistentes, comprometiendo su eficacia y aumentando el riesgo de toxicidad en los animales tratados (Suarez *et al.*, 2019).

La resistencia farmacológica ha sido documentada experimentalmente, como en el caso de cepas de *B. bovis* resistentes al imidocarb, lo cual enfatiza la necesidad de implementar nuevas medidas de control integradas que incluyan el monitoreo de sensibilidad, el uso desmedido de fármacos y la aplicación sinérgica de los químicos. Por lo anteriormente mencionado, es necesario que el control químico sea complementado con otras estrategias, tales como como el control inmunológico de la babesiosis y el control del vector transmisor. Además, el desarrollo de nuevas alternativas de compuestos con mayor especificidad y menor toxicidad disminuyendo el impacto negativo que acompaña al uso de estos químicos en los productos de origen animal (Mosqueda *et al.*, 2012; Suarez *et al.*, 2019; Rimal *et al.*, 2025).

#### **1.1.7.4 Control inmunológico**

La vacunación es uno de los métodos de bloqueo de la transmisión de los parásitos más utilizados en los últimos años que tiene el fin de generar inmunidad contra patógenos, en este caso contra Babesia. El control inmunológico de la babesiosis bovina se puede llevar a cabo mediante la inmunización natural, el uso de vacunas vivas atenuadas, la búsqueda de candidatos vacunales y el diseño de vacunas bloqueadoras de transmisión. De manera general este método de control tiene como propósito inducir respuestas inmunes protectoras, tanto humorales como celulares, capaces de proteger a los bovinos contra la babesiosis o interrumpir el ciclo de vida del parásito (De Waal & Combrink 2006).

La vacunación es uno de los métodos más utilizados para bloquear la transmisión de parásitos intracelulares, con el objetivo de generar anticuerpos específicos contra *Babesia spp.* Las vacunas con base en parásitos vivos atenuados o inactivos inducen una respuesta inmunitaria similar a la infección natural (De Waal & Combrink, 2006), ya que contienen una gran cantidad de antígenos que estimulan tanto la inmunidad humoral como celular. Esta diversidad antigénica favorece una inmunidad fuerte y duradera, lo que contribuye a reducir el impacto de la variación

antigénica y los signos clínicos de la enfermedad (Good & Stanisic, 2020). Sin embargo, estas vacunas presentan limitaciones marcadas por ejemplo existe el riesgo de reacciones adversas en animales adultos o susceptibles, la contaminación por otros agentes patógenos, también está la posibilidad de transmisión del parásito vacunal por garrapatas, además de los requerimientos logísticos estrictos como cadena de frío y supervisión post-vacunación, interferencia por quimioprofilaxis previa, y potencial reversión a virulencia en condiciones no controladas (Jerzak *et al.*, 2023).

Una alternativa a las limitaciones anteriormente mencionadas es el desarrollado de vacunas recombinantes dirigidas contra antígenos específicos de *Babesia*, estos candidatos vacunales pueden estar compuestos por un solo antígeno o una combinación de varios. La selección de estos antígenos depende de su expresión en los estadios asexuales del parásito, es decir, aquellos que se desarrollan en el hospedante bovino. Entre los candidatos más prometedores se encuentran AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1), MSA-1 y MSA-2c (Merozoite Surface Antigens), RAP-1 (Rhoptry-Associated Protein 1), PROF (Profilina), y proteínas implicadas en la invasión del eritrocito como RON2 (Rittipornlertrak *et al.*, 2022).

Por otra parte, se ha reportado que la inmunización con los dominios I y II recombinantes de AMA-1 induce una respuesta Th1 robusta, caracterizada por la activación de linfocitos CD4+ y CD8+, producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, y predominancia de IgG2 sobre IgG1 (Rittipornlertrak *et al.*, 2022). Asimismo, se han identificado péptidos de alta afinidad derivados de MSA-1 que interactúan con algunas proteínas del eritrocito del bovino, lo que los convierte en candidatos vacunales. RAP-1, por su parte, contiene epítomos B y T conservados que inducen anticuerpos neutralizantes y una respuesta celular duradera (Hidalgo-Ruiz *et al.*, 2022). Profilina ha demostrado ser un antígeno común entre *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. microti*, con capacidad para inducir inmunidad protectora en modelos murinos (Jerzak *et al.*, 2023).

No obstante, estos candidatos vacunales también presentan desafíos, como el tiempo que toma la generación de anticuerpos específicos, ya que puede tardar días

o semanas en detectarse títulos de anticuerpos en suero, y aunque estos permanecen constantes tiempo después de la infección, no son suficientes por sí solos para eliminar una infección aguda. En algunos casos, se requiere la complementación con quimioterapia o el uso de fármacos antiparasitarios (Florin-Christensen *et al.*, 2014).

Por otra parte, una estrategia con un enfoque diferente la cual consiste en interrumpir la transmisión del parásito por su vector, *R. microplus*, mediante la inmunización con antígenos específicos de estadios sexuales. Por ejemplo, el antígeno HAP2, expresado exclusivamente en gametocitos masculinos en el lumen del intestino medio del vector, ha demostrado ser un candidato eficaz. La vacunación con rHAP2 en bovinos impide completamente la transmisión de *B. bovis* por larvas de *R. microplus*, sin afectar el curso clínico de la infección sanguínea (Silva *et al.*, 2023). Este enfoque representa una alternativa prometedora para generar vacunas contra los estadios que se desarrollan en la garrapata y reducir la propagación del parásito en zonas endémicas. Además, al dirigirse a proteínas no expuestas al sistema inmune del hospedante bovino, las vacunas bloqueadoras de transmisión evitan la presión de selección que favorece la variabilidad antigénica, lo que podría mejorar su eficacia a largo plazo (Mosqueda *et al.*, 2012).

Cabe resaltar que el control inmunológico no siempre resulta eficiente: aunque la parasitemia pueda ser controlada, la persistencia de infecciones crónicas evidencia la capacidad de *Babesia* para evadir la respuesta inmune. Entre los mecanismos de evasión descritos se encuentran la variación antigénica, la modulación del sistema inmunológico del hospedador y la complejidad inherente al ciclo de vida del parásito, lo que dificulta su eliminación definitiva.

### **1.1.8 Respuesta inmune en infecciones por *Babesia spp.***

La respuesta inmunológica inducida por las infecciones causantes de la babesiosis bovina implica una respuesta compleja en el hospedante bovino, caracterizada por la activación de mecanismos innatos y adaptativos. La eficacia de esta respuesta está determinada por diversos factores, entre los que destacan la virulencia de la

cepa de *Babesia*, la edad del hospedante y su estado inmunológico previo (Brown *et al.*, 2006; Goff *et al.*, 2001; Martínez-García *et al.*, 2025).

Inmunidad innata: activación temprana y mediadores efectores

La respuesta inmune estimulada por parásitos intraeritrocíticos como *B. bigemina* está regulada principalmente por la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO), mediadores que inducen una respuesta combinada humoral y celular dependiente de linfocitos T (Brown *et al.*, 2006). Estos mediadores son secretados por células del sistema innato como monocitos, neutrófilos y células NK, que además participan en la fagocitosis de eritrocitos parasitados y en la activación de macrófagos mediante la producción de óxido nítrico (ON) (Goff *et al.*, 2001; Stich *et al.*, 1998).

La eficacia de la respuesta inmunológica inducida por *Babesia spp.* están moduladas por la edad del hospedante. Por ejemplo, los terneros presentan una inmunidad innata contra las infecciones por *B. bovis* durante los primeros seis meses de vida, caracterizada por una activación más rápida que en bovinos adultos. Esta respuesta está mediada por la producción temprana de ON, IFN- $\gamma$  e interleucina 12 (IL-12), y se ha asociado con una menor parasitemia y una mayor eficiencia en el control de la infección (Goff *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha observado que los merozoítos de *B. bovis* pueden modular negativamente la expresión de citocinas como IL-10, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , lo que sugiere un mecanismo de evasión inmunológica que contribuye a la persistencia del parásito en el hospedador (Goff *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006).

#### **1.1.8.1 Inmunidad adaptativa**

La respuesta adaptativa se activa tras la presentación de antígenos parasitarios por células presentadoras de antígeno en el contexto del MHC clase II, lo que conduce a la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estos linfocitos desempeñan un papel central en la inmunidad contra *Babesia spp.* al secretar IFN- $\gamma$  que potencia la actividad de los macrófagos y favorece el cambio de tipo a IgG2, el cual posee capacidad opsonizante en bovinos (Goff *et al.*, 2001).

En conjunto, la respuesta inmune del bovino frente a *Babesia spp.* se caracteriza por una interacción dinámica entre componentes innatos y adaptativos. La eficacia de esta respuesta depende de la capacidad del hospedante para activar mecanismos proinflamatorios y citotóxicos, así como de la presentación de antígeno y activación de linfocitos T. La edad del animal, el perfil de citocinas secretadas y la capacidad del parásito para modular la respuesta inmunológica son factores determinantes en la evolución clínica de la enfermedad y en el establecimiento de infecciones persistentes.

### **1.1.9 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune**

Uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune radica en la naturaleza del ciclo de vida de los parásitos. Dado que *Babesia spp.* se replica exclusivamente en eritrocitos, montar una respuesta inmune resulta complicado, pues esta debe dirigirse hacia la membrana de los eritrocitos infectados, la cual es modificada por *Babesia spp.* tanto estructural como funcionalmente, formando protuberancias que dificultan el reconocimiento por parte de las células T. Otra forma de evasión es la citoadherencia: los merozoítos y trofozoítos de *B. bovis* secuestran eritrocitos en el endotelio de capilares venosos, generando aglutinación en estas zonas y evitando la eliminación del parásito mediante la filtración esplénica (Allred, 1995).

Una infección aguda en bovinos no expuestos previamente a antígenos de *Babesia* conlleva a la activación de la respuesta inmune innata, junto con la infiltración de leucocitos como monocitos, macrófagos, células NK y células dendríticas. Asimismo, los macrófagos son activados por IFN- $\gamma$  secretado por células NK, lo que a su vez estimula la secreción de óxido nítrico (Suárez et al., 2019). Los bovinos que sobreviven a la infección desarrollan una infección persistente con resistencia a la progresión clínica de la enfermedad; los parásitos residen dentro de los eritrocitos, lo que complica su eliminación. En una segunda exposición a *Babesia*, se activa la respuesta inmune adaptativa, mediada por la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estos producen IFN- $\gamma$ , lo que favorece la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos neutralizantes de tipo IgG1 e IgG2 (Brown et al., 2006).

Estudios transcriptómicos realizados en bovinos infectados con cepas virulentas y atenuadas de *B. bigemina* han demostrado que la cepa atenuada induce una mayor transcripción de genes inmunitarios en comparación con la cepa virulenta. En ambos casos, se observó una tendencia general hacia la regulación negativa de genes relacionados con inmunoglobulinas, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y receptores de células T. No obstante, en animales infectados con la cepa virulenta se identificó una regulación positiva de genes como *hspa6*, *cd163*, *stat1* y *slc11a1*, previamente asociados con infecciones por otros apicomplexos (Martínez-García *et al.*, 2025).

#### **1.1.9.1 Variación antigénica**

El sistema inmunológico, como mecanismo de defensa, genera una respuesta frente a los antígenos de *B. bigemina* presentes en los merozoítos y eritrocitos infectados. En este contexto, la variación antigénica se ha descrito como un mecanismo de supervivencia que permite a parásitos como *B. bigemina* evadir la respuesta inmune del hospedador.

En *B. bovis* se ha caracterizado una familia de proteínas denominadas VESA (antígenos variables de la superficie del eritrocito), las cuales también están presentes en *B. bigemina* y participan tanto en la variación antigénica como en la citoadhesión de los eritrocitos al endotelio vascular (Esta última función es característica de *B. bovis*). Estas proteínas son sintetizadas por los merozoítos y posteriormente exportadas a la superficie de los eritrocitos. Aunque las VESA son reconocidas por el sistema inmunológico, su rápida variación antigénica se ha asociado con la persistencia de infecciones crónicas y la evasión de la respuesta inmune (Barbour & Restrepo, 2000).

La proteína VESA1 está compuesta por dos subunidades, VESA1 $\alpha$  y VESA1 $\beta$ , codificadas por los genes *ves1 $\alpha$*  y *ves1 $\beta$* , respectivamente. Estos genes se transcriben de forma simultánea desde un promotor bidireccional ubicado en el locus de transcripción activa (LAT), y su expresión es monoalélica, lo que significa que solo un par *ves1 $\alpha$ /ves1 $\beta$*  se transcribe (Allred, 2019). Actualmente se postula que la mayoría de los parásitos transcriben uno o un grupo reducido de genes

parálogos de manera simultánea. Por ejemplo, se estima que aproximadamente el 70 % de los genes *ves*, que codifican para las proteínas VESA, se expresan en un momento dado. Además, se ha demostrado que la variación de las proteínas VESA está mediada por un proceso de conversión génica segmentaria (Allred, 2021). Este mecanismo implica la incorporación de fragmentos en la región que se transcribe, es decir, secuencias cortas provenientes de genes donantes no transcritos, a los genes *ves* activos. Este proceso ocurre sin alterar la secuencia del gen donante, lo que da lugar a genes denominados mosaicos y proteínas con combinaciones provenientes de regiones donantes y receptoras (Allred, 2019; Hakimi *et al.*, 2022).

La variación antigénica en *B. bovis* se caracteriza por una alta tasa de recombinación dirigida entre los genes de la familia *ves*, lo que genera una diversidad estructural continua en las proteínas VESA1 durante el curso de la infección. (Allred, 2019; Barbour & Restrepo, 2000).

Estructuralmente, VESA1a contiene dominios ricos en cisteína y lisina (CKRD), secuencias conservadas dentro de regiones variables (VDCS1 y VDCS2), y una región terminal transmembrana que ancla la proteína a la membrana del eritrocito. VESA1b, por su parte, posee un dominio de baja complejidad (LCV) y también una región transmembrana. Estas características permiten su localización en las crestas de los eritrocitos infectados, facilitando la citoadhesión y el escape inmunológico (Allred, 2019). La expresión secuencial y dinámica de los genes *ves*, junto con la recombinación dirigida y la diversidad estructural de las proteínas VESA1, constituyen un sistema altamente eficiente de evasión inmunológica, que permite la persistencia del parásito en el hospedador bovino durante largos periodos, incluso en infecciones asintomáticas (Hakimi *et al.*, 2022; Allred, 2019).

#### **1.1.9.2 Modulación del sistema inmune**

Las fracciones lipídicas compuestas por fosfatidilserina y fosfatidilinositol, junto con ácido fosfatídico, secretadas por los merozoitos de cepas de *B. bovis*, interactúan con el receptor TLR2 de los macrófagos, estimulando la producción de citocinas. Esta interacción activa la respuesta Th1, promoviendo el aumento de TNF- $\alpha$  e IL-6.

Curiosamente, la respuesta Th2 no se ve estimulada, ya que la producción de IL-4 e IL-10 no se incrementa (Giménez et al., 2010).

Otros compuestos relevantes descritos en *B. divergens* son las glicoproteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol, las cuales inducen la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-5, IL-2 e IL-10, sin estimular la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12. Además, provocan una disminución en la expresión del MHC clase II en células presentadoras de antígeno. En modelos animales, se ha observado que estas glicoproteínas aumentan los niveles de fibrinógeno, lo que conlleva a la activación de la tromboplastina, relacionándose así con la modulación de la coagulación (Debierre-Grockiego et al., 2019).

Una proteína que ha adquirido interés recientemente es la Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP), la cual en parásitos Apicomplexa como *P. falciparum* actúa como homóloga del factor liberador de histamina (HRF) del huésped vertebrado. La TCTP presenta la particularidad de ser una proteína detectable en plasma, donde estimula la secreción de IL-8 e histamina en eosinófilos y basófilos, respectivamente (MacDonald et al., 2001). Las características específicas de esta proteína se detallarán a continuación

## **Antecedentes particulares**

### **1.2 Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP).**

La proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), también conocida como p23 o factor liberador de histamina (HRF), fue denominada así por Gross y colaboradores en 1999, al identificarla como una proteína sobre expresada en líneas celulares de carcinoma mamario. Su primera función descrita fue la de actuar como mediador en la liberación de histamina. TCTP ha sido detectada en fluidos biológicos de individuos alérgicos, como lavados broncoalveolares y secreciones nasales, lo que respalda su implicación directa en procesos inflamatorios. Esta proteína activa células inmunológicas clave en la respuesta alérgica, incluyendo basófilos, eosinófilos, linfocitos T y B, y estimula la secreción de citocinas como IL-4, IL-8, GM-CSF e histamina (MacDonald, 2017). La regulación de TCTP está asociada a la vía de señalización PI3K/AKT, modulada negativamente por la fosfatasa SHIP-1. En modelos murinos transgénicos con sobreexpresión pulmonar de TCTP, se ha observado un fenotipo asmático exacerbado, lo que refuerza su potencial como blanco terapéutico en enfermedades alérgicas. Además, la forma extracelular dimérica de TCTP participa activamente en patologías como asma, dermatitis atópica y alergia alimentaria, consolidándose como un mediador clave en la inflamación inmunológica (MacDonald, 2017; Bommer & Kawakami, 2021).

TCTP es una proteína conservada en eucariontes, con funciones tanto intracelulares como extracelulares. La desregulación de esta proteína se asocia con diversos procesos patológicos, debido a su participación en mecanismos clave como la traducción, respuesta al estrés, organización del citoesqueleto, transducción de señales, regulación de proteosomas y nucleosomas, transcripción, interacción con ARN y enzimas metabólicas (Bommer, 2017). La estructura tridimensional de TCTP está considerablemente conservada entre organismos, lo que probablemente determina que sus funciones esenciales se mantengan entre organismos tan diversos como plantas, animales, hongos y parásitos (Ver tabla 3). Lo conservado de la estructura de esta proteína, le confiere la capacidad de interactuar con microtúbulos, factores de elongación, proteínas G y componentes apoptóticos, regulando procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la

inhibición de la muerte programada. Por ello, se ha vinculado su alteración con enfermedades como el cáncer, la diabetes y trastornos cardiovasculares. Además, TCTP puede ser secretada por vías no convencionales y actuar de forma parácrina, como ocurre en su forma dimérica extracelular conocida como HRF (función liberadora de histamina), implicada en procesos inflamatorios y alérgicos (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano, 2017).

Tabla 3: Funciones, características estructurales, ubicación celular y análisis estructural de TCTP de algunas especies.

<i>Especie / Organismo</i>	<b>Funciones</b>	<b>Características estructurales</b>	<b>Ubicación celular</b>	<b>Estructura experimental</b>
<i>Homo sapiens</i>	Regulación de proliferación, inhibición de apoptosis, liberación de histamina (HRF), interacción con p53, Bcl-xL	Estructura tridimensional conservada; forma dimérica activa	Citoplasmática, nuclear y extracelular	Sí
<i>Drosophila melanogaster</i>	Regulación del crecimiento y tamaño celular, interacción con Rheb	Conservación funcional; fosforilación por Plk-1	Citoplasmática y nuclear	No
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Regulación del ciclo celular, regeneración vegetal, guía del tubo polínico	Dos isoformas (AtTCTP1 y AtTCTP2) con diferencias en secuencia	AtTCTP1: citoplasmática; AtTCTP2: nuclear	No
<i>Candida albicans</i>	Secreción vía exosomas, posible supresión de respuesta inmune del hospedero	Presencia en vesículas extracelulares	Citoplasmática y extracelular (exosomas)	No
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Promoción de apoptosis bajo estrés oxidativo, protección de proteínas en gránulos de estrés	Asociación con membrana mitocondrial y gránulos de estrés	Citoplasmática, mitocondrial	Sí
<i>Plasmodium falciparum</i>	Secreción en sangre, inducción de histamina, regulador negativo de células B	Hélice $\alpha$ adicional en región N-terminal	Citoplasmática y extracelular	Sí
<i>Meloidogyne enterolobii</i>	Bloqueo de apoptosis en células vegetales hospedadoras	No caracterizada	Probablemente citoplasmática	No
<i>Nicotiana tabacum / Solanum lycopersicum</i>	Regulación de muerte celular inducida por patógenos, secreción en xilema y tubo polínico	Posible secreción no clásica; localización dual	Citoplasmática, nuclear y en fracciones en pared celular	No
<i>Aspergillus nidulans</i>	Regulación de ramificación y diferenciación sexual	No caracterizada	Citoplasmática o nuclear según fase de crecimiento	No
<i>Madurella mycetomatis</i>	Secreción de TCTP homólogo durante infección	No caracterizada	Extracelular (secreción)	No
<i>Trypanosoma brucei</i>	Modulación de respuesta inmune y parasitemia en modelos murinos	No caracterizada	Citoplasmática y extracelular	No

Tabla tomada y modificada de Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano 2017.

### 1.2.3 Modificaciones Postraduccionales en TCTP

La proteína TCTP presenta diversas modificaciones postraduccionales que modulan su estructura, función y localización celular. Entre las más relevantes se encuentra la fosforilación, que regula su participación en procesos como la proliferación celular, la dinámica del citoesqueleto y la inhibición de la apoptosis.

Uno de los sitios de fosforilación más estudiados es Serina 46 (Ser46), cuya modificación por la quinasa Polo-like kinase 1 (Plk-1) afecta la capacidad de TCTP para estabilizar microtúbulos durante la mitosis. Esta fosforilación reduce su afinidad por el huso mitótico, provocando alteraciones en la división celular (Yarm, 2002; Cucchi *et al.*, 2010). Otra modificación funcionalmente relevante es la formación de dímeros, la forma dimérica extracelular de TCTP, conocida como Histamine-Releasing Factor (por sus siglas en inglés, HRF), es activa en procesos inflamatorios y alérgicos, donde induce la liberación de histamina por células inmunes. Aunque los residuos específicos involucrados en la dimerización no han sido completamente definidos, se ha propuesto que regiones expuestas del bucle flexible (residuos T39–V66) y de las hélices  $\alpha 2$ – $\alpha 3$  participan en su estabilización (Assrir *et al.*, 2017). A nivel estructural, los residuos Aspartato 6 (Asp6) y Aspartato 11 (Asp11) contribuyen a la estabilización del núcleo estructural mediante puentes de hidrógeno con Isoleucina 8, Serina 9 y Asparagina 139, reforzando la arquitectura del pliegue  $\beta$  (Assrir *et al.*, 2017).

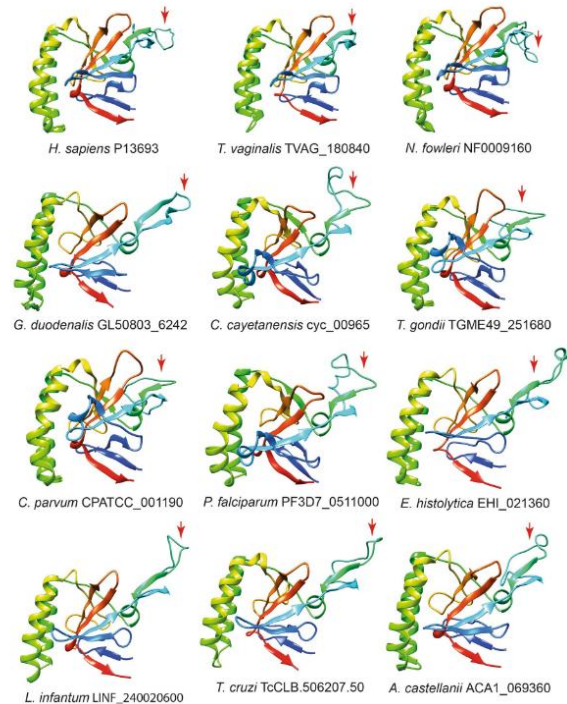
Una de las modificaciones de TCTP más relevantes es la SUMOilación, el cual es un proceso donde adiciona covalentemente una molécula de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) a residuos específicos de lisina, modulando la dinámica funcional de la proteína. Diversos estudios han demostrado que TCTP puede ser SUMOilada en múltiples especies. Por ejemplo, en humanos, se ha identificado al residuo de lisina 164 (K164) como el sitio principal de SUMOilación. La mutación de este residuo impide la conjugación con SUMO-1, lo que compromete la capacidad de TCTP para translocarse al núcleo. Mediante ensayos de inmunoprecipitación y conjugación *in vitro*, se confirmó que la SUMOilación de TCTP depende de la interacción con la enzima conjugadora Ubc9, y que la modificación incrementa su peso molecular de 28 kDa a 42 kDa (Munirathinam & Ramaswamy, 2012).

