



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**IDENTIFICACIÓN DE REGIONES DE UNIÓN DE PROTEÍNAS DE *Babesia bovis* A  
ERITROCITOS BOVINOS**

**IDENTIFICATION OF *Babesia bovis* PROTEIN BINDING REGIONS TO BOVINE  
ERYTHROCYTES**

**LAURA ESPERANZA CUY CHAPARRO M.D.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA  
BOGOTÁ, COLOMBIA  
2023**

**Identificación de Regiones de Unión de Proteínas de *Babesia bovis* a Eritrocitos Bovinos**

**Identification Of *Babesia bovis* Protein Binding Regions To Bovine Erythrocytes**

**Laura Esperanza Cuy Chaparro M.D.**

Tesis de Doctorado presentada como requisito para optar al título de:  
**Doctora en Biotecnología**

Director:

**Darwin Andrés Moreno Pérez M.Sc., Dr.Sc.**

Codirector:

**Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez M.D., Dr.Sc.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C., COLOMBIA**

**2023**

## DEDICATORIA

*A Dios, por ser mi guía constante.  
A mis padres, por su infinito amor y confianza.  
A mis hermanos, aquellos cómplices insuperables.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por los planes que han cambiado mi vida, por las respuestas no esperadas, por las pruebas en el camino, porque cada experiencia me permite vivir agradecida con el aquí y ahora.

A mi familia, mi mayor tesoro, por su cariño y apoyo incondicional, ya que son el principal cimiento para la construcción de mi vida personal y profesional.

A mi director, **Andrés Moreno**, por la oportunidad de haber hecho parte de su equipo de trabajo; por su calidad académica y pasión por el conocimiento y la ciencia, cualidades que han sido inspiradoras para mi desarrollo académico. Gracias por la paciencia y el constante apoyo en cada paso en este proceso de formación doctoral.

Al **Dr. Manuel Alfonso Patarroyo**, por su incalculable ayuda y acertada orientación, rigurosidad y discusión científica, lo que ha permitido que esta tesis llegara a buen término; por ser un ejemplo de tenacidad, perseverancia y por enseñarme que las mentes grandes hablan de ideas. La vida es más que un acúmulo de experiencias académicas, implica la suma de circunstancias buenas y malas, muchas gracias por su consejo en momentos difíciles y aún más importante, por permitirme hacer parte de su proyecto de vida.

¡Cuanto orgullo y gratitud por estos dos personajes!

Al jefe, **Manuel Elkin Patarroyo**, por abrir las puertas de su Instituto y tener el privilegio de formarme en uno de los mejores centros de investigación del país.

A mis amigos del alma: **David, Jessi, Anny y Marce**. ¡Mil gracias por siempre estar a mi lado!, por celebrar mis éxitos y ser incondicionales en los momentos de angustia. Ustedes siempre encienden una chispa en mi alma.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano, especialmente a aquellas que pertenecieron y las que pertenecen al grupo funcional de Biología Molecular, hicieron parte de este proyecto de investigación.

A todos mis estudiantes de pregrado por su valiosa colaboración.

A **César Reyes**, por su compañía y constante crítica constructiva.

A la **Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC** y la **Universidad Nacional de Colombia** por facilitar los espacios físicos y las herramientas académicas para cursar el programa de Doctorado. A la profesora Sonia Ospina y al profesor Daniel Uribe por su colaboración académica y administrativa, que permitieron culminar con este proceso de formación.

*Un final para un comienzo.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. CAPITULO I</b> .....	<b>5</b>
1.1. JUSTIFICACIÓN .....	5
1.2. MARCO CONCEPTUAL .....	6
1.2.1. Epidemiología de la Babesiosis .....	6
1.2.2. Agente etiológico y vectores .....	7
1.2.3. Ciclo de vida .....	8
1.2.4. Invasión de los merozoítos de <i>B. bovis</i> a los eritrocitos bovinos .....	9
1.2.5. Desarrollo clínico de la enfermedad .....	11
1.2.6. Respuesta inmune frente a <i>B. bovis</i> .....	12
1.2.7. Vacunas contra <i>B. bovis</i> .....	12
1.2.8. Enfoque funcional .....	13
1.3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	15
1.3.1. Objetivo general.....	15
1.3.2. Objetivos específicos.....	15
1.4. INTRODUCCION A LOS CAPÍTULOS II al V .....	16
<b>2. CAPÍTULO II</b> .....	<b>17</b>
<b>3. CAPÍTULO III</b> .....	<b>18</b>
<b>4. CAPÍTULO IV</b> .....	<b>19</b>
<b>5. CAPÍTULO V</b> .....	<b>20</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>26</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>27</b>
<b>1. ANEXOS</b> .....	<b>35</b>
10.1 Aval de los Comités de Bioética .....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Países con reporte de babesiosis bovina para el año 2022.....	6
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>B. bovis</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de las etapas del proceso de invasión de merozoítos de <i>B. bovis</i> a sus células hospederas.....	10

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Abreviatura

AMA-1  
CLAG  
FIDIC  
FINAGRO  
GASA-1  
GPI  
HABP  
ICA  
MSA-1  
MSPs  
OMSA  
ON  
PvRBP2b  
RAP-1  
Rh5  
RONS  
TRAP2  
VMSA

### Término

Apical Membrane Antigen 1  
Cytoadherence linked asexual gene  
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia  
Fondo para el financiamiento del sector agropecuario  
GPI-Anchored Surface Antigen-1  
Glycosylphosphatidylinositol  
High Activity Binding Peptide  
Instituto Colombiano Agropecuario  
Merozoite Surface Antigen 1  
Merozoite Surface Proteins  
Organización Mundial de Sanidad Animal  
Óxido nítrico  
*Plasmodium vivax* Reticulocyte-binding protein 2b  
Rhoptry Associated Protein 1  
Reticulocyte-binding protein homolog 5  
Rhoptry Neck Proteins  
Thrombospondin-Related Anonymous Protein 2  
Variable Merozoite Surface Antigen

## RESUMEN

La babesiosis es una de las enfermedades veterinarias más importantes transmitidas por garrapatas que afecta principalmente a animales salvajes y domésticos, y recientemente es considerada como una zoonosis emergente que se distribuye en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. *Babesia bovis*, uno de los hemoprotozoarios responsable de la babesiosis bovina, es el agente más patógeno del género *Babesia* que causa un impacto negativo en la industria ganadera dada las altas tasas de morbimortalidad que genera.

Las principales estrategias de control y tratamiento de la babesiosis se han centrado en el uso de quimioterapéuticos dirigidos contra el parásito o de acaricidas contra el vector. Sin embargo, ante la aparición de resistencia a esta clase de productos químicos, la vacunación con organismos vivos atenuados de *B. bovis* se ha convertido en el principal método de control de la infección. Aunque el uso de este tipo de vacunas ha estado asociado con niveles parciales de protección, éstas tienen importantes limitaciones como una vida útil corta, riesgo de reversión de la virulencia, contaminación con otros patógenos transmitidos por sangre, falla en la inducción de inmunidad protectora contra diferentes cepas y la pérdida de inmunogenicidad, lo que ha limitado la comercialización de la vacuna. Por lo tanto, se requieren otras estrategias alternas para mejorar las condiciones de sanidad animal bovina.

El conocimiento de la biología básica del parásito