En el lepidóptero *Bombyx mori*, se ha reportado que TCTP también es SUMOilado en el residuo K164, conservado respecto al humano. La SUMOilación es mediada por la enzima UBC9 y el modificador SMT3. La expresión de una proteína de fusión TCTP-SMT3 estabiliza esta modificación y potencia la actividad antiviral frente a la infección por nucleopoliedrovirus. En contraste, la mutación K164R reduce significativamente la capacidad de TCTP para inhibir la replicación viral y limita su translocación nuclear durante la infección (Lu *et al.*, 2022). En conjunto, estos hallazgos demuestran que la SUMOilación de TCTP en el residuo K164 es una modificación conservada y funcionalmente relevante, que regula su transporte nuclear y potencia su actividad inmunológica y antioxidante en distintos contextos celulares (Munirathinam & Ramaswamy, 2012).

Estas modificaciones postraduccionales anteriormente mencionadas son clave para la versatilidad funcional de TCTP, permitiéndole participar en procesos celulares esenciales y adaptarse a contextos fisiológicos y patológicos diversos.

#### **1.2.4 Estructura de general de TCTP**

La estructura secundaria de TCTP en humanos está compuesta por tres hélices  $\alpha$  y once láminas  $\beta$  organizadas (Assrir *et al.*, 2017; Bommer, 2017). Este plegamiento incluye dos hojas  $\beta$  menores y una hoja  $\beta$  mayor, que en conjunto forman un núcleo hidrofóbico compacto (Acunzo *et al.*, 2014). Las hélices  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  adoptan una conformación de horquilla helicoidal que se posiciona sobre una de las caras de la hoja  $\beta$  principal, contribuyendo a la estabilidad estructural y a la formación de superficies de interacción (Fig. 4).



**Figura 4: Comparación de las estructuras tridimensionales predichas de los ortólogos de TCTP en diversos protozoarios parásitos y la TCTP de humano.**

A pesar de las diferencias en la secuencia primaria entre especies, la figura destaca un alto grado de conservación en la disposición de la secundaria, especialmente de las hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ . Una diferencia notable es el tamaño del bucle flexible, que tiende a ser más largo en los parásitos comparado con el humano, lo cual podría tener implicaciones funcionales en la interacción con el hospedante o en la regulación del sistema inmune del mismo. Imagen tomada de Lagunas-Rangel (2022).

Un elemento distintivo de la arquitectura de TCTP, es el bucle flexible entre las láminas  $\beta_5$  y  $\beta_6$ , compuesto por aproximadamente 30–33 aminoácidos, que presenta alta movilidad conformacional y varía en longitud entre especies. Este bucle es pobremente definido en estructuras cristalinas debido a su flexibilidad, pero se conserva en su posición general dentro del plegamiento (Assrir *et al.*, 2017; Lagunas-Rangel, 2022). La conservación de esta organización secundaria entre ortólogos de TCTP en protozoarios parásitos y humanos sugiere una fuerte presión evolutiva para mantener su arquitectura funcional, a pesar de la divergencia en la secuencia primaria (Lagunas-Rangel, 2022).

## 1.2.5 Funciones intracelulares y extracelulares de TCTP

### 1.2.5.1 Funciones intracelulares

Una de las funciones más comunes de TCTP es su papel como regulador anti apoptótico. Esta proteína interactúa con miembros de la familia Bcl-2, como MCL1 y Bcl-xL, estabilizándolos y previniendo la activación de Bax. Lo que impide la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos como citocromo c (Nagano-Ito & Ichikawa, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Además, TCTP posee un dominio BH3-like que potencia la actividad anti apoptótica de Bcl-xL (Assrir *et al.*, 2017).

TCTP también regula la proliferación celular mediante su asociación con microtúbulos y el huso mitótico. Esta proteína es fosforilada por la quinasa PLK1 en residuos clave (Ser46, Thr65), lo que modula su actividad durante la progresión del ciclo celular (Bommer, 2017; Acunzo *et al.*, 2014). Asimismo, su interacción con factores de elongación de la traducción (eEF1A, eEF1B-β) y su capacidad para inhibir la disociación de GDP refuerzan su papel en la síntesis proteica (Nagano-Ito & Ichikawa, 2012).

En condiciones de estrés, TCTP actúa como proteína chaperona, protegiendo proteínas nativas y desnaturalizadas frente a daños térmicos, oxidativos o por calcio. La capacidad de la proteína de unirse a  $Ca^{2+}$ , le permite mitigar la apoptosis inducida por desequilibrio iónico o estrés del retículo endoplásmico (Nagano-Ito & Ichikawa, 2012; Acunzo *et al.*, 2014). Otro aspecto relevante es la regulación de p53. TCTP promueve la degradación de p53 al unirse a MDM2, interfiriendo con la vía apoptótica dependiente de p53 (Nagano-Ito & Ichikawa, 2012; Bommer & Kawakami, 2021). Finalmente, TCTP ha sido vinculado a la reparación de daño en el ADN, facilitando la translocación nuclear de proteínas implicadas en este proceso y promoviendo la activación de la vía de unión de extremos no homólogos, lo que sugiere un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Acunzo *et al.*, 2014).

En células inmunes, también se han descrito funciones intracelulares específicas de TCTP. En basófilos, se ha observado que su unión estimula la actividad de inositol

5-fosfato e inhibe la actividad de PI3-K, además de inducir la fosforilación de la proteína quinasa Akt, lo que regula la secreción de citocinas. Asimismo, se ha identificado su interacción con el factor de elongación eEF1B- $\beta$ , lo que sugiere un papel adicional en la síntesis proteica (Langdon *et al.*, 2004).

#### **1.2.5.2 Funciones extracelulares**

Además de sus funciones intracelulares, TCTP puede ser secretada por vías no canónicas, como la mediada por TSAP6 y exosomas, lo que le permite tener funciones extracelulares (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano, 2017; Bommer, 2017). En su forma extracelular, se ha descrito que TCTP es capaz de inducir la liberación de histamina, IL-4 e IL-13 en basófilos, así como de activar eosinófilos y células epiteliales bronquiales para la producción de citocinas proinflamatorias (Bommer & Kawakami, 2021; Acunzo *et al.*, 2014).

La función extracelular más destacada de TCTP es su capacidad para modular la respuesta inmune. Aunque inicialmente se pensaba que esta actividad dependía de IgE, actualmente se ha demostrado que TCTP puede inducir la liberación de citocinas de forma independiente de esta inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha reportado la liberación de IL-1 e IL-8 en células B, IL-4 e IL-13 en basófilos, inhibición de IL-2 e IL-13 en células T, y producción de IL-8 en células epiteliales bronquiales. Además, se ha observado que los dímeros de TCTP interactúan con inmunoglobulinas como IgG e IgE (MacDonald, 2012).

En plantas, aunque la secreción de TCTP no es común bajo condiciones normales, se ha detectado en fracciones ricas en pared celular, en el xilema en respuesta a patógenos, y en el secretoma del tubo polínico, lo que sugiere funciones extracelulares en fertilización y defensa (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano, 2017). Asimismo, diversos parásitos como *Plasmodium spp.*, *Trypanosoma brucei* y *Candida albicans* secretan TCTP como estrategia para modular la respuesta inmune del hospedero, lo que refuerza su papel como factor extracelular en contextos patogénicos (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano, 2017; Bommer & Kawakami, 2021).

### 1.2.6 TCTP en parásitos intracelulares

En algunos parásitos apicomplexa como *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma brucei*, se han descrito ortólogos de TCTP, las particularidades de TCTP en estos parásitos será descrita a continuación.

#### 1.2.6.1 TCTP en *T. brucei*

En el parásito protozoario *T. brucei*, el agente causal de la tripanosomiasis humana, la proteína TCTP no solo cumple funciones celulares críticas, sino que también participa en la interacción con el vector hematófago *Glossina*, lo que amplía su relevancia biológica más de su impacto en su fase infectante en el humano, sino también en la transmisión y propagación del parásito.

En *T. brucei*, se han identificado dos parálogos de *TCTP*, denominados *TCTP1* y *TCTP2*, dispuestos en tándem en el cromosoma 8. Ambos comparten una región 5'UTR idéntica y presentan diferencias en su marco de lectura, dando como resultado cambios en 5 residuos de aminoácidos, por otra parte, las regiones 3'UTR difieren en longitud, junto con su expresión diferencial durante el ciclo de vida del parásito. Por ejemplo, *TCTP1* se expresa exclusivamente en la forma procíclica (PCF), mientras que *TCTP2* predomina en la forma sanguínea (BSF) (Jojic *et al.*, 2018). Esta regulación postranscripcional está mediada por elementos *cis* en las 3'UTR, como se demostró mediante ensayos de estabilidad del ARNm y construcciones quiméricas con genes reporteros. En particular, los primeros 160 nucleótidos de la 3'UTR de *TCTP2* son suficientes para conferir estabilidad específica en la fase procíclica, incluso en el contexto de la 3'UTR de *TCTP1*, lo que evidencia un mecanismo de control fino y ciclo-específico (Jojic *et al.*, 2018).

La localización subcelular de TCTP en ambas formas del parásito es predominantemente citoplasmática, aunque también se ha observado en el núcleo. Esta distribución se mantiene constante durante el desarrollo del ciclo celular y corresponde con lo reportado en otros organismos. Adicionalmente, el silenciamiento de *TCTP1* en PCF mediante ARNi conduce a un fenotipo de crecimiento lento, acompañado de alteraciones morfológicas celulares (morfología de renacuajo), acumulaciones mitocondriales y cambios en los acidocalcisomas, los

cuales aumentan en tamaño y disminuyen en número. Estos efectos sugieren que TCTP participa en la regulación de la morfogénesis celular y en el mantenimiento de la homeostasis de los organelos, posiblemente a través de su capacidad de unión a calcio (Jojic *et al.*, 2018).

En contraste, el silenciamiento de *TCTP2* en BSF provoca la interrupción de la progresión del ciclo celular, indicando un bloqueo en la citocinesis. A diferencia de PCF, no se observaron alteraciones morfológicas evidentes ni cambios en la estructura mitocondrial o en los acidocalcisomas. Sin embargo, en células BSF expuestas a estrés térmico, el silenciamiento de *TCTP2* redujo su recuperación post-exposición a 42 °C, lo que sugiere un papel específico de TCTP en la respuesta al estrés en esta etapa del ciclo. Este efecto no se observó en PCF, lo que refuerza la idea de funciones diferenciadas entre los parálogos según el estadio del parásito (Jojic *et al.*, 2018).

Por otra parte, TCTP también ha sido implicada en la interacción entre el parásito y su vector. Bossard *et al.* (2017) caracterizaron la proteína recombinante *rTbgTCTP* de *T. brucei* y demostraron su capacidad para unirse específicamente a bacterias que componen a la microbiota del intestino medio de *Glossina*. De un total de 39 cepas bacterianas analizadas, 24 mostraron interacción positiva con *rTbgTCTP*, y en 14 de ellas se observó un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano, especialmente bajo condiciones de anaerobiosis. En algunos casos, la presencia de *rTbgTCTP* inhibió drásticamente el crecimiento bacteriano (Bossard *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que TCTP secretada por el parásito podría modular la composición del microbiota intestinal del vector, favoreciendo un entorno más propicio para la supervivencia y transmisión.

En conjunto, los estudios realizados en *T. brucei* revelan que TCTP es una proteína multifuncional cuya expresión está finamente regulada según el estadio del ciclo de vida. Su implicación en procesos celulares críticos como la citocinesis, la morfogénesis, la homeostasis de los organelos y la respuesta al estrés, así como su potencial papel en la modulación del microbioma del vector, subrayan su relevancia biológica y su potencial como blanco para estrategias de control.

### **1.2.6.2 TCTP en *T. gondii***

En *T. gondii* TCTP desempeña un papel crucial en el crecimiento rápido y el mantenimiento del desarrollo intracelular del parásito. La expresión del gen que codifica para la proteína es significativamente mayor en la cepa RH (cepa virulenta) en comparación con cepas atenuadas. La delección de *TgTCTP* mediante CRISPR/Cas9 provoca una disminución en la capacidad de invasión, adhesión y replicación, así como una salida prematura de la célula del hospedante, lo que evidencia su importancia funcional en la progresión del ciclo de vida y en la virulencia. Además, un análisis transcriptómico reveló que la delección de *TgTCTP* altera la expresión otros genes del parásito, lo que sugiere que esta proteína podría participar en redes de regulación postraduccional, estabilización de ARN mensajeros o interacción con factores de transcripción. La localización citoplasmática constante de *TgTCTP* y su capacidad de formar multímeros facilitan la adaptación del parásito al ambiente intracelular (Zheng *et al.*, 2018)

### **1.2.6.3 TCTP en *Dictyostelium discoideum***

En *D. discoideum*, la proteína TCTP tiene funciones esenciales en la homeostasis y plasticidad celular. TCTP en este sistema ha sido implicada en la regulación del crecimiento, la morfología celular y la estructuración del citoesqueleto (organización de microtúbulos). El silenciamiento de *TCTP* mediante ARNi regula negativamente la proliferación celular, altera la morfología y compromete la capacidad del organismo para responder ante condiciones de estrés, como la privación de nutrientes. Además, TCTP parece participar en la transición entre estados unicelulares y multicelulares, lo que sugiere un papel clave en la coordinación de señales de desarrollo. La estructura y localización citoplasmática de esta proteína, esta conservada respecto a lo reportado en otros organismos. Estos hallazgos posicionan a TCTP como indispensable para *D. discoideum* (Kumar *et al.*, 2020).

#### 1.2.6.4 TCTP en *P. falciparum*.

Los estudios publicados sobre la proteína TCTP de *P. falciparum* posicionan a *PfTCTP* como un blanco terapéutico contra la malaria, debido a las múltiples funciones descritas como moduladoras de la respuesta inmunitaria del hospedador. Asimismo, se ha identificado que la proteína TCTP de *P. falciparum* es un homólogo funcional del factor liberador de histamina (HRF) de humanos, con un 54 % de similitud de secuencia con la HRF humana (MacDonald et al., 2001). Por otra parte, de manera interesante, *PfTCTP* ha sido detectada en el plasma de voluntarios humanos con infecciones leves y en niños de Malawi con malaria severa, en contraste con pacientes control no infectados. Funcionalmente, en estudios *in vitro*, la proteína recombinante *PfTCTP* ha demostrado tener la capacidad de estimular la liberación de histamina por basófilos y la secreción de interleucina-8 (IL-8) por eosinófilos del hospedante humano, replicando así la actividad biológica de la HRF, lo que sugiere que la *PfTCTP* secretada por el parásito puede contribuir a las respuestas alérgicas e inflamatorias que normalmente son inducidas por la TCTP del hospedante (MacDonald et al., 2001).

En otro estudio realizado por Pelleau y colaboradores (2012), se reportó la presencia de *PfTCTP* en el suero de pacientes infectados con malaria grave. De igual forma, los pacientes *PfTCTP*-positivos manifestaron una reactividad basofílica significativamente mayor *ex vivo*. Adicionalmente, la ausencia de anticuerpos IgG anti-*PfTCTP* en pacientes con malaria grave se asoció con las respuestas más elevadas de los basófilos, lo cual refuerza la hipótesis de un papel patogénico de la *PfTCTP*, en el establecimiento de la infección al promover un mecanismo de tipo alérgico que contribuye a la gravedad de la enfermedad (Pelleau et al., 2012).

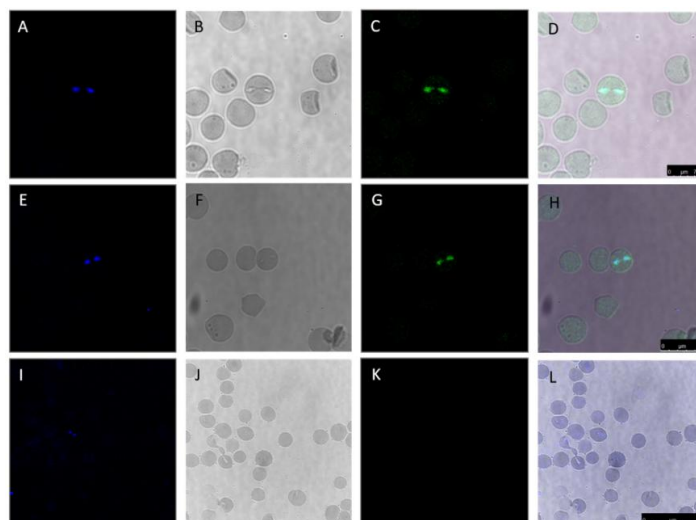
También se ha documentado la modulación de células del sistema inmune adaptativo por *P. falciparum*. Calderón-Pérez y colaboradores (2014) reportaron que la proteína recombinante *PfTCTP* se incorpora a los linfocitos B de manera más eficiente y rápida que su homólogo humano. A pesar de esta mayor internalización, la *PfTCTP* mostró un efecto proliferativo menor sobre las células B en comparación con la proteína humana. Este mecanismo de mimetismo molecular sugiere una posible vía por la cual la *PfTCTP* podría interferir de forma selectiva con la respuesta

inmune del hospedante, regulando negativamente la proliferación de linfocitos B y favoreciendo así el establecimiento de la infección (Calderón-Pérez *et al.*, 2014).

Debido a las funciones de la TCTP de *P. falciparum* anteriormente mencionadas, se ha propuesto como un candidato vacunal. En estudios de desafío experimental, se ha observado que la inmunización de ratones con *PfTCTP* retrasa el establecimiento de la infección por Plasmodium (Taylor *et al.*, 2014). Este hallazgo refuerza la hipótesis de que la TCTP desempeña un papel importante en el establecimiento o mantenimiento de la parasitemia, consolidándola como un blanco potencial para futuras intervenciones

#### **1.2.6.5 TCTP en *B. bovis***

En *B. bovis* recientemente se identificó a TCTP como un antígeno altamente conservado con implicaciones relevantes en el establecimiento de la infección aguda y en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedante. El gen *tctp* fue identificado en el genoma de *B. bovis* mediante análisis de homología con la secuencia de *P. falciparum*, y se confirmó su conservación en múltiples aislados de la misma especie de *B. bovis* y en la cepa de referencia T2Bo. La proteína *BboTCTP* presenta una estructura terciaria similar a la de TCTP de *P. falciparum*, incluyendo una hélice alfa extra, característica de las TCTP de los apicomplexa, que podría conferirle mayor afinidad con los receptores celulares del hospedante. También se hipotetiza que puede interactuar con proteínas G y regular la proliferación celular como es el caso de *P. falciparum* (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano 2017). Asimismo, se ha reportado la expresión *BboTCTP* en los estadios intraeritrocíticos mediante Western blot y microscopía confocal (Figura 5), lo que sugiere un papel activo durante la fase aguda de la infección y la invasión al eritrocito.



**Figura 5: Expresión de TCTP en merozoítos de *B. bovis*.** Eritrocitos infectados cultivados *in vitro*, incubados con antisueros específicos generados en conejos inmunizados con péptidos de *BboTCTP*. La señal de fluorescencia verde (Alexa-488) indica la presencia de TCTP en el citoplasma de los merozoítos, mientras que la tinción con Hoechst 33342 permite visualizar el núcleo del parásito. El control negativo, correspondiente a eritrocitos tratados con suero de conejo inmunizado solo con PBS y adyuvante, no mostró señal específica, confirmando la especificidad de los anticuerpos. Análisis realizado por microscopía confocal. Imagen tomada de Pérez-Almeida *et al.*, 2025.

Por otra parte, se ha evaluado el potencial inmunogénico de esta proteína mediante el diseño de péptidos sintéticos con epítomos B derivados de *BboTCTP*, los cuales fueron utilizados para inmunizar bovinos. Los animales inmunizados e infectados mostraron signos clínicos más leves y una recuperación más rápida tras el desafío con una cepa virulenta de *B. bovis*, en comparación con el grupo control. Además, los sueros postinmunización inhibieron significativamente la invasión eritrocitaria *in vitro*, lo que indica que los anticuerpos generados contra *BboTCTP* poseen capacidad neutralizante. Estos hallazgos sugieren que *BboTCTP* podría interferir con la proliferación de linfocitos B, afectando la generación de células B de memoria y la producción de anticuerpos, lo cual se refleja en los niveles más bajos de IgG total observados en animales no inmunizados tras el desafío. En conjunto, estos resultados posicionan a *BboTCTP* como un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra la babesiosis bovina y como un modelo para estudiar los mecanismos de evasión inmunitaria en apicomplexos (Pérez-Almeida *et al.*, 2025)

#### **1.2.6.6 TCTP en *B. bigemina***

En *B. bigemina*, se ha encontrado que el gen *tctp* se expresa durante la fase intraeritrocítica del parásito *in vitro*, confirmándose la transcripción de *tctp* por RT-PCR. Adicionalmente se han diseñado y sintetizado péptidos de TCTP, con epítomos B conservados, cuya inmunización en conejos y bovinos indujo la producción de anticuerpos específicos detectados por ELISA e inmunofluorescencia. Estos anticuerpos reconocieron la proteína nativa de *B. bigemina* y mostraron reacción cruzada con TCTP de *B. bovis*, además de reducir significativamente la invasión eritrocitaria en ensayos de neutralización en cultivo *in vitro*. Estos resultados sugieren que TCTP podría participar en la evasión inmunitaria y posicionarse como un candidato vacunal prometedor contra la babesiosis bovina (González, V. G. D. L. C. 2023).

### **Justificación:**

La babesiosis bovina es un ejemplo destacado de enfermedades transmitidas por garrapatas del género *Rhipicephalus*. Esta enfermedad es causada por protozoarios del género *Babesia* la cual prevalece en lugares con climas tropicales y subtropicales, generando pérdidas económicas a la industria ganadera. En México se estima que el 75 % del ganado vacuno está expuesto a la infestación por garrapatas y a las enfermedades transmitidas por este vector como la infección por *B. bigemina* (Rodríguez-Vivas et al., 2006).

En parásitos Apicomplexa como *P. falciparum*, la proteína TCTP modula la secreción de citocinas e histamina mediante la interacción con células del sistema inmune como eosinófilos y basófilos, lo que facilita la diseminación del parásito en el hospedador. El uso de TCTP de *P. falciparum* como candidato vacunal demostró la reducción del porcentaje de parasitemia en estudios realizados en ratones (Taylor et al., 2015). El estudio de las moléculas implicadas en la infección de *B. bigemina* a los eritrocitos (esporozoitos y merozoitos) genera información sobre la interacción del patógeno con el hospedador. TCTP es una proteína con múltiples funciones que se expresa en merozoitos, pero se desconoce si se expresa en esporozoitos y si en ambos estadios se expresa diferencialmente. Tampoco se sabe si *BbTCTP* se relocaliza en eritrocitos de los bovinos durante la enfermedad aguda, favoreciendo el establecimiento de la infección. Este proyecto se enfocó en determinar si *Bbitctp* se expresa en esporozoitos y si existe una expresión diferencial de *Bbitctp* en merozoitos y esporozoitos de *B. bigemina*. Finalmente, también se determinó la inmunolocalización de *BbTCTP* de *B. bigemina* en eritrocitos infectados con merozoitos tanto *in vivo* como *in vitro*.

## Hipótesis

TCTP se expresa diferencialmente en las fases infectantes de *B. bigemina*.

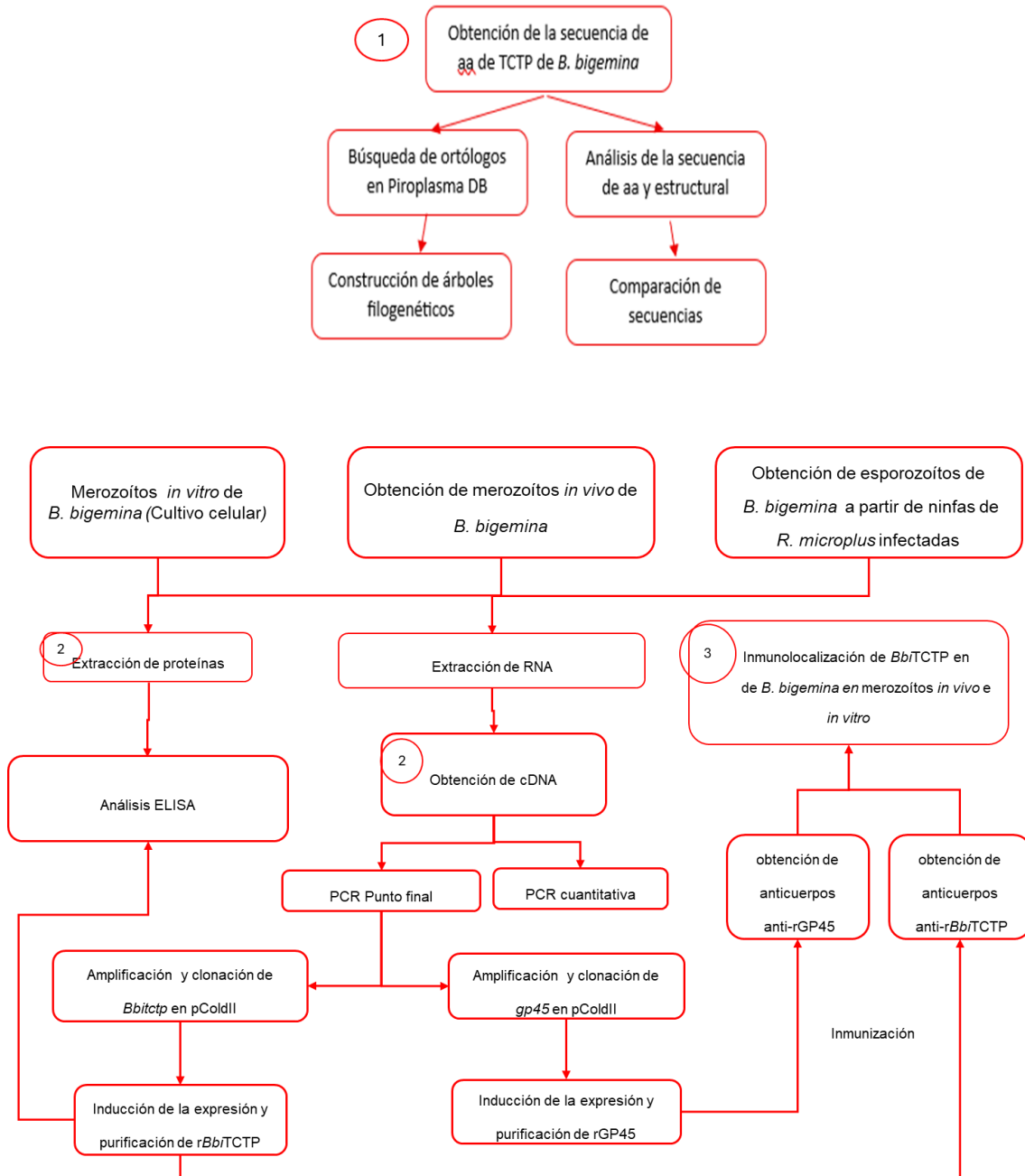
## **Objetivo general**

Caracterización de la expresión y localización de *Bb*TCTP en fases infectantes de *B. bigemina*

### **Objetivos particulares:**

1. Caracterizar molecularmente a *Bb*TCTP de *B. bigemina in silico*
2. Analizar la expresión de *Bbitctp* y la abundancia de *Bb*TCTP en fases infectantes de *B. bigemina*
3. Estudiar la inmunolocalización de *Bb*TCTP en merozoitos de *B. bigemina in vitro e in vivo*

## Estrategia experimental General



## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Análisis *in silico* de la proteína *BbTCTP*

La secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen *tctp* fue traducida a aminoácidos utilizando la herramienta ExPASy. La estructura secundaria de TCTP de *B. bigemina* se analizó mediante el programa Phyre2

(<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

La predicción de la estructura tridimensional de TCTP se realizó en la plataforma Google Colab, mediante “ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseqs2”, tomando como referencia la estructura cristalina de *P. falciparum* (PDB: 3P3K). (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)

La identificación de los residuos de aminoácidos conservados de TCTP se determinó mediante un alineamiento múltiple usando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), con las secuencias de TCTP de otros organismos apicomplexas (*B. ovis*: A0A9W5TDE9\_BABOV, *B. ovata*: UP000236319, *B. bovis*: A7AQL5\_BABBO, *B. duncani*: A0AAD9PLV4\_9APIC, *T. annulata*: A0A3B0MXD7, *B. microti*: I7I8M0\_BABMR, *P. falciparum*: TCTP\_PLAF7, *P. yoelii*: TCTP\_PLAYO, *P. knowlesi*: TCTP\_PLAKN, *C. hominis*: A0A0S4TFB6 y *B. Taurus*: TCTP\_BOVIN).

El análisis filogenético de TCTP en parásitos del filo Apicomplexa se llevó a cabo mediante la descarga de secuencias ortólogas desde la base de datos PiroplasmaDB <https://piroplasmadb.org/piro/app/> (tabla suplementaria 1). Las secuencias fueron analizadas mediante un alineamiento múltiple utilizando Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). La construcción de árboles filogenéticos se realizó en MEGA, empleando el método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 500 réplicas (<https://www.megasoftware.net/>). Finalmente, el árbol filogenético resultante fue visualizado y editado en FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 2.2 Obtención de merozoitos *in vivo* y esporozoitos

Para la obtención de las muestras se infestó un bovino con 5 g de larvas de *R. microplus*, al día 14 post infestación se infectó al bovino con un vial de 4 ml de eritrocitos infectados con *B. bigemina*  $1 \times 10^8$ , el avance de la infección por *B. bigemina* se monitoreo contando el porcentaje de parasitemia mediante tinción con colorante Giemsa, al día 8 post infección se colecto sangre del bobino infectado con *B. bigemina* con un porcentaje de parasitemia del 0.4%. Al día 21 post infestación se recolectaron las garrapatas repletas, para corroborar que las garrapatas estuvieran infectadas, se les tomó muestra se hemolinfa la cual se tiño con colorante de Giemsa en frotis, las garrapatas que resultaron infectadas con *B. bigemina* se incubaron a 28° C con 5 % de humedad, hasta que ovopositaron, los huevos de garrapatas infectadas se aislaron e incubaron con las mismas condiciones hasta que eclosionaron a ninfas, las cuales fueron utilizadas para infestar a otro bovino sano, al día 12 post infestación se colectaron las ninfas de *R. microplus* infectadas con *B. bigemina* a partir de las cuales se extrajeron los esporozoítos.

## 2.3 Obtención de merozoitos *in vitro*

El cultivo celular se mantuvo siguiendo el protocolo de Hernández-Arvizu y colaboradores 2024. En cual consistió en lo siguiente: las muestras de sangre de un bovino no infectado se centrifugaron a 3500 rpm por 15 min a 4°C para retirar el suero el cual se almaceno a -80° C, a los eritrocitos se les agregó un volumen de 1:1 de solución VyM y se lavaron 5 veces centrifugando a 3500 rpm por 15 min a 4°C, posteriormente a los eritrocitos se les agregó solución VyM y se almacenaron a 4° C hasta su uso. Para el establecimiento del cultivo, bajo estrictas condiciones de esterilidad *B. bigemina* fue mantenida *in vitro* en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Para el cultivo, se utilizaron 100 µl (10%, v/v) de eritrocitos infectado, los cuales se mezclaron con 1000 µl de medio M199 suplementado con 40% de suero bovino y una solución antibiótica-antimicótica. Las muestras se incubaron en placas de cultivo de 24 pozos a 37 °C con 4.7% de CO<sub>2</sub>. Diariamente se reemplazaron 800 µl del medio M199, y se realizaron subcultivos cuando el porcentaje de eritrocitos infectados superó el 3%. El crecimiento del parásito fue monitoreado constantemente para determinar el

porcentaje óptimo de eritrocitos infectados necesario para los ensayos antimicrobianos.

#### **2.4. Extracción de ARN y obtención de cADN**

Los niveles de expresión del gen *tctp* de *B. bigemina* fueron determinados mediante RT-qPCR, para lo cual se realizó la extracción de ARN siguiendo el protocolo descrito a continuación: Previo a la extracción, los eritrocitos fueron lavados con PBS (pH 7.4) mediante centrifugación a 2,500 g durante 5 min, decantando el sobrenadante en cada ciclo hasta que este presentó un color traslúcido. Posteriormente, se añadieron 900 µl de Tri Reagent™ por cada 100 µl de eritrocitos; las muestras fueron homogeneizadas en vórtex y almacenadas a -80 °C hasta su uso. Para la fase de separación, se agregaron 200 µl de cloroformo a cada muestra, se homogeneizaron durante 15 s y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 15 min, y el sobrenadante que contenía el ARN fue transferido a tubos limpios.

La precipitación del ARN se realizó añadiendo 500 µl de isopropanol a cada muestra, las cuales se incubaron a 4 °C durante toda la noche y posteriormente se centrifugaron a 12,000 g por 15 min a 4 °C. El pellet obtenido fue lavado tres veces con etanol al 75 % (grado biología molecular) mediante centrifugación a 8,800 g durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el sobrenadante, el pellet se dejó secar durante 60 min y se resuspendió en agua grado biología molecular. Cuando las muestras de ARN fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y cuantificadas en nanodrop, se trataron con DNasa libre de ARNsa (RQ1 DNase) (Promega Biotech, EUA), para esto se preparó la reacción de digestión con DNasa mezclando entre 1 y 8 µl de ARN, 1 µl de tampón de reacción 10X libre de ARNsa (RQ1), y 1 unidad de DNasa libre de ARNsa (RQ1) por cada microgramo de ARN. Se ajustó el volumen final a 10 µl con agua libre de nucleasas. Luego, la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Para detener la reacción, se añadió 1 µl de la solución de detención de DNasa (RQ1) y se incubó a 65 °C durante 10 min para inactivar la enzima.

Para la obtención de cDNA se utilizó el ARN tratado anteriormente en la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando el kit “USB corporation cat 78355, Two step RT-PCR Kit 50 RT reactions, 100 PCR reactions”. Se aplicó un protocolo estándar que incluyó una reacción de RT seguida de una reacción de PCR en punto final. La mezcla inicial se preparó en un volumen total de 10  $\mu$ l, combinando 100 ng de ARN, 1  $\mu$ l de primer reverso específico del gen (a una concentración de 10  $\mu$ M) y agua libre de ARNsas. Esta mezcla fue homogeneizada en vórtex y centrifugada suavemente. Posteriormente, se incubó a 75 °C durante 5 min y se transfirió inmediatamente a hielo por otros 5 min.

La mezcla de RT se completó hasta un volumen final de 25  $\mu$ l, añadiendo 6.75  $\mu$ l de agua libre de ARNsas, 5  $\mu$ l de tampón RT 5X, 1.25  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos (10 mM), 1  $\mu$ l de inhibidor de ARNasa (4 U/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa M-MLV (25X). Para cada reacción, tanto para *tctp* como para *gapdh*, se incluyeron sus respectivos controles negativos de transcripción reversa (RT-).

La mezcla final fue homogeneizada nuevamente por vórtex y centrifugada brevemente para reunir el contenido en el fondo del tubo. La reacción se incubó a 42 °C durante 30 min, seguida de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min. Posteriormente las muestras de cDNA se almacenaron a -20° hasta su uso.

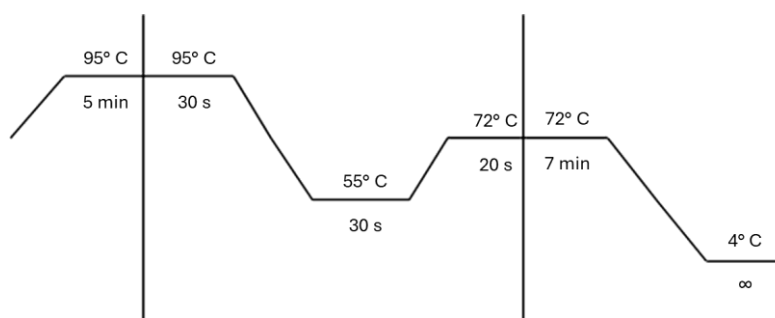
## **2.5. Cuantificación de *Bbitctp* por qPCR**

Con el cDNA previamente sintetizado, se cuantificaron los niveles de expresión del gen *tctp* mediante qPCR cuantitativo. Para ello, se diseñó un par de oligonucleótidos con base en las secuencias del gen *Bbitctp* de *B. bigemina* (ID: 24564412) y del gen *gapdh* (LK391708). Dichos oligonucleótidos fueron empleados, por una parte, para la construcción de una curva estándar con concentraciones conocidas del número de copias de cada gen, y por otra, para el análisis de los niveles de expresión de *tctp* en las fases infectantes del parásito.

**Tabla 4: Set de oligos de *Bbitctp* y *gapdh* utilizados en tiempo real**

	Secuencia	Longitud (pb)	GC (%)	TM
<b><i>Bbitctp</i> forward</b>	AGAACTTCGTCAAGCACGTC	20	50	55
<b><i>Bbitctp</i> reverse</b>	GTCCTTGATGTAGACAAGCC	20 Amplicón de: 140	50.0	55
<b><i>gapdh</i> forward</b>	GTATTGGCCGTCTGGTTCTC	20	55	55
<b><i>gapdh</i> reverse</b>	AGGTACTCCATGTAGTCAGAGG	22 Amplicón de: 100	50.0	55

Para ambos pares de primers se utilizaron con las siguientes condiciones de PCR en punto final:



Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, y la longitud de los amplicones y la concentración del número de copias para cada gen se estimó por comparación con un marcador de talla molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Promega cat: G2101). Una vez obtenido el gel se cuantificó el número de píxeles de cada amplicón respecto al marcador de talla molecular.

Tabla 5: Cuantificación de los amplicones de *Bbitctp* y *gapdh* por densitometría

	# total de pixeles	Value int
<b>Ladder</b>	5136	11389.9
<b><i>Bbitctp</i></b>	5136	15778.8
<b><i>gapdh</i></b>	5136	11905

Cuantificación de pixeles para *Bbitctp*

$$\frac{(5136 * 15778.8)}{11389.9} = 7115.06$$

Concentración de *Bbitctp* respecto al marcador de talla molecular que tenía una concentración de 0.26 ng/ul.

$$\frac{(0.26 \text{ ng/ul} * 7115.06)}{5136} = 0.36 \text{ ng}$$

Estimación del número de copias para *Bbitctp*

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad de ADN} \times \text{Constante de Avogadro}}{\text{Longitud del ADN} \times \text{Factor de conversión} \times \text{Masa promedio de 1 pb de dsADN}}$$

Cantidad de ADN → Constante de Avogadro  
Longitud del ADN → Factor de conversión → Masa promedio de 1 pb de dsADN

$$\# \text{ de copias de } Bbitctp = \frac{(0.36 \text{ ng} * 6.022 \times 10^{23})}{(140 * 1 \times 10^9 * 660)} = 2.3 \times 10^9$$

Cuantificación de pixeles para *gapdh*

$$\frac{(5136 * 11905)}{11389.9} = 5368.69$$

Concentración de *gapdh* respecto al marcador de talla molecular que tenía una concentración de 0.26 ng/ul.

$$\frac{(0.26 \text{ ng/ul} * 5368.69)}{5136} = 0.27 \text{ ng}$$

Estimación del número de copias para *Bbitctp*

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad de ADN} \times \text{Constante de Avogadro}}{\text{Longitud del ADN} \times \text{Factor de conversión} \times \text{Masa promedio de 1 pb de dsADN}}$$

$$= \frac{\text{Amount (ng)} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Length (bp)} \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

$$\# \text{ de copias de } Bbitctp = \frac{(0.27ng * 6.022 \times 10^{23})}{(100 * 1 \times 10^9 * 660)} = 2.4 \times 10^9$$

Los productos de PCR obtenidos se emplearon para la construcción de curvas estándar correspondientes a los genes *Bbitctp* y *gapdh*, abarcando concentraciones desde  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^4$  copias/ $\mu$ l; *gapdh* fue utilizado como gen endógeno de referencia. Para el análisis cuantitativo del número de copias de *Bbitctp* mediante PCR en tiempo real (qPCR), se obtuvieron muestras de ARN correspondientes a las fases infectantes de *B. bigemina*, a partir de las cuales se generó cDNA. Este cDNA fue utilizado para evaluar los niveles de expresión del gen *Bbitctp* mediante SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), utilizando el equipo Rotor-Gene Q, con las mismas condiciones de PCR anteriormente descritas. Los datos obtenidos fueron normalizados con base en las curvas estándar previamente construidas para ambos genes, y analizados mediante el método  $\Delta$ Ct. Finalmente, los resultados fueron sometidos a análisis estadístico utilizando ANOVA de una vía (One-way ANOVA) y se les aplicó la prueba pos hoc tukey en el programa GraphPad Prism 8.

## 2.6 Extracción de proteínas totales de las fases infectantes de *B. bigemina*

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de ninfas infectadas y eritrocitos infectados de un cultivo *in vitro* y de sangre proveniente de un bovino infectado, con un 3 % de parasitemia confirmada, para la obtención de los extractos proteicos, las muestras fueron transferidas a tubos de 50 ml y centrifugadas a  $2,500 \times g$  durante 15 min. Posteriormente, se realizaron varios lavados con 10 a 20 ml de PBS pH 7.4 frío, suplementado con inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free, cat: 11873580001), asegurando la completa resuspensión del pellet en cada paso, hasta que el sobrenadante se observó translucido. El pellet obtenido se

congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Una vez descongelado sobre hielo, se lavó nuevamente en PBS 1X frío con inhibidor de proteasas, repitiendo el proceso de centrifugación a  $1860 \times g$  durante 15 min por 3 a 4 ciclos, hasta obtener un pellet rosado o blanquecino.

El pellet final, correspondiente a cada una de las fases infectantes parasitarias, se resuspendieron en un volumen adecuado de buffer de lisis 2X, también suplementado con inhibidor de proteasas (entre 100 y 400  $\mu\text{l}$ , de acuerdo al tamaño del pellet). Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  toda la noche y posteriormente se sonicaron 3 min (80% amplitud, 30 s de pulso, 30 s de pausa), manteniéndolas sobre hielo entre cada ciclo para evitar el sobrecalentamiento. Finalmente, se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para el análisis de la integridad de los extractos proteicos, se mezclaron con buffer de carga 6X, de cada muestra se preparó un volumen de 20  $\mu\text{l}$  en total, se hirvieron durante 5 min y sonicaron durante 3 min (60% amplitud, 30 s de pulso, 30 s de pausa), posteriormente se centrifugaron a  $12,000 \times g$  por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , de cada muestra se tomaron 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se corrieron en un gel desnaturizante al 10% de acrilamida/bisacrilamida. Por último, el gel fue teñido con azul de Coomassie r-250 en agitación durante 30 min, y se lavó con solución desteñidora 3 veces en agitación durante 30 min.

## **2.7 Concentración y cambio de buffers de los extractos proteicos**

La concentración y cambio de buffer se realizó utilizando el kit "ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit" (Biorad, cat: #163-2130) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, brevemente, los extractos proteicos obtenidos de fases infectantes fueron transferidos a microtubos de 1.5 ml, asegurando una concentración de 300  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . A cada muestra se le añadieron 300  $\mu\text{l}$  del agente precipitante 1, mezclando en vórtex y manteniéndolas en hielo durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 300  $\mu\text{l}$  del agente precipitante 2, mezclando nuevamente por vórtex. Las muestras se centrifugaron a  $12,000 \times g$  durante 5 min. Una vez formado el pellet, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante sin tocar el pellet, y se realizó una segunda centrifugación breve (15–30 s) para recuperar cualquier líquido residual, el cual también fue retirado.

Sobre el pellet se añadieron 40  $\mu$ l del reactivo de lavado 1, seguido de una centrifugación a velocidad máxima durante 5 min. El sobrenadante fue descartado, y se añadieron 25  $\mu$ l de agua grado proteómico, resuspendiendo el pellet en vórtex durante 10–20 s. Posteriormente, se agregó 1 ml del reactivo de lavado 2 (preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos una hora) y 5  $\mu$ l del aditivo 1, mezclando por vórtex durante 1 minuto. Las muestras se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 60 min, agitando por vórtex cada 15 min durante 30 s. Finalizada la incubación, se centrifugaron nuevamente a velocidad máxima durante 5 min para formar un pellet compacto, eliminando el sobrenadante y cualquier residuo mediante una centrifugación adicional breve. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente por no más de 5 min, hasta observar una apariencia translúcida. Cada pellet fue resuspendido en un volumen adecuado de PBS 1x con inhibidor de proteasas y se mezcló por vórtex hasta disolver completamente el pellet. Si el pellet permanecía compacto se procedió a sonicar la muestra por 3 min (60% amplitud, 30 s de pulso, 30 s de pausa). La integridad de las muestras de proteínas se analizó por Electroforesis SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 12 % y se tiñó con azul de Coomassie r-250 y se destiñó como se mencionó en el apartado anterior.

## **2.8 Cuantificación por el método de Bradford**

Para la cuantificación de proteínas de las muestras se utilizó el método de Bradford M. M. (1976), construyendo una curva estándar construida a partir de cinco diluciones seriadas de albúmina bovina (BSA, sigma aldrich) en PBS, con concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ; PBS se empleó como blanco. Se cargaron 160  $\mu$ l de cada punto y de cada muestra en una placa de 96 pozos, por triplicado, después se adicionaron 40  $\mu$ l de reactivo concentrado Dye Reagent (Bio-Rad). Las mezclas se agitaron suavemente y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMGLABTECH).

Las proteínas recombinantes *rBbTCTP* y *rGP45*, previamente purificadas y dializadas, fueron cuantificadas de igual manera por el método de Bradford, con los siguientes puntos de la curva estándar de BSA: 8, 4, 2, 1 y 0.5 mg/ml y de cada muestra se dispensaron 20  $\mu$ l y 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford 1x.

## 2.9. Detección de *Bb*TCTP por Western Blot

Antes de proceder a la cuantificación de la proteína *Bb*TCTP en las fases infectantes de *B. bigemina* por ELISA, se verificó mediante Western blot la especificidad de los anticuerpos de conejo anti-péptidos de *Bb*TCTP, proporcionados por el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se confirmó que dichos anticuerpos reconocen tanto la proteína nativa como la proteína recombinante *rBb*TCTP (obtenida como parte del objetivo 3 de este proyecto). Para ello, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa las proteínas obtenidas de una muestra de sangre de bovino con 3 % de parasitemia, junto con 80 µg/ml de proteína recombinante *rBb*TCTP. Las muestras fueron previamente separadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, EUA) a 100 V en frío durante 1 hora. Las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a 37 °C con TBS-T con leche al 5 %. Se realizó un lavado TBS-T con leche al 0.1 %, y se incubaron los anticuerpos primarios de sueros preinmunes e inmunes con anti-TCTP en una dilución 1:3000 en TBS-T con leche al 1 %, durante toda la noche a 4 °C con 120 rpm. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T con leche al 0.1 %, en agitación durante 10 min. Finalmente, se incubaron los anticuerpos secundarios en una dilución 1:3000 durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente, se realizaron cinco lavados adicionales con TBS-T y se revelaron mediante el sustrato ECL (Bio-Rad, EUA). La visualización de las bandas se llevó a cabo utilizando el fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, EUA). Una vez comprobado que los anticuerpos reconocían específicamente a la proteína se procedió a la cuantificación por ELISA.

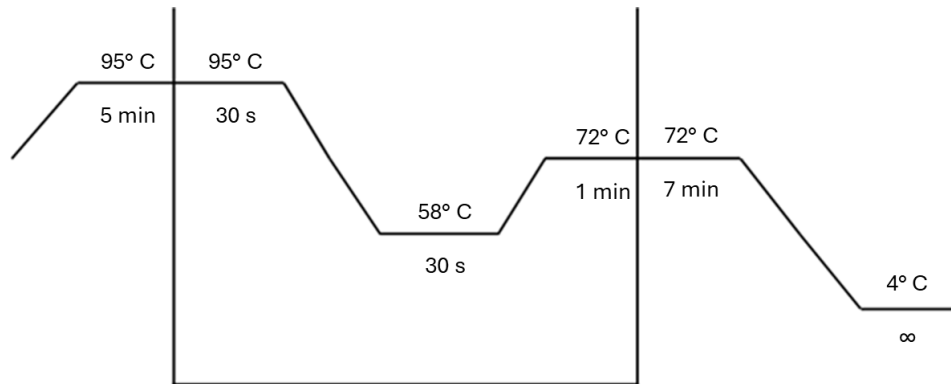
## 2.10 Clonación del gen *Bbitctp* y *gp45* en el vector de expresión y análisis de las clonas.

El gen *Bbitctp* de *B. bigemina* fue clonado en el plásmido pColdII, a partir de cDNA obtenido como se describió anteriormente, utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido que incluían sitios de restricción (*Bam*HI y *Hind*III respectivamente):

*B.big\_tctp\_Bam*HI\_F: GGATCCATGCTTGTCTACAAGGATCT

*B.big\_tctp\_HindIII\_R*: GAATTCTCAGTAGCGCTCCTCCGTCAA

Con las siguientes condiciones de PCR:



Tanto el plásmido como los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1 % para verificar su integridad. Posteriormente, se sometieron a digestión enzimática con *Bam*HI y *Hind*III durante 3 horas a 37 °C en baño María. El plásmido fue tratado con fosfatasa alcalina de intestino de camarón (Thermo Fisher, EUA) para eliminar los grupos fosfato libres y evitar religación. Finalmente, tanto el vector como el producto de PCR fueron cuantificados y purificados a partir de gel de agarosa al 1 % utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), dejándolos listos para la reacción de ligación.

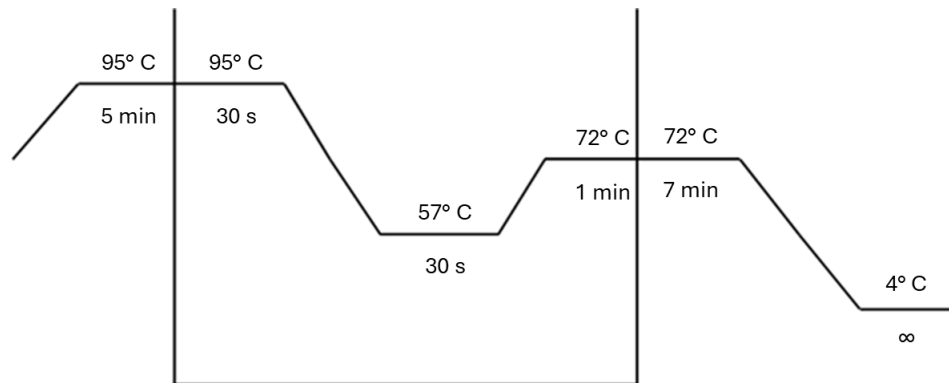
La reacción de ligación se realizó utilizando una relación molar vector:inserto de 1:3, correspondiente a 50 ng del vector pColdII previamente digerido con *Bam*HI y *Hind*III y tratado con fosfatasa alcalina de intestino de camarón (Thermo Fisher, EUA), y 150 ng del producto de PCR del gen *Bbitctp*. La mezcla de ligación se preparó en un volumen final de 20 µl, incluyendo 1 µl de enzima T4 ligasa y 4 µl de amortiguador de ligasa (Thermo Fisher, EUA, cat: EL0014). La reacción se incubó durante toda la noche a 16 °C en Baño María. Como controles, se incluyeron dos reacciones adicionales: una reacción sin inserto (solo vector y ligasa) para evaluar la religación del vector, y otra sin inserto ni ligasa (solo vector) para descartar autofosforilación o contaminación.

El gen *gp45* fue amplificado a partir de cDNA utilizando los oligonucleótidos:

*B.big\_gp45\_BamH\_F*: CCGGATCCATGATGCTCGCTACGTTTTCT

*B.big\_gp45\_HindIII\_R*: CATCAAGCTTTTAAATGCAAAGCAGCACTC

Con las siguientes condiciones de PCR:



Los primers incluyeron sitios de restricción para *Bam*HI y *Hind*III, compatibles con el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pColdII. La metodología de clonación, ligación y transformación fue la misma utilizada para *Bbit*ctp, descrita anteriormente.

### 2.11 Transformación de *E. coli* Rosetta gami

La transformación se realizó descongelando un vial de células competentes *E. coli* *Rosetta gami* en hielo durante 5 min. Se tomaron 50 µl de células y se adicionaron 10 µl de la mezcla de ligación correspondiente. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 min y posteriormente se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 30 s. Inmediatamente después, se colocaron en hielo por 2 min. Se añadieron 250 µl de medio S.O.C. previamente atemperado a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C durante 1 hora con agitación a 180 rpm.

Posteriormente, se sembraron 50 µl y 100 µl de cada transformación en placas con medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Como control negativo, se transformaron células únicamente con el vector pColdII sin inserto. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas y analizadas mediante miniprep, seguidas de digestión enzimática y visualización en gel de agarosa al 1 % para confirmar la presencia del inserto. Finalmente, se realizó la secuenciación del plásmido

recombinante para verificar que el fragmento insertado correspondía al gen *Bbitctp* de *B. bigemina* y que se encontraba en el marco de lectura correcto para su expresión.

## **2.12 Expresión y análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes *rBbitTCTP* y *rGP45*.**

La expresión de la proteína recombinante *rBbitTCTP* se llevó a cabo a partir de clonas positivas que contenían el inserto. Una clona fue seleccionada y cultivada en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), incubada a 37 °C y 180 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se transfirió el precultivo a un matraz con 450 ml de medio LB-ampicilina y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones. El crecimiento bacteriano fue monitoreado hasta alcanzar una densidad óptica (OD) entre 0.4 y 0.6, momento en el cual se tomaron 10 ml como muestra a utilizar como control no inducido. Al volumen restante se le adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante, incubando a 16 °C durante 14 horas con agitación a 180 rpm.

Las muestras inducidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 12 % en condiciones desnaturalizantes, y teñidas con azul de Coomassie R-250. Asimismo, se realizó un análisis por Western blot empleando anticuerpos anti-His tag (sc-8036) en una dilución 1:3000 y anticuerpos secundarios anti- ratón (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005) a una dilución 1:5000, siguiendo el protocolo previamente descrito.

Para evaluar la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó un ensayo de lisis celular mediante sonicación. Se tomaron 1 ml de cultivo inducido, se mantuvo en hielo y se sonicó por 3 min (80% amplitud, 30 s de pulso, 30 s de pausa). Las muestras fueron centrifugadas a 7,500 ×g durante 20 min, separando el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble). Ambas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE al 10 %, teñidas con azul de Coomassie R-250, observándose que la proteína *rBbitTCTP* se encontraba únicamente en la fracción soluble, por otro lado, la proteína recombinante *rGP45* se encontró tanto en la fracción soluble como en la insoluble, por lo que se procedió a purificarla de la fracción soluble al igual que *rBbitTCTP*.

### **2.13 Purificación de las proteínas *rBbITCTP* y *rGP45* (incluir *GP45*)**

Una vez confirmada la presencia de las proteínas recombinantes *rBbITCTP* y *rGp45* en la fracción soluble mediante SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 12% y al 10% respectivamente, se procedió a su purificación por cromatografía de afinidad. A partir de 100 ml de cultivo inducido, se obtuvo una pastilla de bacterias centrifugando a 7,500 x g durante 20 min. El pellet fue resuspendido en 10 ml de buffer A1 y sometido a sonicación en alícuotas de 1 ml por 3 min (80% amplitud, 30 s de pulso, 30 s de pausa), manteniendo las muestras en hielo. Los 10 ml sonicados fueron reunidos en un tubo estéril y centrifugados nuevamente para separar el sobrenadante, que contenía la proteína soluble.

El sobrenadante fue filtrado a través de membranas de 0.45 µm y cargado al equipo ÄKTA go™ chromatography system Cytiva utilizando una columna de afinidad de níquel (HisTrap™) siguiendo el protocolo de purificación para proteínas solubles precargado en el equipo. Se recolectaron 30 fracciones resultado de la elución y se analizaron únicamente las fracciones que se veían por debajo del pico del electroferograma mediante SDS-PAGE al gel 10% y 12 % dependiendo el caso, con el fin de verificar la presencia y pureza de la proteína *rBbITCTP*. Posteriormente, se seleccionaron las fracciones más enriquecidas, las cuales fueron concentradas y dializadas en PBS pH 7.4 con inhibidor de proteasas utilizando filtros Amicon Ultra de 15 ml (10,000 NMWL). Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 12 % y cuantificadas por Bradford.

### **2.14 Cuantificación por ELISA de *BbITCTP* en fases infectantes de *B. bigemina***

Para la cuantificación de la proteína *BbITCTP* mediante ELISA, se fijaron en una placa de 96 pozos diluciones seriadas de la proteína recombinante *rBbITCTP*, desde 20 µg/ml hasta 0.156 µg/ml, con cinco réplicas por concentración. En la misma placa se incluyeron muestras correspondientes a fases infectantes de *B. bigemina*, con una concentración de 280 µg/ml, también por quintuplicado. Para la fijación del antígeno, cada muestra se mezcló con buffer de carbonatos (pH 9.6) y se adicionaron 100 µl por pozo; la placa fue incubada durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.05 %, seguido de

un bloqueo con suplementado con BSA al 1 % en PBS-Tween al 0.05 % durante 60 min a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados adicionales con PBS-Tween al 0.05 % y se añadieron 100 µl del anticuerpo primario, a cada uno de los pozos en dilución 1:3000, así como el control negativo (PBS-Tween 0.05 % con leche al 5 %), todos por quintuplicado. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Luego, se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.05 % y se adicionó el anticuerpo secundario (mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357) en dilución 1:3000, también en PBS-Tween al 0.05 %, incubando nuevamente por 1 hora a 37 °C. Finalmente, se realizaron cinco lavados y se agregó la solución sustrato OPD (SIGMAFAST™, peroxidase substrate, chromogenic, Tablet) en condiciones de oscuridad. La lectura de absorbancia se realizó a 492 nm utilizando el lector de microplacas (SPECTROstar Nano) y se leyó cada 5 min hasta el minuto 20. Los valores de las concentraciones de *BbiTCTP* se obtuvieron de la comparación de las absorbancias respecto a la curva estándar, una vez obtenidas las concentraciones de cada lectura, se cargaron los datos el programa GraphPad Prism 8 y se les aplicó el análisis estadístico de varianza ANOVA de una sola vía, con la prueba poshoc tukey para determinar las diferencias estadísticas entre la abundancia de *BbiTCTP* en las fases infectantes de *B. bigemina*.

### **2.15 Obtención de anticuerpos anti *rBbiTCTP* de *B. bigemina* en bovinos**

La obtención de anticuerpos anti-*rBbiTCTP* de *B. bigemina* se llevó a cabo mediante la inmunización de bovinos. Inicialmente, se extrajo sangre para obtener suero preinmune. Posteriormente, se inmunizaron bovinos con 100 µg/ml de proteína recombinante *rBbiTCTP*, combinada con el adyuvante Montanide ISA™ 201. Se realizaron dos inmunizaciones, con un intervalo de 21 días entre cada una.

Al término del esquema de inmunización, se extrajo sangre de los animales inmunizados y se centrifugó a 1,700 × g durante 20 min. El suero colectado fue analizado mediante Western Blot, con el objetivo de corroborar que los anticuerpos generados reconocían específicamente la proteína recombinante *rBbiTCTP*.

### **2.16 Obtención de anticuerpos anti rGP45 de *B. bigemina* en conejos.**

La obtención de anticuerpos anti-GP45 de *B. bigemina* se llevó a cabo mediante la inmunización de conejos Nueva Zelanda. Previamente, se extrajo sangre para obtener suero preinmune. Posteriormente, los animales fueron inmunizados con 80 µg/ml de proteína recombinante rGP45, formulada con el adyuvante Montanide ISA™ VG100. El esquema consistió en dos inmunizaciones, con un intervalo de 21 días entre cada una.

Al finalizar el protocolo, se extrajo sangre de los conejos inmunizados y se centrifugó a  $1,700 \times g$  durante 20 min. El suero colectado posterior a la segunda inmunización fue utilizado como marcador de membrana en la microscopía.

### **2.17 Inmunolocalización de *Bb*TCTP de *B. bigemina* mediante microscopía confocal**

La inmunolocalización de la proteína *Bb*TCTP de *B. bigemina* fue realizada mediante análisis de microscopía confocal. Se prepararon frotis a partir de cultivos de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, con una parasitemia del 1 % y de sangre de un bovino infectado con 0.7 % de parasitemia. Los frotis fueron dejados secar a temperatura ambiente con corriente de aire directa, posteriormente las laminillas fueron permeabilizadas durante 40 min a 4°C con una solución de acetona:metanol (1:1) previamente enfriada a -20 °C.

Las laminillas fueron bloqueadas con PBS-TWEEN 0.5% con BSA al 10 %, incubadas en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se realizó 1 lavado con PBS por decantación.

Se emplearon anticuerpos primarios anti-*Bb*TCTP (1:200) y anti-GP45 (1:200) de *B. bigemina*, diluidos en PBS-T. Las laminillas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados en PBS por 10 min con agitación sumergiendo las laminillas en cubeta de coplin, después se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios: Alexa Fluor-488 (1:200), conjugado con affinipure goat anti-IgG bovino (Cat: 131259), y Alexa Fluor-594 (1:200), conjugado con affinipure goat anti-IgG conejo (Cat: 142848). La incubación se realizó en cámara húmeda a 37 °C durante 1 hora cubriendo las laminillas de la

luz todo el tiempo. Luego, se efectuaron tres lavados adicionales con PBS-T durante 10 min cada uno en cubeta de coplin.

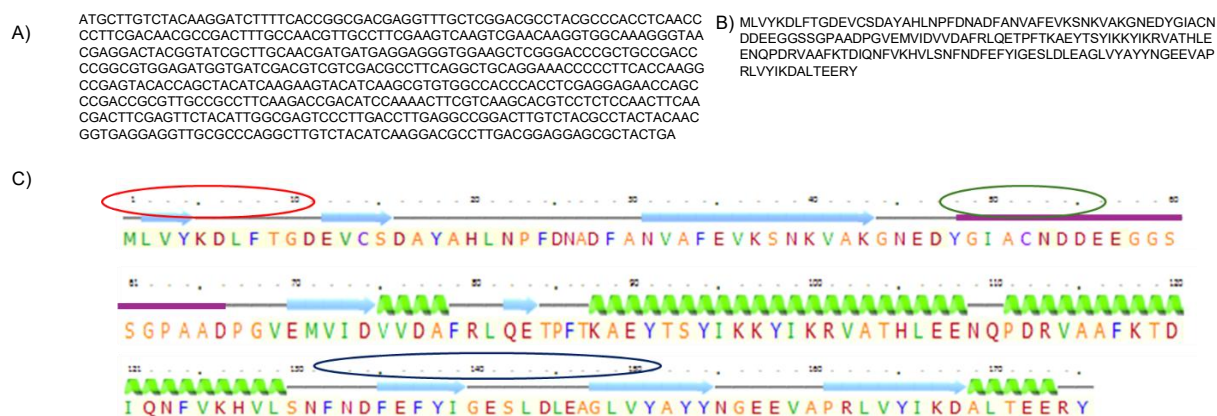
Finalmente, se retiró el exceso de líquido de las laminillas, se adicionó 25  $\mu$ L del medio de montaje VECTASHIELD con DAPI (Vector Laboratories, H120010), se colocó el cubreobjetos y se sellaron las orillas con barniz transparente, por último, las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal FLUOVIEW FV4000.

## Resultados

El conjunto de datos que se mostrarán a continuación, son resultado de análisis *in silico* como experimentales sobre la proteína *BbTCTP* para determinar su importancia en el desarrollo del ciclo de vida de *B. bigemina*, especialmente en las fases infectantes del parásito.

### 3.1 caracterización *in silico* a *BbTCTP* de *B. bigemina*

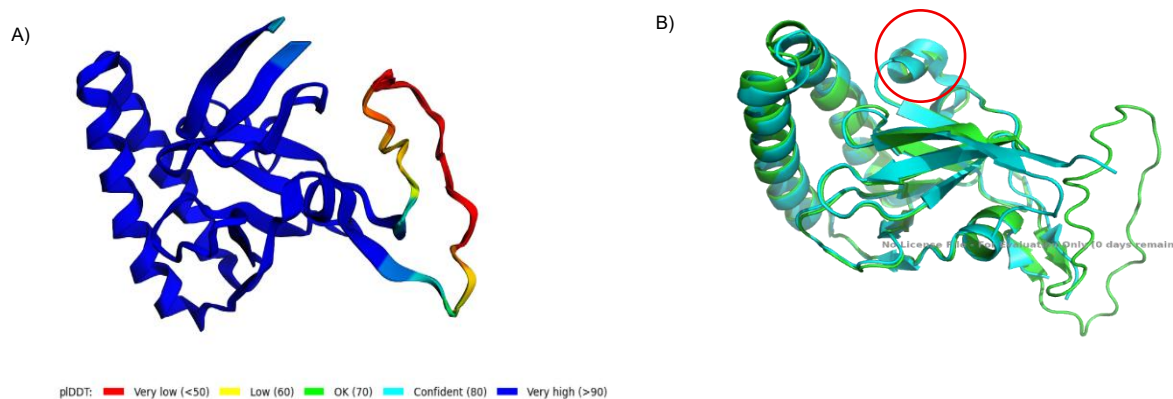
El análisis *in silico* de la secuencia de *BbTCTP* de *B. bigemina* se llevó a cabo mediante la obtención de la secuencia codificante del gen *Bbitctp*, derivada de la secuenciación del inserto ligado al vector pColdII. En la Figura 6A se presenta la secuencia de nucleótidos de *Bbitctp*, la cual fue traducida utilizando la herramienta ExPASy para obtener la secuencia de aminoácidos (Fig. 6B). A partir de dicha secuencia, se analizó la estructura secundaria de *BbTCTP* de *B. bigemina* (Fig. 6C), donde se observaron cuatro hélices alfa y ocho láminas beta, junto con una región desordenada característica de las TCTP en otros organismos. En el círculo rojo se muestran los 10 primeros residuos de aminoácidos que corresponden al dominio de transducción de proteínas (reportado en humanos), en el círculo verde, se muestra el dominio de dimerización de TCTP ubicado en el bucle flexible de la proteína, y en el círculo azul la región de unión a microtúbulos.



**Figura 6: Análisis *in silico* de la secuencia de TCTP.** A) Secuencia de nucleótidos de la región codificante de *BbTCTP*. B) Secuencia de aminoácidos obtenida mediante la traducción de dicha región en la herramienta ExPASy. C) Estructura secundaria de *BbTCTP* de *B. bigemina*: en verde se muestran los residuos de aminoácidos que conforman las cuatro hélices alfa de esta proteína; en azul, las

ocho láminas beta; y en morado, la región desordenada característica. El dominio de transducción de proteínas (reportado en humanos) se muestra en color rojo, en el círculo verde el dominio de dimerización ubicado en el bucle flexible, y en el círculo azul la región de unión a microtúbulos.

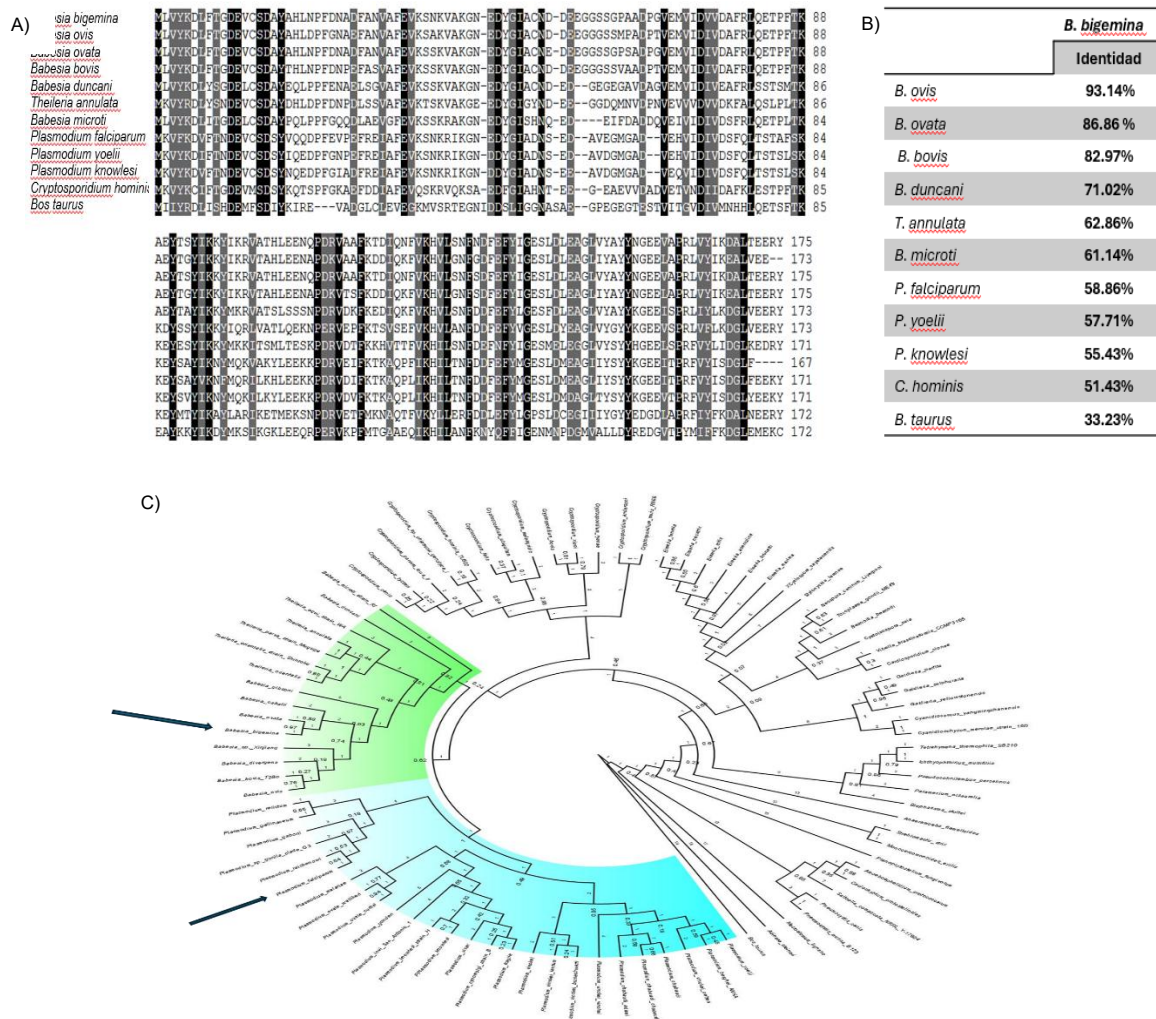
Posteriormente, se realizó modelaje 3D de *Bb*TCTP de *B. bigemina* (Fig. 7A). En este caso, se observan regiones con alta confiabilidad estructural ( $pLDDT \geq 90$ ), correspondientes a elementos secundarios como hélices alfa y láminas beta. Las zonas con  $pLDDT < 70$  coinciden con la región desordenada, donde se localiza el dominio de dimerización de esta proteína. En este análisis resaltan estos elementos estructurales y probablemente funcionales con TCTP de otros organismos.



**Figura 7: Estructura 3D proteína *Bb*TCTP de *B. bigemina* generado por AlphaFold2.** A) La estructura tridimensional muestra la organización espacial de los residuos de *Bb*TCTP, coloreados según el valor de confianza local ( $pLDDT$ ). Las regiones con alta confianza ( $pLDDT \geq 90$ ) se representan en azul oscuro, mientras que las zonas con menor confianza se degradan hacia el amarillo y el rojo. B) Comparación del modelo de *Bb*TCTP (Azul) con el cristal de TCTP de *P. falciparum* (PDB: 3P3K, verde). El valor de RMSD entre ambas estructuras es de 0.500 Å.

En el análisis de superposición entre el cristal de TCTP de *P. falciparum* y *Bb*TCTP (Fig. 7B), se observa que ambas proteínas presentan una estructura 3D conservada, donde las hélices alfa y láminas beta empalman entre ambas estructuras. En rojo se señala una hélice alfa extra, reportada en *P. falciparum* y que también está presente en *B. bigemina*, que es característica de los parásitos Apicomplexa. La conservación estructural entre las proteínas sugiere una función esencial compartida.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas TCTP de parásitos del phylo Apicomplexa y de *Bos taurus*, uno de los hospedantes de *B. bigemina*. En dicho alineamiento (Fig. 8A), se identificaron regiones y residuos de aminoácidos conservados entre especies, así como los porcentajes de identidad correspondientes (Fig. 8B), lo cual proporciona indicios sobre las posibles funciones de la *Bb*TCTP de *B. bigemina*, además de aportar información sobre las relaciones evolutivas de esta proteína (Fig. 8C), considerando que las secuencias similares suelen compartir funciones o derivar de un ancestro común.



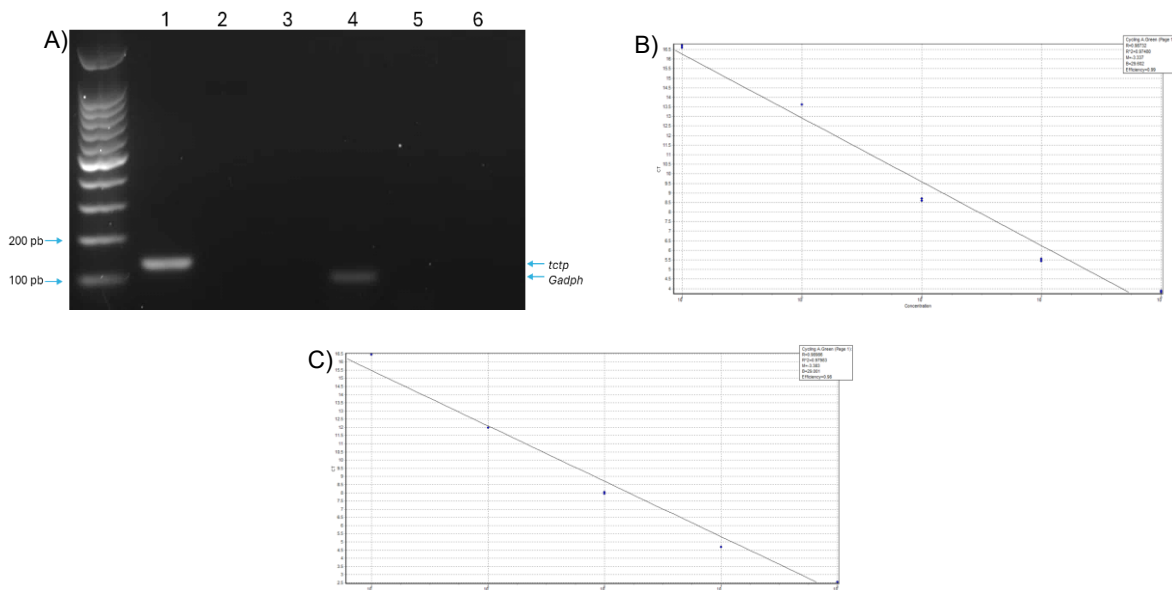
**Figura 8: Comparación de las secuencias de TCTP de parásitos del phylo Apicomplexa con *Bb*TCTP.** A) Boxshade del alineamiento múltiple de las secuencias de TCTP de parásitos Apicomplexa, las regiones en negro son regiones conservadas, las regiones grises representan cambios en los residuos de aminoácidos que conservan propiedades bioquímicas similares. B) Porcentajes de

identidad de las secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple y C) Construcción de un árbol filogenético, en el clado verde se señala a *B. bigemina* y en el clado azul se señala a *P. falciparum*.

En el árbol filogenético de la secuencia de la proteína *BbTCTP*, mostró que *B. bigemina* se encuentra agrupada dentro de un clado monofilético que incluye otras especies del género *Babesia*, como *B. ovata*, *B. caballi*, *B. gibsoni*, *B. divergens*, *B. bovis* y *B. ovis*. Cercano este clado se ubican especies del género *Theileria*, como *T. orientalis*, *T. parva*, *T. annulata* y *T. equi*, formando un conjunto cohesivo dentro del filo Apicomplexa. Por su parte, *P. falciparum* se agrupa con *P. reichenowi* y *P. gaboni*, lo que refleja la conservación de la proteína TCTP en el género Plasmodium. Ambos clados, aunque separados por una distancia evolutiva considerable, se integran dentro del mismo clado de los apicomplexa, lo que sugiere una conservación funcional de TCTP entre géneros.

### 3.2 Análisis de la expresión de *Bbitctp* las fases infectantes de *B. bigemina*

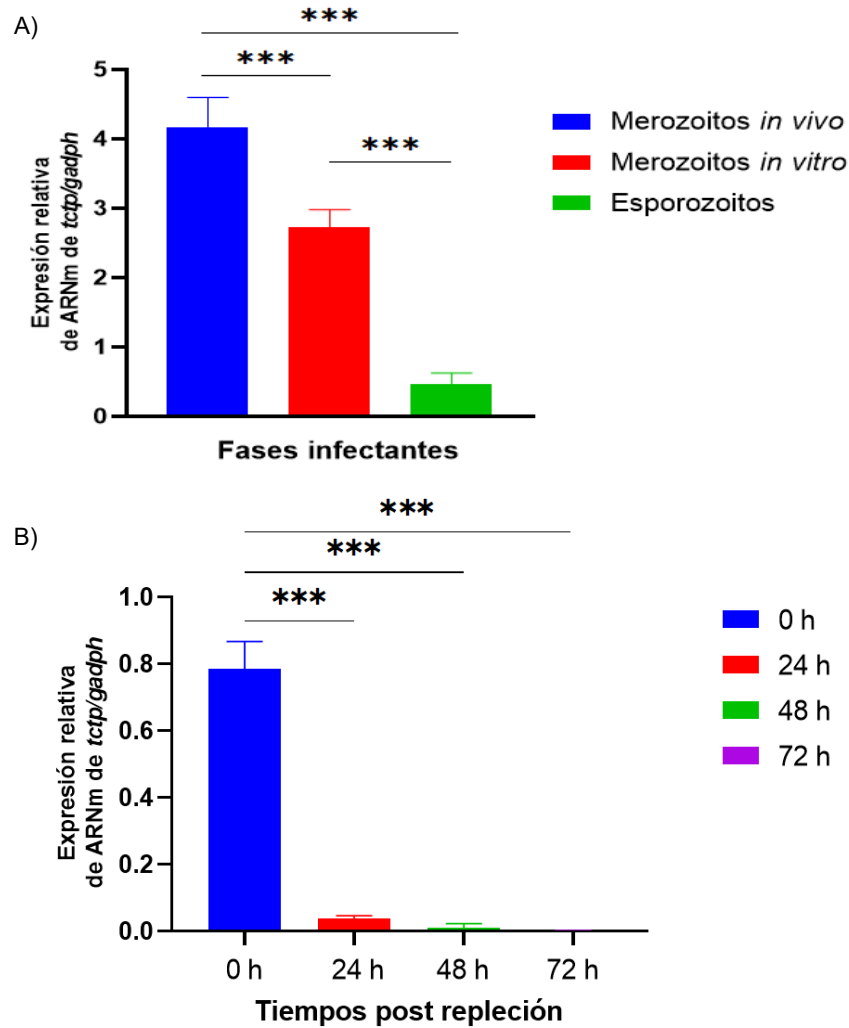
Para la estandarización de la RT-qPCR, se realizó la extracción de ARN a partir de muestras de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, y se realizó RT-PCR en punto final con los primers diseñados de *Bbitctp* y *gapdh*. A partir de los productos de PCR en punto final (Fig. 9A), se cuantificó la concentración y el número de copias para construir una curva a partir de un número de copias determinado de *Bbitctp* y *gapdh*, con el fin de cuantificar la expresión de *Bbitctp* en las fases infectantes. Los puntos de las curvas fueron  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$  copias. En la figura 9 se muestra la curva para *Bbitctp* (Fig. 9B) y *gapdh* (Fig. 9C), este último corresponde al gen constitutivo utilizado para normalizar la expresión de *Bbitctp*.



**Figura 9: PCR en punto final y curva de *Bbitctp* y *gapdh*.** Panel A: gel de agarosa al 2 %; carril 1, amplicón de *Bbitctp* (140 pb); carriles 2 y 3, controles RT- y C- de tctp; carril 4, amplicón de *gapdh* (100 pb); carriles 5 y 6, controles RT- y C-, respectivamente. Curvas de qPCR de *gapdh* (Panel B) y *Bbitctp* (Panel C) con los puntos  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^4$  números de copias.

En la Figura 10, panel A, se presenta el análisis de la expresión de *Bbitctp* en las fases infectantes de *B. bigemina* evaluadas mediante qPCR. Las fases procesadas y analizadas fueron esporozoítos (obtenidos de ninfas de *R. microplus* infectadas con *B. bigemina*) y merozoítos, tanto *in vivo* como *in vitro* (eritrocitos de un bovino infectado con *B. bigemina* y eritrocitos de un cultivo celular infectado, respectivamente).

En la figura 10 se muestra un ensayo realizado a partir de ANR extraído de intestinos de garrapata *R. microplus* infectados con *B. bigemina* (en distintos tiempos post replación: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h) Fig. 10B); el tiempo postreplación se refiere al intervalo que ocurre después de que la garrapata termina de alimentarse de sangre, iniciando la infección del parásito en los tejidos de la garrapata.



**Figura 10: Expresión diferencial de *Bbitctp* de fases infectantes de *B. bigemina*.** Panel A: Niveles de expresión relativa de *Bbitctp* de Merozoitos *in vivo* (Bovino infectado con *B. bigemina*), Merozoitos *in vitro* (cultivo celular de *B. bigemina*) y esporozoitos (ninfas de *R. microplus* infectadas de *B. bigemina*). Panel B: Expresión diferencial de *Bbitctp* de *B. bigemina* en *R. microplus*. Comparación de la expresión diferencial de *Bbitctp* en intestinos de garrapatas infectas con *B. bigemina* a las 0, 24, 48 y 72 horas post replación. Datos analizados por ANOVA de

una sola vía. \*Diferencia significativa de la expresión entre fases infectantes ( $P < 0,05$ ).

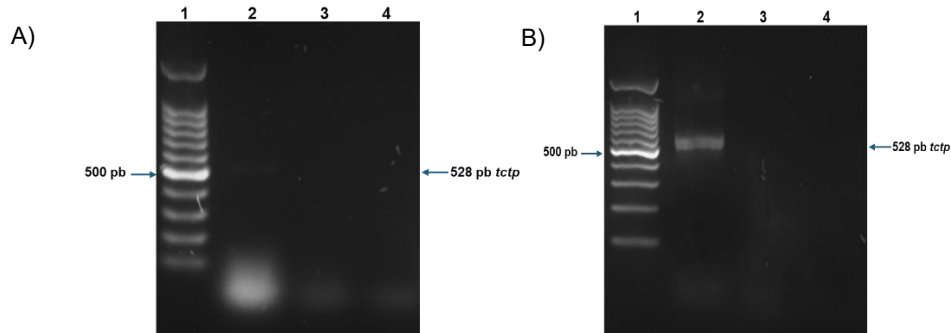
Los resultados mostraron una expresión significativamente mayor de *Bbitctp* en los merozoítos *in vivo*, seguido de los merozoítos *in vitro*, en comparación con los esporozoítos, los cuales presentaron los niveles más bajos de expresión de *Bbitctp*, tal como se observa en la Figura 10 A. Este patrón sugiere que la expresión de *Bbitctp* está estrechamente vinculada con la fase asexual del parásito, donde tiene interacción directa con el hospedante vertebrado. Además, la expresión de *Bbitctp* en garrapatas *R. microplus* infectadas con *B. bigemina*, mostró una subexpresión del gen en los estadios que se desarrollan dentro del vector.

### **3.3 Abundancia de BbTCTP en las fases infectantes de *B. bigemina***

Para determinar la abundancia de la proteína BbTCTP en las diferentes fases infectantes de *B. bigemina*, se llevó a cabo la obtención de una proteína recombinante, la cual se muestra a continuación:

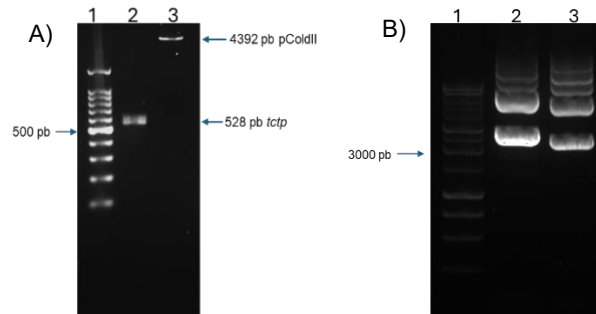
#### **3.3.1 Clonación gen *Bbitctp* en el vector de expresión pColdII y caracterización de clonas transformadas.**

La cuantificación de la abundancia de la proteína BbTCTP de *B. bigemina* se realizó mediante la comparación con una curva estándar basada en diferentes concentraciones de la proteína rBbTCTP. A continuación, se muestra la obtención de la construcción *Bbitctp/pColdII* para la obtención de la proteína recombinante anteriormente mencionada. Para esto, se realizó la extracción de ARN de muestras de eritrocitos infectados con *B. bigemina* para la obtención de cDNA y amplificación de la región codificante de *Bbitctp* de 528 pb (Fig. 11A) con los primers que incluyen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Posterior a la amplificación, el producto de PCR se concentró mediante precipitación con etanol absoluto grado biología molecular (Fig. 11B).



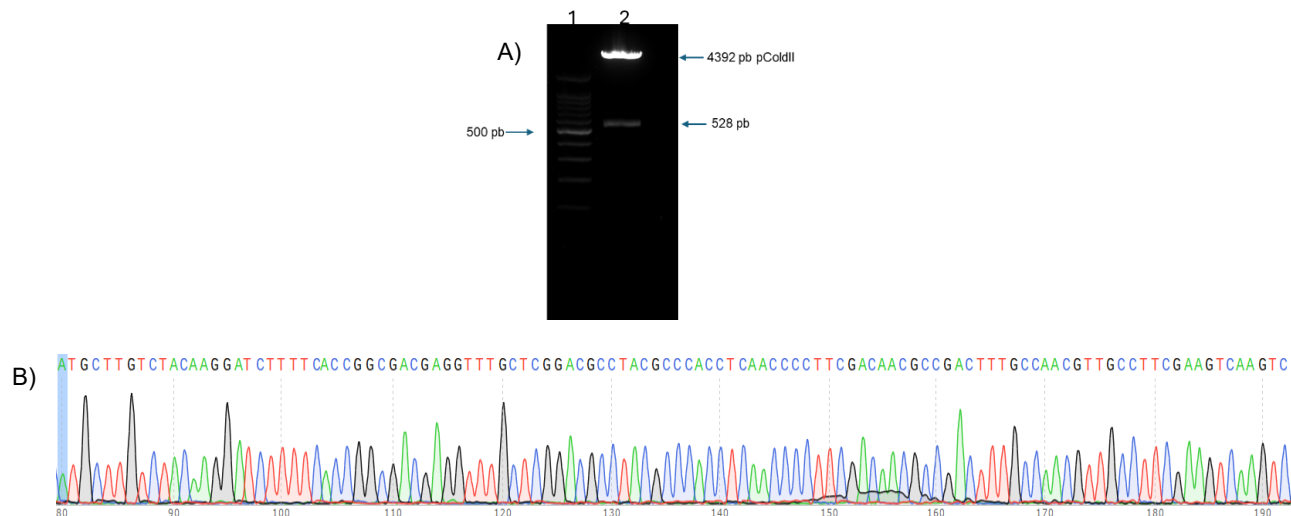
**Figura 11: Amplicón de la región codificante de *Bbitctp* de *B. bigemina*.** Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ Nucleic Acid. A) Marcador de 100 pb (1), amplificación de *Bbitctp* (2), Rt- (3). B) Amplicón de *Bbitctp* concentrado después de la precipitación con etanol. Marcador de 100 pb (1), amplicón de *Bbitctp* (2), control negativo (3), RT- (4).

Posteriormente se preparó el inserto y el vector pColdII, realizado una doble restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III; los cuales fueron analizados por separado en un gel de agarosa (Fig. 12A). La ligación del inserto con el vector se llevó a cabo con la enzima T4 ligasa con sus respectivos controles. Posterior a la ligación, se comparó el DNAP de la clona positiva con el vector vacío (Fig.12B).



**Figura 12: Obtención de la construcción pColdII/*Bbitctp*.** A) Análisis del inserto y el vector para la ligación: Marcador de 100 pb (1), Amplicón *Bbitctp* [34.4 ng/ul] (2), pColdII [19.1 ng/ul] (3). B) Análisis del DNAP de una clona: Marcador de 1 Kb (1), Clona candidata de la ligación pColdII + *Bbitctp* (2), pColdII sin inserto (3).

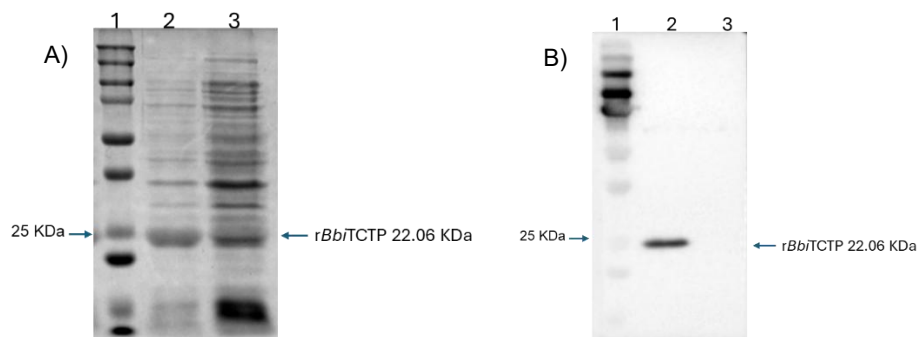
La construcción pColdII/*Bbitctp* se transformó en células competentes *Rosetta-gami*™. Una de las clonas liberó el inserto cuando se analizó por una doble restricción enzimática con *Bam*HI y *Hind*III (Fig. 13A) y por secuenciación (Fig. 13B).



**Figura 13: Análisis de la construcción pColdII/*Bbitctp*.** Análisis de doble restricción con *Hind*III y *Bam*HI del DNAp de la clona obtenida: Marcador de 100 pb (1), Inserto liberado: pColdII/*Bbitctp* (2). B) Electroferograma de la secuenciación de *Bbitctp* en pColdII.

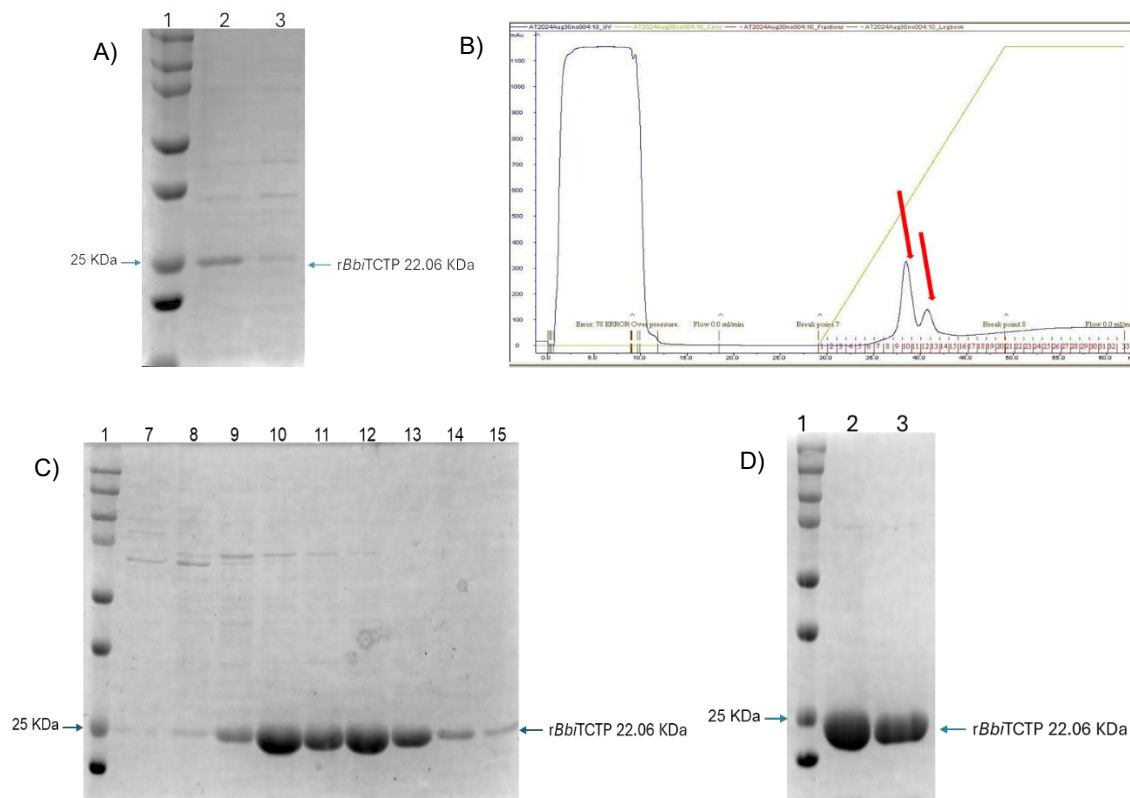
### 3.3.2 Evaluación de la expresión de la proteína recombinante *rBbITCTP* y su purificación mediante cromatografía de afinidad.

La expresión de la proteína recombinante en células competentes Rosetta-gami™ fue inducida con IPTG, lo cual fue evaluado mediante SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 12%, donde se detectó una banda de aproximadamente 22 kDa, correspondiente al peso molecular estimado de *rBbITCTP* (Fig. 14A). La identidad de esta banda fue confirmada mediante Western blot, utilizando anticuerpos antihistag (Fig. 14B).



**Figura 14: Análisis de la expresión de *rBbITCTP*.** A) SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de coomasie; Marcador de peso molecular (1), cultivo inducido (2), cultivo no inducido (3). B) Western blot de *rBbITCTP* membrana de nitrocelulosa incubada con antihistag: Marcador de peso molecular (1), cultivo inducido (2), Cultivo no inducido (3).

El ensayo de solubilidad mostró a la proteína recombinante *rBbITCTP* en la fracción soluble (Fig. 15A). Por esta razón, se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas HisTrap (Fig. 15B). Las fracciones obtenidas durante la elución fueron analizadas por SDS-PAGE al 12 % (Fig. 15C). Estas fracciones fueron posteriormente dializadas, concentradas y cuantificadas (Fig. 15D), con el propósito de construir una curva de referencia que permitiera determinar la abundancia relativa de *BbITCTP* en las fases infectantes de *B. bigemina*.



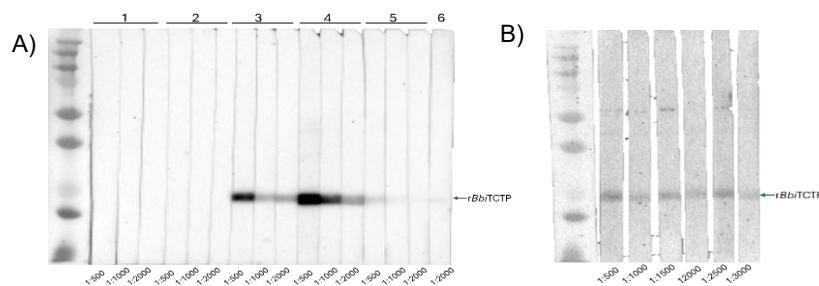
**Figura 15: Análisis de la proteína recombinante *rBbITCTP*.** A) Ensayo de solubilidad de *rBbITCTP*. SDS-PAGE teñido con azul de coomasie: Marcador de peso molecular (1), fracción soluble (2), fracción insoluble (3). B) Purificación de *rBbITCTP* a mediante cromatografía de afinidad usando columnas HisTrap FF; en la imagen se observan dos picos definidos de las fracciones 7 a la 15. C) Análisis de las fracciones purificadas de *rBbITCTP*: Marcador de peso molecular (1), fracción 7-15 de la purificación de *rBbITCTP*. D) *rBbITCTP* dializada y concentrada en centrífuga: Marcador de peso molecular (1), Fracción 10 antes (2), Fracción 10 dializada y concentrada 0.8 mg/ml (3).

Esta proteína en condiciones nativas permitió construir una curva de referencia, utilizada posteriormente para cuantificar la abundancia de *Bb*TCTP en las distintas fases infectantes de *B. bigemina*.

Por otra parte, con la proteína recombinante *rBb*TCTP se llevó a cabo la preparación del inmunógeno para la inmunización en bovinos. Esta emulsión fue administrada por vía subcutánea en un esquema de inmunización largo que incluyó dosis. con el objetivo de inducir una respuesta humoral específica contra la proteína recombinante.

### 3.3.3 Evaluación de anticuerpos para el reconocimiento de *Bb*TCTP recombinante y nativa

En el momento en que se llevó a cabo este experimento, aún no se disponía de anticuerpos policlonales contra *rBb*TCTP, debido a que en un primer experimento los sueros del bovino previamente inmunizado con la proteína recombinante no mostraron anticuerpos detectables y se tuvo que repetir el esquema de inmunización (Fig. 16 A; grupos 2 y 3). Por esta razón, se decidió trabajar con sueros de conejos inmunizados con péptidos sintéticos de *Bb*TCTP (Fig. 16 A; grupos 3, 4 y 5). Además, se evaluó un suero de un bovino inmunizado con la proteína recombinante *r*TCTP de *B. bovis* (Fig. 16, panel A). Todos los sueros mencionados fueron analizados mediante Western blot, utilizando membranas de nitrocelulosa sensibilizadas con la proteína recombinante *rBb*TCTP.



**Figura 16: Western Blot utilizando anticuerpos anti-TCTP.** Panel A: Membrana de nitrocelulosa de *rBb*TCTP incubada con distintas diluciones de suero pre inmune bovino (1), suero bovino de la cuarta inmunización con *rBb*TCTP (2), sueros de conejo con anticuerpos anti péptidos de *Bb*TCTP conejo 2 (3), conejo 5 (4), conejo 7 (5) control positivo con anti histag (1:2000) (6). Panel B: Membrana de nitrocelulosa de *rBb*TCTP incubada con distintas diluciones de sueros anti TCTP de *B. bovis*.

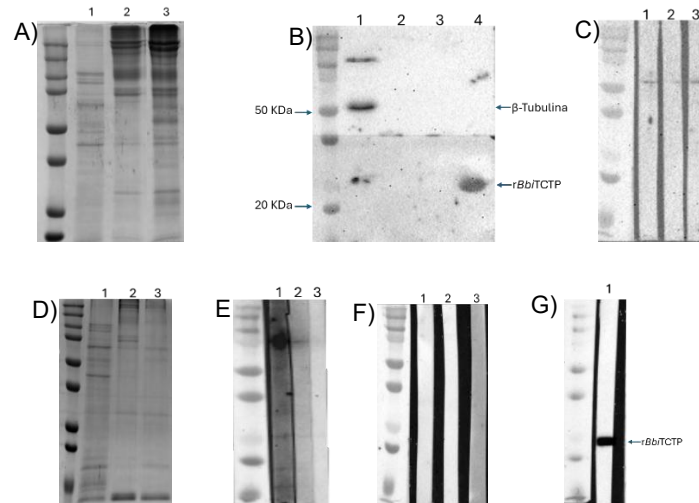
Los resultados mostraron que los sueros de los bovinos inmunizados con r*Bb*TCTP no generaron anticuerpos detectables contra la proteína recombinante, a diferencia de los sueros de conejo, donde se observó una señal prominente a una dilución 1:500 (Figura 16 A; grupos 3 y 4). Esta dilución fue seleccionada como punto de partida para los experimentos posteriores. Además, se observó que los anticuerpos anti-TCTP generados contra la proteína recombinante de *B. bovis* (1:500) reconocen a la r*Bb*TCTP de *B. bigemina*, lo cual indica que estos sueros podrían ser empleados en ensayos futuros para evaluar reactividad cruzada y abundancia relativa (Figura 16, panel B).

Una vez comprobado que los sueros de conejos inmunizados con péptidos de *Bb*TCTP y los sueros de bovinos inmunizados con TCTP de *B. bovis* reconocían la proteína recombinante, se procedió a extraer proteínas de las fases infectantes de *B. bigemina* (Fig. 17A), con el objetivo de verificar, mediante Western blot, que dichos sueros también reconocen la proteína nativa (Fig.17 B, C, E y F).

Los resultados del Western blot presentados en la Figura 17, que corresponden a las fases infectantes incubadas con anti-TCTP de *B. bovis* a una dilución de 1:500 (Fig. 17B) e incubadas con los sueros de conejo anti-péptidos de *Bb*TCTP a una dilución de 1:500 (Fig. 17C), no mostraron bandas correspondientes a *Bb*TCTP de *B. bigemina*, por lo que se decidió eliminar las proteínas abundantes, como la hemoglobina, que pudieran enmascarar el reconocimiento de *Bb*TCTP en los extractos de proteínas y sobre todo concentrar las muestras realizando “Clean up”.

En la Figura 17, panel D, se muestra la integridad de los extractos proteicos después del clean-up de las fases infectantes de *B. bigemina* en un gel de poliacrilamida al 12 %. Estos extractos fueron posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa y, por una parte, se incubaron con el suero anti-TCTP de *B. bovis* (1:500) (Fig. 17E), y por otra, con los sueros de conejos anti-péptidos de *Bb*TCTP (1:500) (Fig. 17F). Cabe destacar que en experimentos anteriores se observó que los sueros de *B. bovis* mostraron menor capacidad para reconocer la proteína recombinante (Fig. 16B), por ello se decidió continuar los ensayos únicamente con los sueros anti-péptidos contra *Bb*TCTP.

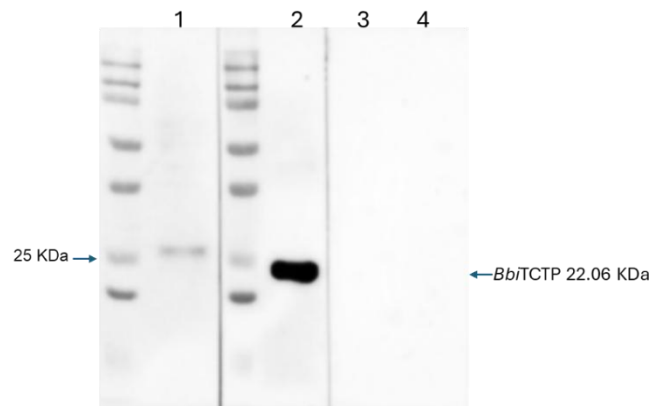
Adicionalmente, en el ensayo de Western blot se evaluó el anticuerpo anti-tubulina en una dilución 1:100, el cual serviría como control constitutivo para el análisis de la abundancia de *Bb*TCTP. Este anticuerpo presentó reacción cruzada con la tubulina de la garrapata (Fig. 17B), por lo cual no se utilizó para ningún ensayo. Por esta razón, se decidió llevar a cabo la cuantificación de *Bb*TCTP mediante una curva con concentraciones conocidas de la proteína recombinante empleando ELISA.



**Figura 17: Detección de la proteína nativa *Bb*TCTP.** (A) SDS-PAGE al 12% de proteínas totales de las fases infectantes de *B. bigemina* teñido con azul de coomassie (1) Ninfas infectadas con esporozoitos de *B. bigemina*, (2) Merozoitos *in vitro* y (3) Merozoitos *in vivo*. (B) Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con proteínas totales de fases infectantes carril 1, 2 y 3, carril 4 control positivo de *rBb*TCTP, incubado con anti-tubulina (1:100) y anti TCTP de *B. bovis* (1:500). (C) Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con proteínas totales de fases infectantes de *B. bigemina* carril 1, 2 y 3, incubada con anti péptidos de *Bb*TCTP (1:500). (D) SDS-PAGE de proteínas totales de las fases infectantes de *B. bigemina* después del clean up teñido con azul de coomassie (1) Ninfas infectadas con esporozoitos, (2) Merozoitos *in vitro* y (3) Merozoitos *in vivo*. (E) Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con proteínas de fases infectantes post clean up incubadas con anti TCTP de *B. bovis* (1:500). (F) Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con proteínas de fases infectantes post clean up incubadas con anti péptidos de *Bb*TCTP (1:500). Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con de *rBb*TCTP incubada con anti péptidos (1:500).

La estandarización del Western blot se llevó a cabo extrayendo proteínas totales de eritrocitos infectados con *B. bigemina* de un bovino que tuviera más del 3% de parasitemia, con el fin de comprobar que los sueros utilizados reconocen específicamente a *Bb*TCTP y así poder realizar el ensayo de cuantificación

mediante ELISA indirecta. A estos extractos de proteínas también se les realizó clean-up y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. En la Figura 18 se observa la especificidad de estos anticuerpos anti-peptidos por la proteína recombinante y nativa. La proteína recombinante *rBbITCTP* se detectó a un peso molecular aproximado de 20 kDa (peso teórico), mientras que la proteína nativa de *B. bigemina* se observó a un peso molecular cercano a 25 kDa. Adicionalmente, se incluyeron sueros preinmunes como controles negativos en los ensayos de Western blot, los cuales no mostraron señales inespecíficas, confirmando la especificidad de la detección.



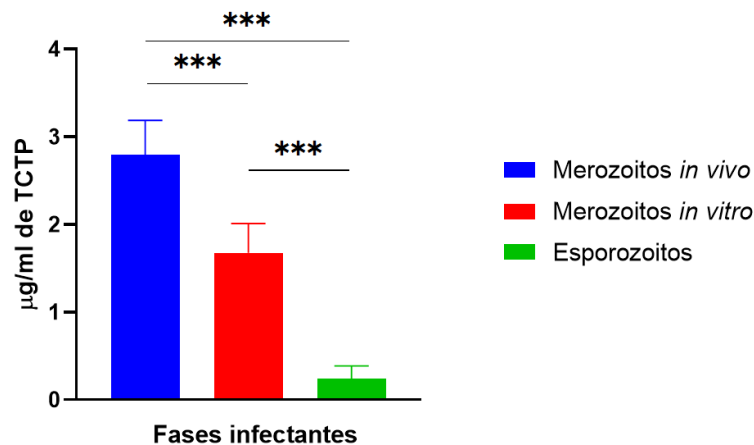
**Figura 18: Western blot de proteínas totales post clean-up de sangre infectada con *B. bigemina* (merozoitos *in vivo*).** Membrana de nitrocelulosa incubada con sueros de conejo anti-peptidos de *BbITCTP* en dilución 1:1500 (1 y 2). Carril 1: merozoitos; carril 2: *rBbITCTP*. Controles con suero preinmune (3 y 4): carril 3: merozoitos; carril 4: *rBbITCTP*.

El resultado anterior permitió validar la detección específica por los anticuerpos, además, se observó que la señal obtenida con los sueros anti-peptidos fue más intensa en comparación con la membrana incubada con sueros anti-TCTP de *B. bovis*, lo que reforzó la decisión de emplear exclusivamente los anticuerpos anti-peptidos de *BbITCTP* para los ensayos de cuantificación por ELISA indirecta.

### 3.3.4 Cuantificación de *BbITCTP* en las fases infectantes de *B. bigemina*

Para abordar la cuantificación de la abundancia de la proteína *BbITCTP*, se implementó un ensayo de ELISA indirecta con el fin de determinar la concentración absoluta en las fases infectantes de *B. bigemina*. Para ello, se utilizaron los sueros anti-peptidos de *BbITCTP* de *B. bigemina*. Se extrajeron las proteínas totales de

dichas fases, las cuales fueron comparadas contra una curva estándar construida con concentraciones conocidas de la proteína recombinante (1.25, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Tanto las muestras como los puntos de la curva estándar fueron cargados por quintuplicado, y las concentraciones de proteína total fueron previamente igualadas para permitir una estimación precisa de la abundancia de *Bb*TCTP. Cabe destacar que la curva de *rBb*TCTP fue estandarizada mediante múltiples experimentos independientes, y los puntos incluidos representan el resultado de una estandarización. La detección se realizó utilizando anticuerpos anti-péptidos de *Bb*TCTP en conejo a una dilución de 1:3000, seguidos de un anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado a HRP también a una dilución de 1:3000. A los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de ELISA indirecta se les aplicó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey para identificar diferencias significativas entre grupos, tal como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19: Abundancia de la proteína *Bb*TCTP en fases infectantes de *B. bigemina*.** Comparación entre merozoítos *in vivo* de un bovino infectado con *B. bigemina* (azul), merozoitos *in vitro* de cultivo celular de *B. bigemina* (rojo) y esporozoitos de ninfas de *R. microplus* infectadas con *B. bigemina* (verde). Los datos fueron analizados en GraphPad Prism 8 mediante un análisis estadístico de ANOVA de una sola vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey. Diferencia significativa en la abundancia de *Bb*TCTP entre fases infectantes ( $P < 0.05$ ).

En la Figura 19 se observa una diferencia significativa en la abundancia de la proteína *Bb*TCTP de *B. bigemina*, siendo más elevada en los merozoítos *in vivo* obtenidos de sangre infectada de un bovino, seguida por los merozoítos *in vitro*

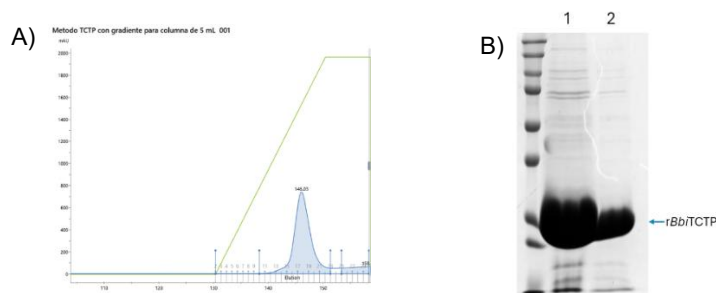
cultivados en células, y finalmente por los esporozoitos provenientes de ninfas de *R. microplus* infectadas. Esta tendencia en los niveles de abundancia proteica se correlaciona con los niveles de expresión del mRNA.

### 3.4 Inmunolocalización de *Bb*TCTP en merozoitos de *B. bigemina* *in vitro* e *in vivo*

Para cumplir este objetivo, se procedió a la obtención de dos proteínas recombinantes: rGP45, utilizada como marcador de membrana de *B. bigemina*, y r*Bb*TCTP. Ambas proteínas recombinantes fueron utilizadas como inmunógenos para inducir la producción de anticuerpos específicos en animales: por una parte, se inmunizaron conejos Nueva Zelanda con rGP45 para generar anticuerpos anti-GP45, mientras que dos bovinos fueron inmunizados con r*Bb*TCTP para obtener anticuerpos anti-*Bb*TCTP. Los anticuerpos obtenidos fueron empleados en ensayos de inmunolocalización mediante microscopía confocal, con el propósito de determinar la distribución celular de *Bb*TCTP en las fases infectantes de *B. bigemina*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

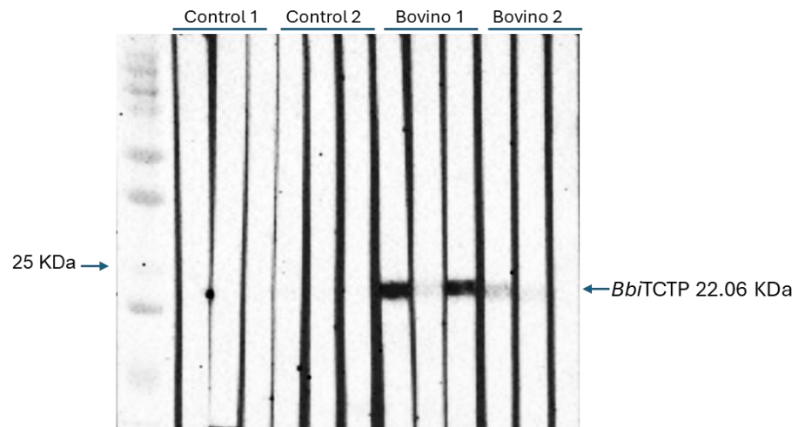
#### 3.4.1 Obtención de anticuerpos anti-*Bb*TCTP

El esquema de inmunización de bovinos con la proteína recombinante r*Bb*TCTP se repitió, por lo cual se procedió a una nueva purificación de dicha proteína mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas HisTrap FF (Figura 20A). La proteína recombinante r*Bb*TCTP purificada, se dializó, concentró y cuantificó (Figura 20B) para llevar a cabo la formulación del inmunógeno. Esta preparación fue utilizada para inmunizar a dos bovinos mediante un esquema de inmunización subcutáneo.



**Figura 20: Purificación de r*Bb*TCTP.** (A) Electroferograma de la purificación de r*Bb*TCTP por cromatografía de afinidad utilizando columnas his-trap. (B) SDS-PAGE teñido con azul de coomasie de r*Bb*TCTP purificada carril 1 y 2.

El esquema de inmunización inició el 23 de abril y concluyó el 26 de mayo del 2025. Una vez obtenidos los sueros, se evaluó su capacidad para reconocer la proteína recombinante, con el fin de utilizarlos posteriormente en la determinación de la localización subcelular de *Bb*TCTP en merozoítos, tanto *in vivo* como *in vitro*.



**Figura 21: Western blot de *rBb*TCTP:** Membrana de nitrocelulosa sensibilizada con *rBb*TCTP, incubada con sueros anti-*Bb*TCTP obtenidos de bovinos inmunizados, evaluados a distintas diluciones (1:500 y 1:1000). Los controles 1 y 2 corresponden a sueros preinmunes, mientras que los sueros de bovino 1 y bovino 2 representan muestras postinmunización.

En la Figura 21 se evidencia el reconocimiento de los anticuerpos generados como resultado del esquema de inmunización en bovinos. Tanto el bovino 1 como el bovino 2 generaron anticuerpos específicos contra *Bb*TCTP, lo que confirmó la eficacia del inmunógeno recombinante en inducir una respuesta humoral detectable mediante Western blot. Posteriormente, estos sueros fueron utilizados en ensayos de microscopía confocal.

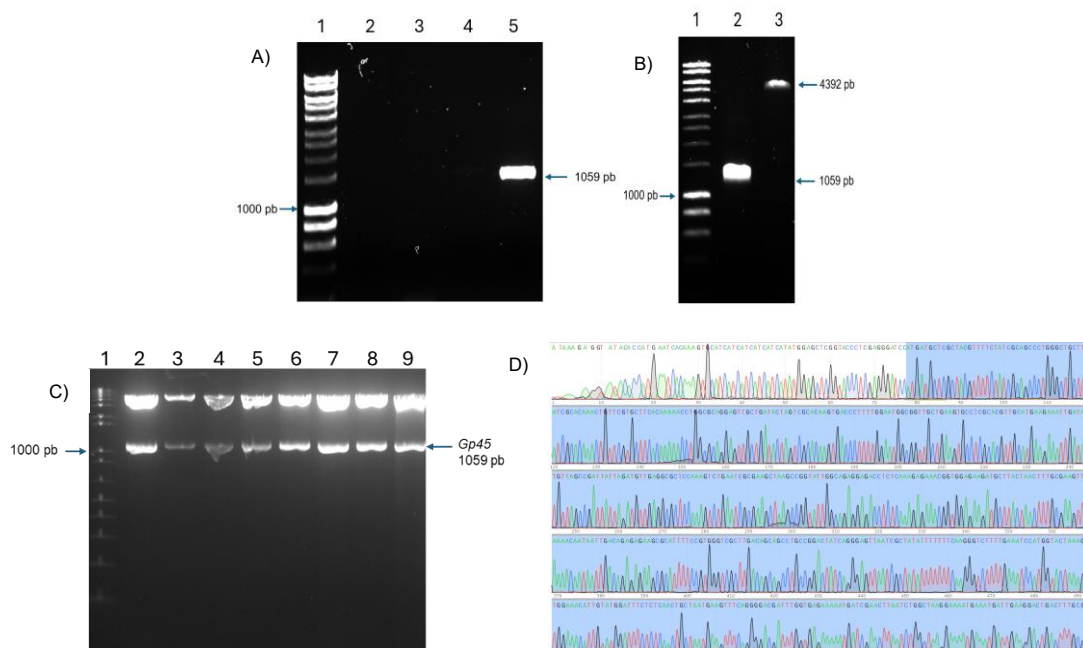
### 3.4.2 Clonación gen *gp45* en el vector de expresión pColdII y caracterización de clonas transformadas.

La proteína recombinante rGP45 de *B. bigemina* fue empleada en este objetivo como inmunógeno para la generación de anticuerpos en conejos, los cuales fueron posteriormente utilizados para la inmunolocalización de *Bb*TCTP en los merozoítos. A continuación, se presenta la obtención de la construcción pColdII/*gp45*.

En la Figura 22A se muestra la amplificación de la región codificante de *gp45* mediante RT-PCR, utilizando cDNA obtenido a partir de eritrocitos infectados con

*B. bigemina*. El amplicón fue restringido junto con el vector pColdII utilizando las enzimas *Hind*III y *Bam*HI, y ambos elementos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Figura 22B). La ligación se realizó utilizando T4 ligasa con sus respectivos controles, posteriormente la construcción pColdII/*gp45* se utilizó para transformar células competentes *Rosetta-gami*.

Las clonas obtenidas fueron analizadas por restricción para confirmar la inserción del gen (Figura 22C), y la identidad de la secuencia fue verificada por secuenciación (Figura 22D).



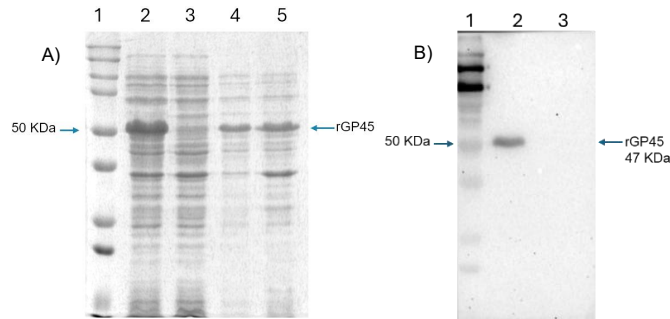
**Figura 22: Construcción y análisis de pColdII/*gp45* de *B. bigemina*.** A) RT-PCR de *gp45* Gel de agarosa al 1 % GelRed™ Nucleic Acid (1: Marcador de talla 1 Kb, 2: RT-, 3: H2O, 4:  $T_M=58$ , 5:  $T_M=57$ ). B) Preparación para la ligación de la construcción pColdII/*gp45*, Gel de agarosa al 1 %, 1: Marcador de 1Kb, 2: Amplicón *gp45*, 3: pColdII). C) Análisis las clonas por doble restricción con *Hind*III y *Bam*HI: Marcador de 1 Kb (1), Inserto liberado: pColdII/*gp45* (2-9). D) Electroferograma de la secuenciación de la región codificante de *gp45* (en azul se muestra la secuencia correspondiente a *gp45*).

### 3.4.3 Análisis de la inducción de rGP45 y su purificación mediante cromatografía de afinidad.

La proteína recombinante rGP45 fue expresada en *E. coli Rosetta-gami*. El ensayo de inducción se realizó con IPTG donde el análisis por SDS-PAGE gel al 12% del lisado celular total mostró una banda de aproximadamente 45 kDa, correspondiente

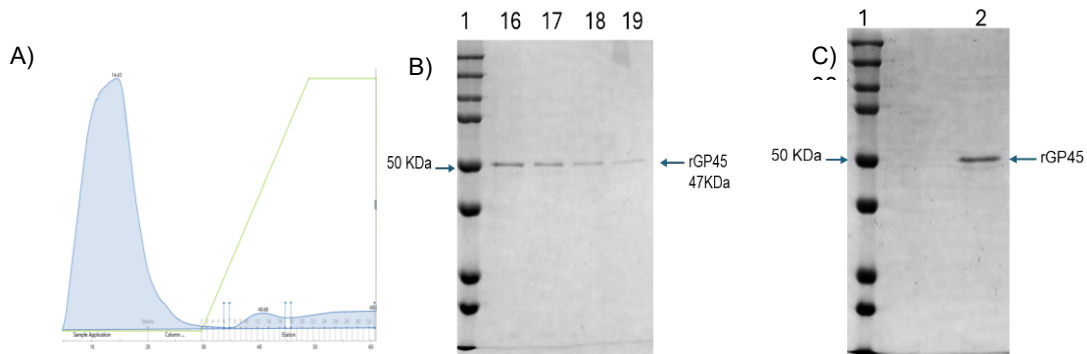
al peso molecular teórico de rGP45 (Figura 23A), lo que confirmó la inducción de la expresión.

Al mismo tiempo se realizó un ensayo de solubilidad donde se observó a rGP45 distribuida tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble. Adicional a este ensayo se determinó la identidad de las bandas vistas en el cultivo inducido mediante Western blot, utilizando anticuerpos antihistag (Fig. 23B).



**Figura 23: Análisis de la expresión de rGP45.** A) Ensayo de inducción y solubilidad de rGP45, SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 10 % teñido con azul de coomassie: Marcador de peso molecular (1), Cultivo inducido (2), Cultivo no inducido (3), Fracción soluble (4), Fracción insoluble (5). B) Western blot de rGP45 membrana de nitrocelulosa incubada con antihistag: Marcador de peso molecular (1), cultivo inducido (2), Cultivo no inducido (3).

Dado que rGP45 se encontraba en la fracción soluble, se procedió a su purificación bajo condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad, utilizando columnas HisTrap FF (Figura 24A). Las fracciones eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE gel al 10% (Figura 24B), observándose una banda única de aproximadamente 47 kDa correspondiente a esta proteína recombinante.



**Figura 24: Purificación de rGP45.** (A) Electroferograma de la purificación de rGP45 por cromatografía de afinidad utilizando columnas his-trap. B) Fracciones

purificadas de rGP45, SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie: Marcador de peso molecular (1) Fracciones 16 a 19. (C) SDS-PAGE teñido con azul de coomasie: marcador de peso molecular (1), fracciones después de dializar y concentrar (2).

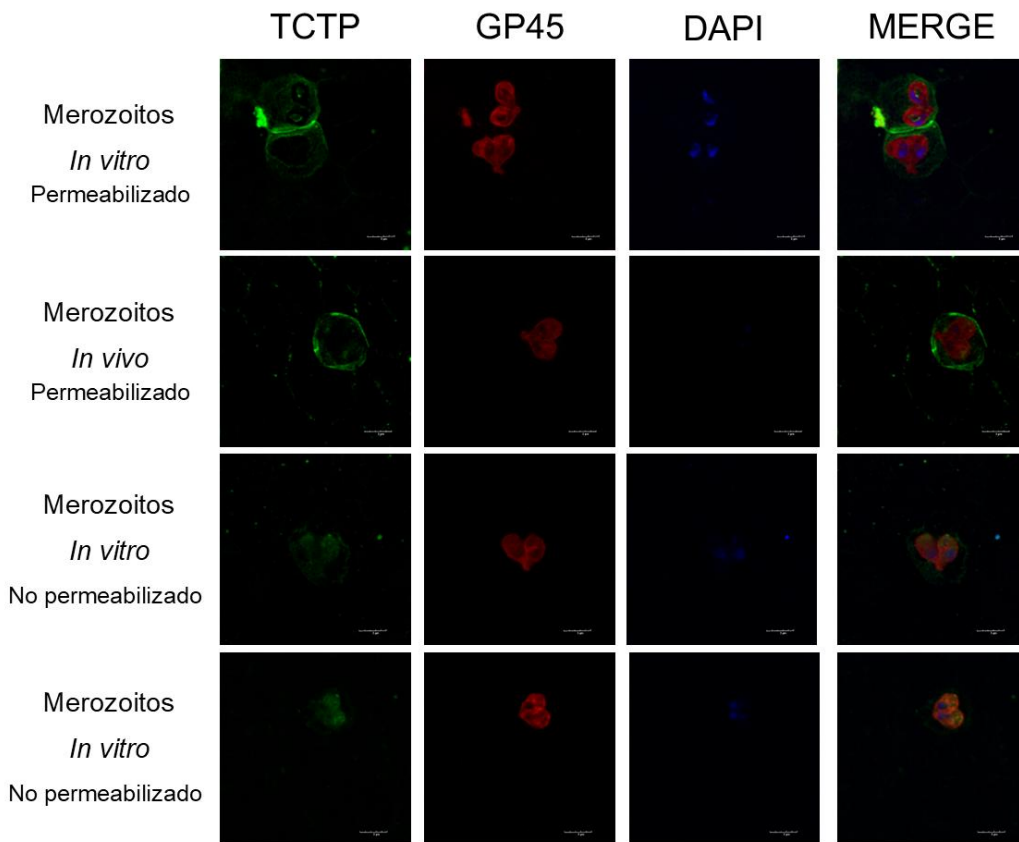
La proteína purificada fue posteriormente concentrada y dializada en centrifón (Figura 24C), se empleó para la formulación del inmunógeno.

#### **3.4.5 Obtención de anticuerpos anti-rGP45**

El esquema de inmunización de conejos con la proteína recombinante rGP45 se llevó a cabo entre el 14 de abril y el 22 de mayo del 2025. Se inmunizaron dos conejos de la raza Nueva Zelanda cada 21 días. Previo a cada inmunización, se realizaron extracciones de sangre para la obtención de suero. Una vez recolectado el suero, se llevó a cabo microscopía confocal con el objetivo de evaluar la colocalización de *Bb*TCTP utilizando los anticuerpos generados

### 3.4.6 Inmunolocalización de *Bb*TCTP en merozoitos *in vivo* e *in vitro* de *B. bigemina*

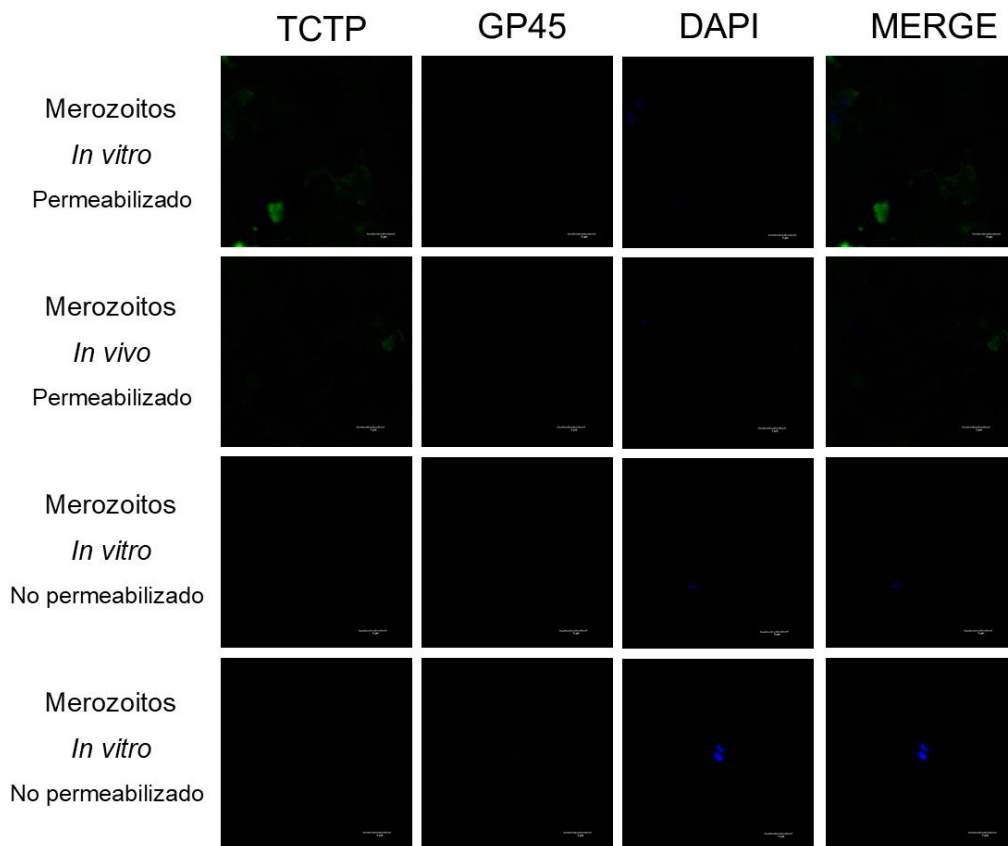
Como se mencionó anteriormente, GP45 es una proteína de *B. bigemina* que se encuentra en la membrana de los merozoitos, por ello fue utilizada al montar las laminillas para colocalizar a *Bb*TCTP en *B. bigemina*. Lo cual se muestra en la figura 25 panel A, donde vemos eritrocitos infectados con merozoitos *in vivo* como *in vitro*, permeabilizados y no permeabilizados.



**Figura 25 panel A: Localización de *Bb*TCTP en merozoitos *in vivo* e *in vitro*. Eritrocitos infectados con *B. bigemina* obtenidos de un bovino infectado (*in vivo*) y de cultivo celular (*in vitro*).** Inmunolocalización de la proteína *Bb*TCTP usando anticuerpos anti-*Bb*TCTP (verde), anti-GP45 (rojo) y el colorante DAPI (azul). La línea blanca indica la escala de cada imagen, correspondiente a una longitud de 3  $\mu$ m. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de escaneo láser confocal FLUOVIEW FV4000. Los controles negativos se presentan en la figura 20 panel B.

La localización de *Bb*TCTP se observa de manera intracelular tanto en las muestras *in vivo* como *in vitro*. Además, se evidencia una diferencia en la distribución

extracelular, lo que podría indicar que *Bb*TCTP se encuentra fuera del parásito y distribuida en el citoplasma del eritrocito infectado (figura 25 panel A) en comparación de los controles con sueros pre inmunes (figura 25 panel B). Mediante microscopía confocal, se detectó que *Bb*TCTP se localiza predominantemente en el citoplasma del parásito, con una señal adicional en el citoplasma del eritrocito infectado, lo que sugiere una posible secreción o liberación de la proteína hacia el entorno intracelular del hospedador.



**Figura 25 Panel B: Controles de muestras de merozoítos *in vivo* e *in vitro* incubadas con sueros preinmunes.** Eritrocitos infectados con *B. bigemina* obtenidos de un bovino infectado (*in vivo*) y de cultivo celular (*in vitro*). Laminillas correspondientes a los grupos control fueron incubadas con sueros preinmunes anti-*Bb*TCTP (verde), anti-GP45 (rojo) y el colorante DAPI (azul). La línea blanca indica la escala de cada imagen, correspondiente a una longitud de 3  $\mu$ m. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de escaneo láser confocal FLUOVIEW FV4000.

La distribución espacial refuerza la hipótesis de que *Bb*TCTP participa en procesos de interacción parásito-hospedador, y podría ser partícipe de la modulación del

ambiente celular o la evasión inmunológica. Cabe destacar que en los controles negativos no se observó una señal evidente, lo que confirma la especificidad de la detección y la ausencia reacción cruzada.

## Discusión

La proteína TCTP es una proteína multifuncional conservada estructuralmente entre organismos eucariontes como levaduras, plantas, humanos y parásitos como *P. falciparum* y *Babesia*. En *B. bigemina* se ha reportado en las bases de datos la secuencia putativa del gen y de la proteína de TCTP, se desconoce su estructura y patrón de expresión asociado a los estadios del parásito, por ello es importante describir las características de la proteína, y determinar si el patrón de expresión de *BbTCTP* es diferencial entre estadios infectantes de *B. bigemina*, con vistas al desarrollo de métodos más eficaces de control del parásito.

El análisis *in silico* de la proteína *BbTCTP* de *B. bigemina* mostró características estructurales conservadas, a los ortólogos de TCTP de parásitos tomando en cuenta lo reportado por Lagunas-Rangel (2022) en su análisis comparativo de ortólogos de TCTP en protozoarios de importancia humana. El modelo estructural de *BbTCTP* de *B. bigemina*, generado mediante AlphaFold2, mostró elementos tridimensionales que incluye cuatro hélices alfa, ocho láminas beta y una región desordenada, patrón que coincide con el observado en el cristal de *P. falciparum* (Bommer, U. A. 2017) y con las estructuras predichas de *T. gondii* y *Acanthamoeba castellanii*.

La presencia de una hélice alfa extra en *B. bigemina*, reportada en *P. falciparum*, coincide con los elementos estructurales exclusivos para el phylo Apicomplexa. Esta hélice podría estar relacionada con funciones importantes para el parásito, como la interacción con componentes del hospedador o la modulación de la respuesta inmune, tal como se ha propuesto para TCTP secretada por *Plasmodium* en su respectivo hospedante. Además, el dominio de dimerización localizado en el bucle flexible, una región estructuralmente variable entre las TCTP, pero funcionalmente importante, fue identificado en *B. bigemina*, lo cual es consistente con su naturaleza desordenada y probablemente con su papel en la dimerización de TCTP, estructura necesaria para las funciones extracelulares de esta proteína, como se ha descrito en ortólogos de otros parásitos (Lagunas-Rangel 2022).

En humanos se ha reportado a los primeros diez residuos de aminoácidos como los componentes fundamentales en el dominio de transducción de proteínas (<sup>1</sup>Met,Ile,Ile,Trp,Arg,Asp,Leu,Ile,Ser,His<sup>10</sup>) importantes para la interacción e internalización de TCTP en células B, este dominio está compuesto por residuos claves que componen un núcleo hidrofóbico de interacción con la membrana compuesto por la Met<sup>1</sup>, Ile<sup>2</sup> e Ile<sup>3</sup>, Asp<sup>6</sup> Leu<sup>7</sup> mientras que los residuos polares como la Tyr<sup>4</sup> y la Arg<sup>5</sup> son indispensables para la interacción a través de las membranas celulares y la entrada de TCTP a la células B (Maeng & Lee, 2022). En la secuencia de *Bb*TCTP (<sup>1</sup>Met,Leu,Val,Tyr,Lys,Asp,Leu,Phe,Thr<sup>9</sup>), se observan residuos de aminoácidos con propiedades bioquímicas similares a los residuos de TCTP de humanos, como los componentes de un núcleo hidrofóbico Met<sup>1</sup>, Leu<sup>2</sup>, Val<sup>3</sup>, Asp<sup>6</sup>, Leu<sup>7</sup> y los residuos Tyr<sup>4</sup> y Lys<sup>5</sup> similares a la Tyr<sup>4</sup> y la Arg<sup>5</sup> encargados de la internalización, por lo que estos 10 primeros residuos de aminoácidos podrían tener una función similar en cuanto a la interacción con células del sistema inmune. En *P. falciparum* se ha reportado que la recombinante *Pf*TCTP (Pf= *P. falciparum*), tiene un mayor porcentaje de incorporación a células B y un efecto negativo en la proliferación de estas células (Calderón-Pérez *et al.*, 2014), respecto a la TCTP humano.

El estudio de Eichhorn *et al.* (2012) reportó que la artemisinina se une a regiones específicas de *Pf*TCTP, particularmente entre los residuos de aminoácidos que forman parte de los dominios implicados en regulación celular y respuesta inmunológica. La superposición estructural entre *Bb*TCTP de *B. bigemina* y la estructura cristalográfica de *Pf*TCTP (PDB: 3P3K) arrojó un valor de RMSD de 0.500 Å, lo que indica una alta similitud espacial entre estas proteínas. Dado que las regiones de unión de artemisinina en *Pf*TCTP se localizan dentro de elementos estructurales bien caracterizados como la alfa hélice extra, la conservación de estos elementos en *B. bigemina* sugiere que *Bb*TCTP podría tener funciones similares. Además, Eichhorn *et al.* descartaron que la unión del fármaco dependa exclusivamente del residuo de cisteína (C14), lo que amplía el número de residuos donde TCTP podría ser farmacológicamente relevante (Eichhorn *et al.*, 2012).

El alineamiento múltiple de secuencias entre TCTP de *B. bigemina*, apicomplejos y *B. taurus* permitió identificar residuos conservados que podrían estar implicados en funciones estructurales y celulares (mencionadas anteriormente). La conservación de estos residuos en *B. bigemina* sugiere que su *BbTCTP* podría desempeñar roles similares a los observados en otros parásitos, incluyendo la evasión de la respuesta inmune mediante mecanismos de mimetismo molecular o interferencia con la señalización del hospedador.

Finalmente, el análisis filogenético mostró a *B. bigemina* dentro de un clado monofilético junto a otras especies del género *Babesia* y cercano a especies del género *Theileria*. Esta agrupación es coherente con la filogenia del filo Apicomplexa y con los patrones observados en el estudio comparativo de TCTP en protozoarios humanos. Aunque *Plasmodium* y *Babesia* se agrupan en clados distintos, ambos comparten una arquitectura estructural conservada, lo que sugiere una función que se mantiene entre los apicomplexa (Lagunas-Rangel, 2022).

Los valores mayores de la expresión de *tctp* de *B. bigemina* fueron detectados en merozoítos *in vivo*, seguida por los merozoítos *in vitro*, y una expresión mucho menor en los esporozoítos. Estos resultados sugieren que *Bbitctp* está regulada positivamente durante la fase asexual, que se desarrolla en los eritrocitos, en la cual existe una interacción con el hospedante, y que su expresión se reprime durante el desarrollo de los estadios sexuales en la garrapata vector.

En la literatura solo hay un trabajo reportado sobre la expresión diferencial de *tctp* en otros parásitos como es el caso de *T. brucei*, donde se han identificado dos parálogos de TCTP (*TCTP1* y *TCTP2*) que se expresan específicamente según la etapa del ciclo de vida de parásito: *TCTP1* se expresa exclusivamente en la forma procíclica y *TCTP2* en el estadio sanguíneo (Jojic *et al.*, 2018). Además, en *T. brucei*, TCTP es esencial para la progresión del ciclo celular, la recuperación post estrés térmico y la citocinesis (Jojic *et al.*, 2018).

Los resultados del análisis de la expresión de *Bbitctp* a partir de los intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina*, mostraron una regulación negativa de *Bbitctp*. En este ensayo los valores mayores de la expresión de *Bbitctp* se

detectaron a las 0 h post repleción, esto se puede deber a que en el lumen del intestino de la garrapata una parte de merozoítos y gametocitos comienzan a liberarse de los eritrocitos y probablemente se detectó el remanente de estos, ya que a que las 24 h, 48 h y 72 h, comienza el desarrollo de las etapas sexuales del parásito y la invasión a los tejidos de la garrapata (Mosqueda *et al.*, 2012). La expresión de *Bbitctp* en los estadios de *B. bigemina* dentro de la garrapata a distintos tiempos fue consistentemente subexpresada en comparación de los estadios en el hospedante vertebrado, lo que sugiere una represión transcripcional durante el desarrollo sexual y la invasión de *B. bigemina* al vector. Esta subexpresión contrasta con la sobreexpresión observada en los merozoítos, donde *Bbitctp* podría estar implicado en procesos de proliferación, evasión inmunológica e invasión eritrocítica en el bovino (Calderón-Pérez *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2001).

La cuantificación de la proteína *BbTCTP* mediante ELISA indirecta reveló diferencias significativas en su abundancia entre las fases infectantes de *B. bigemina*, siendo mayor en los merozoítos *in vivo*, seguida por los merozoítos cultivados *in vitro*, y con niveles mínimos en los esporozoítos. Esta tendencia proteica se corresponde con los niveles de expresión de *Bbitctp*, es decir que la traducción está sucediendo de manera proporcional a los niveles del mensajero de *Bbitctp*, el cual muestra ser estable en esos estadios (Cenik *et al.*, 2015) lo que refuerza la hipótesis de que *BbTCTP* puede desempeñar funciones relevantes en la fase intraeritrocítica del parásito.

La presencia de *BbTCTP* en los merozoítos *in vitro*, aunque se observó menor cantidad respecto a los merozoítos *in vivo*, indica que la expresión se mantiene en estas condiciones, la menor abundancia de la proteína detectada *in vitro* se puede deber a que el parásito no enfrenta la presión ejercida por el sistema inmune del hospedante, sin embargo podría estar implicada en la invasión al eritrocito, por ello se detectan niveles de expresión y abundancia de la proteína en los merozoitos *in vitro*, a pesar de la ausencia del sistema inmune del bovino, lo cual se sustenta del trabajo de tesis realizado por De la Cruz González, V. G. (2023), donde se demostró, mediante un ensayo de neutralización *in vitro* con anticuerpos dirigidos contra

péptidos de *Bb*TCTP, una reducción significativa en el porcentaje de eritrocitos parasitados, por otro lado, la baja expresión de *Bb*TCTP en esporozoítos indica una regulación negativa durante los estadios sexuales de *B. bigemina*, donde no se requiere la expresión de *Bbitctp* lo que se corresponde con los resultados obtenidos en los ensayos cuantitativos de la expresión de *Bbitctp*.

En *B. bovis*, TCTP ha sido identificado como un antígeno inmunogénico que participa en el establecimiento de la infección aguda y contiene epítomos B, además se ha observado que la inmunización con TCTP de *B. bovis* recombinante genera anticuerpos capaces de reconocer la proteína nativa en merozoítos, y que estos anticuerpos tienen capacidad neutralizante en ensayos *in vitro* (Pérez-Almeida *et al.*, 2021). La implicación directa de TCTP en la fase infectante y la capacidad para inducir respuesta humoral refuerzan su relevancia como blanco inmunológico y una proteína importante del estadio asexual de *B. bigemina*.

La localización de *Bb*TCTP observada mediante microscopía confocal refuerza la posible participación en procesos de interacción parásito-hospedador. En la figura 20, panel A, se evidencia que *Bb*TCTP se encuentra predominantemente en el citoplasma del parásito tanto en muestras *in vivo* como *in vitro*, lo que sugiere una función intracelular, estas funciones intracelulares de *Bb*TCTP pueden ser similares a las reportadas para *T. brucei*, donde TCTP regula procesos intracelulares esenciales como la citocinesis, la morfogénesis celular, la homeostasis de organelos y la respuesta al estrés térmico (Jojic *et al.*, 2018). En *T. gondii*, TCTP es crucial para la invasión, adhesión, replicación y permanencia intracelular del parásito (Zheng *et al.*, 2018). En *D. discoideum*, TCTP controla el crecimiento, la morfología celular, la organización del citoesqueleto y la transición entre estados unicelulares y multicelulares (Kumar *et al.*, 2020).

Por otra parte, la presencia adicional de señal de *Bb*TCTP en el citoplasma del eritrocito infectado indica una posible secreción de la proteína hacia el citoplasma del eritrocito o al medio extracelular del hospedante, lo cual podría estar relacionado con la modulación del sistema inmune. De manera general TCTP no tiene péptido señal para ser secretada de la célula, así que probablemente es secretada por vías

no canónicas como la secreción en micro vesículas tal como se ha reportado para *P. falciparum* (Balmer, E. A., & Faso, C. 2021). Además, en *P. falciparum*, la proteína *PfTCTP* cumple funciones clave que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la infección. También se ha identificado como un homólogo funcional del factor liberador de histamina (HRF) humano (MacDonald *et al.*, 2001). *PfTCTP* ha sido detectada en el plasma de pacientes con malaria leve y grave, y se ha demostrado que estimula la liberación de histamina por basófilos y la secreción de IL-8 por eosinófilos, promoviendo respuestas inflamatorias que podrían favorecer al establecimiento de la infección (MacDonald *et al.*, 2001; Pelleau *et al.*, 2012). Además, como se mencionó anteriormente, *PfTCTP* se incorpora más eficientemente en linfocitos B humanos que el homólogo humano, regulando negativamente la proliferación de estas células, lo que sugiere un mecanismo de mimetismo molecular que interfiere con la respuesta inmune (Calderón-Pérez *et al.* 2014).

Estos últimos resultados sugieren que *BbTCTP* podría desempeñar un papel como componente funcional dentro del parásito, y como posible modulador extracelular del sistema inmune del hospedante.

En conjunto, los resultados obtenidos en *B. bigemina* respaldan la hipótesis de que *BbTCTP* cumple funciones críticas durante las fases infectivas que se llevan a cabo en el hospedante bovino, posiblemente relacionadas con la proliferación, la modulación inmunológica y la adaptación celular. La subexpresión observada en esporozoítos y en los estadios sexuales en garrapatas podría implicar que *BbTCTP* no es necesaria para la invasión del vector.

## Conclusiones

- ❖ El gen *Bbitctp* se expresa más abundantemente en los merozoítos en condiciones *in vivo* e *in vitro*, en comparación con los esporozoítos, lo que sugiere una regulación positiva asociada al establecimiento de la infección en el hospedante bovino.
- ❖ La abundancia de la proteína *BbTCTP*, determinada mediante ELISA indirecta, mostró una tendencia concordante con los niveles de mRNA, siendo más elevada en los merozoítos *in vivo*.
- ❖ El análisis de inmunolocalización reveló que *BbTCTP* se encuentra predominantemente en el citoplasma del parásito, con una señal adicional en el citoplasma y en la membrana del eritrocito infectado. La ausencia de señal en los controles negativos confirma la especificidad del reconocimiento por los anticuerpos utilizado.

## Perspectivas del proyecto

- ❖ Evaluación del potencial inmunogénico de *Bb*TCTP como candidato vacunal.
- ❖ Caracterización del mecanismo de secreción o exportación de *Bb*TCTP.
- ❖ Validación funcional de *Bb*TCTP como posible factor de virulencia o proteína de interacción parásito-hospedante, mediante ensayos de silenciamiento (ARNi) o delección específica (CRISPR-Cas), que permitan evaluar su impacto en la viabilidad y capacidad infectiva de *B. bigemina*.
- ❖ La detección de *Bb*TCTP en suero de bovinos infectados con *B. bigemina* representa una línea prometedora para el desarrollo de herramientas diagnósticas sensibles y específicas.

## Referencias:

1. Abbas, M. N., Jmel, M. A., Mekki, I., Dijkgraaf, I., & Kotsyfakis, M. (2023). Recent Advances in Tick Antigen Discovery and Anti-Tick Vaccine Development. *International Journal of Molecular Sciences*
2. Acunzo, J., Baylot, V., So, A., & Rocchi, P. (2014). TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 40(6), 760–769
3. Allred, D. R. (1995). Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the parasite world. *Parasitology Today*, 11(3), 100-105.
4. Allred, D. R. (2001). Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'?. *Microbes and infection*, 3(6), 481-491.
5. Allred, D. R. (2019). Variable and variant protein multigene families in *Babesia bovis* persistence. *Pathogens*, 8(2), 76.
6. Alonso-Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2022). *Rhipicephalus microplus*: biología, control y resistencia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
7. Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* spp. in persistently infected cattle. *Pathogens*, 8(3), 143.
8. Antunes, S., Rosa, C., Couto, J., Ferrolho, J., & Domingos, A. (2017). Deciphering *Babesia*-vector interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 429.
9. Assrir, N., Malard, F., & Lescop, E. (2017). Structural Insights into TCTP and Its Interactions with Ligands and Proteins. En A. Telerman & R. Amson (Eds.), *TCTP/tpt1 – Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease* (pp. 9–17). Springer.
10. Ayehu Menegsha, (2020). A Review on Bovine Babesiosis. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2640-1223
11. Balmer, E. A., & Faso, C. (2021). The road less traveled? Unconventional protein secretion at parasite–host interfaces. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 662711.

12. Barbour, A. G., & Restrepo, B. I. (2000). Antigenic variation in vector-borne pathogens. *Emerging infectious diseases*, 6(5), 449.
13. Bastos, R. G., Ueti, M. W., Knowles, D. P., & Scoles, G. A. (2010). The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & Vectors*, 3(1), 111
14. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247-S269.
15. Bommer, U. A. (2017). The translational controlled tumour protein TCTP: biological functions and regulation. *TCTP/tpt1-Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease*, 69-126.
16. Bommer, U.-A., & Kawakami, T. (2021). Role of TCTP in Cell Biological and Disease Processes. *Cells*, 10(9), 2290
17. Bossard, G., Bartoli, M., Fardeau, M.-L., Holzmüller, P., Ollivier, B., & Geiger, A. (2017). Characterization of recombinant *Trypanosoma brucei* gambiense Translationally Controlled Tumor Protein (*rTbgTCTP*) and its interaction with *Glossina* midgut bacteria. *Gut Microbes*, 8(5), 413–427.
18. Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 75-87.
19. Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., & Ruiz-Medrano, R. (2014). The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein (TCTP) is incorporated more efficiently into B cells than its human homologue. *PLoS One*, 9(1), e85514.
20. Cenik, C., Cenik, E. S., Byeon, G. W., Grubert, F., Candille, S. I., Spacek, D., & Snyder, M. P. (2015). Integrative analysis of ARN, translation, and protein levels reveals distinct regulatory variation across humans. *Genome research*, 25(11), 1610-1621.
21. Cucchi, U., Gianellini, L. M., De Ponti, A., Sola, F., Alzani, R., Patton, V., ... & Valsasina, B. (2010). Phosphorylation of TCTP as a marker for polo-like kinase-1 activity in vivo. *Anticancer research*, 30(12), 4973-4985.

22. Cuy-Chaparro, L., Reyes, C., Díaz-Guiot, E. V., Moreno-Pérez, D. A., & Patarroyo, M. A. (2023). Developing anti-babesia bovis blood stage vaccines: a new perspective regarding synthetic vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5219.
23. Cuy-Chaparro, L., Ricaurte-Contreras, L. A., Bohorquez, M. D., et al. (2022). Identification of *Babesia bovis* MSA-1 functionally constraint regions capable of binding to bovine erythrocytes. *Veterinary Parasitology*, 312, 109834.
24. De Waal, D. T., & Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 88-96.
25. Debierre-Grockiego, F., Smith, T. K., Delbecq, S., Ducouarnu, C., Lantier, L., Schmidt, J., ... & Cornillot, E. (2019). *Babesia divergens* glycosylphosphatidylinositols modulate blood coagulation and induce Th2-biased cytokine profiles in antigen presenting cells. *Biochimie*, 167, 135-144.
26. Eichhorn, T., Winter, D., Büchele, B., Dirdjaja, N., Frank, M., Lehmann, W. D., ... & Efferth, T. (2013). Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical pharmacology*, 85(1), 38-45.
27. Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., de Paula Moura, G., Sánchez, J., & Martins, C. E. N. (2022). Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(4), 101967.
28. Florin-Christensen, M., Schnittger, L., et al. (2014). Babesia: Molecular mechanisms of pathogenesis. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 1–11.
29. Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C., & McElwain, T. F. (2002). The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infection and immunity*, 70(7), 3566-3575.
30. Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563-1592.

31. Gaffar, F. R., Franssen, F. F., & de Vries, E. (2003). *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. *International journal for parasitology*, 33(14), 1595-1603.
32. Giglioti, R., Oliveira, H. N., Santana, C. H., Ibelli, A. M. G., Néó, T. A., Bilhassi, T. B., ... & Oliveira, M. C. S. (2016). *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 657-662.
33. Giglioti, R., Vercesi Filho, A. E., Domingos, A. G., da Silva, S. S., Cunha, R. C., Ibelli, A. M. G., ... & de Sena Oliveira, M. C. (2024). Detection and quantification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* using different target genes. *Research in Veterinary Science*, 168, 105122.
34. Gimenez, G., Magalhães, K. G., Belaunzarán, M. L., Poncini, C. V., Lammel, E. M., Cappa, S. G., ... & Isola, E. L. D. (2010). Lipids from attenuated and virulent *Babesia bovis* strains induce differential TLR2-mediated macrophage activation. *Molecular Immunology*, 47(4), 747-755.
35. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., & Valdez, R. A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite immunology*, 23(9), 463-471.
36. González Sáenz Pardo, J. R., & Hernández Ortiz, R. (2012). *Boophilus microplus*: current status of acaricide resistance on the Mexican American border and its impact on commerce. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 1-8.
37. González, V. G. D. L. C. (2023). Caracterización de la Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) en *Babesia bigemina* e identificación de epítomos B conservados e inmunogénicos.
38. Good, M. F., & Staniscic, D. I. (2020). Whole parasite vaccines for the asexual blood stages of Plasmodium. *Immunological Reviews*, 293(1), 270-282.

39. Gray, J. S., Estrada-Peña, A., & Zintl, A. (2019). Vectors of babesiosis. *Annual review of entomology*, 64, 149-165.
40. Hakimi, H., Ishizaki, T., Kegawa, Y., Kaneko, O., Kawazu, S. I., & Asada, M. (2019). Genome editing of *Babesia bovis* using the CRISPR/Cas9 system. *MSphere*, 4(3), 10-1128.
41. Hakimi, H., Yamagishi, J., Kawazu, S. I., & Asada, M. (2022). Advances in understanding red blood cell modifications by Babesia. *PLoS pathogens*, 18(9), e1010770.
42. Hidalgo-Ruiz, M., Mejía-López, S., Pérez-Serrano, R. M., et al. (2022). Babesia bovis AMA-1, MSA-2c and RAP-1 contain conserved B and T-cell epitopes, which generate neutralizing antibodies and a long-lasting Th1 immune response in vaccinated cattle. *Vaccine*, 40(6), 881–891
43. INIFAP. (2022). Estudio y control en garrapatas en el ganado bovino. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
44. Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia life cycle—when phylogeny meets biology. *Trends in parasitology*, 35(5), 356-368.
45. Jerzak, M., Gandurski, A., Tokaj, M., et al. (2023). Advances in Babesia vaccine development: An overview. *Pathogens*, 12(2), 300.
46. Jojic, B., Amodeo, S., & Ochsenreiter, T. (2018). The translationally controlled tumor protein TCTP is involved in cell cycle progression and heat stress response in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Microbial cell*, 5(10), 460.
47. Jojic, B., Amodeo, S., Bregy, I., & Ochsenreiter, T. (2018a). Distinct 3' UTRs regulate the life-cycle-specific expression of two TCTP paralogs in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 131, jcs206417.
48. Kumar, R., Maurya, R., & Saran, S. (2020). Investigating the role of translationally control tumor protein in growth, development and differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 742.

49. Lagunas-Rangel, F. A. (2022). Sequence analysis and comparison of TCTP proteins from human protozoan parasites. *Acta Parasitologica*, 67(2), 1024-1031.
50. Langdon, J. M., Vonakis, B. M., & MacDonald, S. M. (2004). Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1688(3), 232-236.
51. Lu, C., Li, Z., Zhang, W., Guo, H., Lan, W., Shen, G., ... & Zhao, P. (2022). SUMOylation of translationally regulated tumor protein modulates its immune function. *Frontiers in Immunology*, 13, 807097.
52. MacDonald, S. M. (2012). History of Histamine-Releasing Factor (HRF)/Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Including a Potential Therapeutic Target in Asthma and Allergy. In A. Telerman & R. Amson (Eds.), *TCTP/tpt1 - Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease* (pp. 291–308). Springer.
53. MacDonald, S. M. (2012). Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. *Jouarnl of asthma and allergy*, 51-59.
54. MacDonald, S. M. (2017). History of histamine-releasing factor (HRF)/translationally controlled tumor protein (TCTP) including a potential therapeutic target in asthma and allergy. *TCTP/tpt1-Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease*, 291-308.
55. MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., ... & Meshnick, S. R. (2001). Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10829-10832.
56. Maeng, J., & Lee, K. (2022). Protein transduction domain of translationally controlled tumor protein: characterization and application in drug delivery. *Drug Delivery*, 29(1), 3009-3021.

57. Martínez-García, G., Estrada, K., Lira-Amaya, J. J., Santamaria-Epinosa, R. M., López-Arellano, M. E., Sciutto-Conde, E. L., Rojas-Martínez, C., Álvarez-Martínez, J. A., Sánchez-Flores, A., & Figueroa-Millán, J. V. (2025). Comparative analysis of immune response genes induced by a virulent or attenuated strain of *Babesia bigemina*. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(2), 487.
58. Mosqueda Gualito, J. J., Falcón Neri, A., Ramos Aragón, J. A., Canto Alarcón, G. J., & Camacho-Nuez, M. (2012). Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 51-59
59. Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamú, G., & Cantó, G. J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518.
60. Munirathinam, G., & Ramaswamy, K. (2012). Sumoylation of human translationally controlled tumor protein is important for its nuclear transport. *Biochemistry research international*, 2012(1), 831940.
61. Nagano-Ito, M., & Ichikawa, S. (2012). Biological Effects of Mammalian Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) on Cell Death, Proliferation, and Tumorigenesis. *Biochemistry Research International*, 2012, Article ID 204960
62. Peel, D. S., Johnson, R. J., & Mathews Jr, K. H. (2012). Cow-calf beef production in Mexico. *Journal of Current Issues in Globalization*, 5(4), 495.
63. Pelleau, S., Diop, S., Dia Badiane, M., Vitte, J., Beguin, P., Nato, F., ... & Jambou, R. (2012). Enhanced basophil reactivities during severe malaria and their relationship with the *Plasmodium falciparum* histamine-releasing factor translationally controlled tumor protein. *Infection and immunity*, 80(8), 2963-2970.
64. Pérez-Almeida, C., Hernández-Silva, D. J., Hernández-Arvizu, E. E., Asada, M., Kawazu, S. I., Ueti, M. W., ... & Mosqueda, J. (2025). The Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), a Novel Antigen of *Babesia bovis*,

- Participates in the Establishment of Acute Infection and Contains Neutralizing B-Cell Epitopes. *Pathogens*, 14(5), 502.
65. Rathinasamy, V., Poole, W. A., Bastos, R. G., Suarez, C. E., & Cooke, B. M. (2019). Babesiosis vaccines: lessons learned, challenges ahead, and future glimpses. *Trends in parasitology*, 35(8), 622-635.
66. Ravindran, R., Hembram, P. K., Kumar, G. S., Kumar, K. G. A., Deepa, C. K., & Varghese, A. (2023). Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parasitology research*, 122(3), 691-704.
67. Rimal, S., Sah, R. K., Shakya, S., Acharya, M. M., & El-Dakhly, K. M. (2025). Bovine Babesiosis: A Clinical Review. *Mathews Journal of Veterinary Science*, 9(5), 1-17.
68. Rittipornlertrak, A., Namboopha, B., Muenthaisong, A., et al. (2022). Immunization of cattle with recombinant structural ectodomains I and II of *Babesia bovis* apical membrane antigen 1 [BbAMA-1(I/II)] induces strong Th1 immune response. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 917389.
69. Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sánchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), 335-342.
70. Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Villela, H. S., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso Sánchez, H., ... & García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Review. Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(1), 61-74.
71. Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E., & Trees, A. J. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(Supl.1), 1–15.
72. Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Control

- integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 279–289
73. Silva, M. G., Bastos, R. G., Laughery, J. M., et al. (2023). Vaccination of cattle with the *Babesia bovis* sexual-stage protein HAP2 abrogates parasite transmission by *Rhipicephalus microplus* ticks. *NPJ Vaccines*, 8, 140.
74. Smith, T., & Kilborne, F. L. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever (No. 1). US Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry.
75. Stich, R. W., Shoda, L. K., Dreewes, M., Adler, B., Jungi, T. W., & Brown, W. C. (1998). Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infection and immunity*, 66(9), 4130-4136.
76. Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 109–125.
77. Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit?. *International journal for parasitology*, 49(2), 183-197.
78. Suarez, C. E., Florin-Christensen, M., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C., & McElwain, T. F. (2000). Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infection and immunity*, 68(12), 6865-6870.
79. Taylor, K. J., Van, T. T. H., MacDonald, S. M., Meshnick, S. R., Fernley, R. T., Macreadie, I. G., & Smooker, P. M. (2015). Immunization of mice with *Plasmodium* TCTP delays establishment of *Plasmodium* infection. *Parasite immunology*, 37(1), 23-31.
80. Todorovic, R. A., López, L. A., López, A. G., & González, E. F. (1975). Bovine babesiosis and anaplasmosis: Control by premunition and chemoprophylaxis. *Experimental Parasitology*, 37(1), 92–104.

81. Wodaje, A., Adudna, B., & Hamid, M. (2019). A review on bovine babesiosis. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 6(1), 63-70.
82. Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-Function Relationship of TCTP. En A. Telerman & R. Amson (Eds.), *TCTP/tpt1 – Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease* (pp. 47–56). Springer.
83. Yarm, F. R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Molecular and cellular biology*, 22(17), 6209-6221.
84. Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 22-32.
85. Zheng, J., Chen, Y., Li, Z., Cao, S., Zhang, Z., & Jia, H. (2018). Translationally controlled tumor protein is required for the fast growth of *Toxoplasma gondii* and maintenance of its intracellular development. *The FASEB Journal*, 32(2), 906-919.
86. Maeng, J., & Lee, K. (2022). Protein transduction domain of translationally controlled tumor protein: Characterization and application in drug delivery. *Drug Delivery*, 29(1), 3009-3021.

## Anexos

Anexo 1: Tabla con secuencias de TCTP utilizadas para la construcción del árbol filogenético de la figura 8 C.

Especie	Accession Number
<i>Adineta steineri</i>	CAF0730184.1
<i>Amoebophilidium protococcarum</i>	KAI3633020.1
<i>Amoebophilidium protococcarum</i>	KAI3641277.1
<i>Anaeramoeba flamelloides</i>	KAJ3430405.1
<i>Anaeramoeba flamelloides</i>	KAJ3444100.1
<i>Babesia bigemina</i>	XP_012768057.1
<i>Babesia bovis T2Bo</i>	XP_001610402.1
<i>Babesia caballi</i>	GIX66225.1
<i>Babesia divergens</i>	KAK1934895.1
<i>Babesia duncani</i>	KAK2197249.1
<i>Babesia gibsoni</i>	KAK1442123.1
<i>Babesia microti strain RI</i>	XP_012647937.1
<i>Babesia ovata</i>	XP_028865997.1
<i>Babesia ovis</i>	GFE53679.1
<i>Babesia sp. Xinjiang</i>	XP_028870200.1
<i>Besnoitia besnoiti</i>	XP_029215456.1
<i>Blepharisma stoltei</i>	CAG9329875.1
<i>Cardiosporidium cionae</i>	KAF8821033.1
<i>Caulochytrium protostelioides</i>	RKP03062.1
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	OII76468.1
<i>Cryptosporidium bovis</i>	KAH7649783.1
<i>Cryptosporidium canis</i>	KAJ1606166.1
<i>Cryptosporidium felis</i>	KAF7459210.1
<i>Cryptosporidium hominis TU502</i>	XP_668673.1
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	POM84409.1
<i>Cryptosporidium muris RN66</i>	XP_002141641.1

<i>Cryptosporidium parvum Iowa II</i>	XP_626765.1
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	KAH8741888.1
<i>Cryptosporidium</i> sp. <i>chipmunk</i> <i>genotype I</i>	KAH8585081.1
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	TRY52662.1
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	XP_028872964.1
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	KAK6589158.1
<i>Cyanidiococcus yangmingshanensis</i>	KAF6004781.1
<i>Cyanidioschyzon merolae strain 10D</i>	XP_005538060.1
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	XP_022592776.1
<i>Cystoisospora suis</i>	PHJ23507.1
<i>Eimeria acervulina</i>	XP_013247987.1
<i>Eimeria brunetti</i>	CDJ52797.1
<i>Eimeria maxima</i>	XP_013334322.1
<i>Eimeria mitis</i>	XP_013350336.1
<i>Eimeria necatrix</i>	XP_013439832.1
<i>Eimeria tenella</i>	XP_013235093.1
<i>Galdieria partita</i>	GJQ15932.1
<i>Galdieria sulphuraria</i>	XP_005702445.1
<i>Galdieria yellowstonensis</i>	KAK4524630.1
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004032352.1
<i>Macrostomum lignano</i>	PAA86325.1
<i>Macrostomum lignano</i>	PAA87426.1
<i>Monocercomonoides exilis</i>	KAH7826455.1
<i>Neospora caninum Liverpool</i>	XP_003886276.1
<i>Paramecium octaurelia</i>	CAD8175588.1
<i>Piliocolobus tephrosceles</i>	VWU48843.1
<i>Planoprotostelium fungivorum</i>	PRP87318.1
<i>Plasmodium berghei ANKA</i>	XP_034422313.1
<i>Plasmodium chabaudi</i>	AAP74554.1

<i>Plasmodium chabaudi adami</i>	SCM22186.1
<i>Plasmodium chabaudi adami</i>	SCN60948.1
<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	XP_742494.1
<i>Plasmodium cynomolgi strain B</i>	XP_004222904.1
<i>Plasmodium falciparum</i>	AAZ73158.1
<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	3P3K_A
<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	XP_001351667.1
<i>Plasmodium falciparum FCH/4</i>	ETW28067.1
<i>Plasmodium fragile</i>	XP_012337815.1
<i>Plasmodium gaboni</i>	XP_018643045.1
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	XP_028530684.1
<i>Plasmodium gonderi</i>	XP_028544036.1
<i>Plasmodium inui San Antonio 1</i>	XP_008815080.1
<i>Plasmodium knowlesi</i>	P84152.1
<i>Plasmodium knowlesi strain H</i>	XP_002259707.1
<i>Plasmodium malariae</i>	XP_028859798.1
<i>Plasmodium ovale curtisi</i>	SBS84564.1
<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	SBT36458.1
<i>Plasmodium reichenowi</i>	XP_012761625.1
<i>Plasmodium relictum</i>	XP_028533562.1
<i>Plasmodium sp. gorilla clade G3</i>	SOV74352.1
<i>Plasmodium vinckei</i>	CAD2108284.1
<i>Plasmodium vinckei brucechwatti</i>	CAD2094841.1
<i>Plasmodium vinckei lentum</i>	CAD2094860.1
<i>Plasmodium vinckei petteri</i>	ADG01609.1
<i>Plasmodium vinckei petteri</i>	EUD73218.1
<i>Plasmodium vinckei vinckei</i>	XP_008624482.1
<i>Plasmodium vivax</i>	XP_001613845.1
<i>Plasmodium yoelii</i>	AAD28740.1
<i>Plasmodium yoelii</i>	XP_725272.1

<i>Pneumocystis canis</i>	KAG4303156.1
<i>Pneumocystis murina</i> B123	XP_007874558.1
<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	KRW99548.1
<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y-17804	XP_019026239.1
<i>Streblomastix strix</i>	KAA6388004.1
<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW75000.1
<i>Tetrahymena thermophila</i> SB210	XP_001025866.1
<i>Theileria annulata</i>	XP_954451.1
<i>Theileria equi</i> strain WA	XP_004829997.1
<i>Theileria orientalis</i>	UKJ87786.1
<i>Theileria orientalis</i>	UKK00197.1
<i>Theileria orientalis</i> strain Shintoku	XP_009689088.1
<i>Theileria parva</i> strain Muguga	XP_765803.1
<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	XP_002367410.1
<i>Vitrella brassicaformis</i> CCMP3155	CEM11640.1

## Anexo 2: Actividades de retribución social.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LMVZ  
LICENCIATURA EN  
MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

OTORGAN LA PRESENTE

# CONSTANCIA

**A: Mario Gahel Montiel González**

Por su participación como ponente de cartel, en el V Simposio Internacional Garrapatas y enfermedades que transmiten: "Acciones locales inmediatas para la preparación ante cambios globales", del 16 al 18 de octubre del 2024

Santiago de Querétaro, Querétaro.  
"SALUD, NATURALEZA Y SUSTENTABILIDAD"

Mtra. Kruskala Karenia Caltzontzin Fernández  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
FCN

Dr. José Guadalupe Gómez Solo  
DIRECTOR  
FCN

Dr. Konigsmay Escobar García  
COORDINADOR  
LIC. EN MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA

CONAHCYT CTR LINVAS PROBIOTEK SAMA SENASICA SMI

Detección Molecular & Asesoría Analítica

UAQ | CRECER EN LA DIVERSIDAD

World Organisation for Animal Health  
Founded in OIE

**UACM**  
Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México  
NADA HUMANO ME ES AJENO

**Genómicas**  
hoy

POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS

## La proteína TCTP de *Babesia bigemina*: Un blanco prometedor en la lucha contra la babesiosis bovina.

Mario Gahel Montiel González<sup>1\*</sup>, Jacqueline E. Castañeda-Ortiz<sup>1</sup>, Mariana Amaro Ibarra<sup>1</sup>,  
Minerva Camacho Nuez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

✉ [mgah.mont@gmail.com](mailto:mgah.mont@gmail.com)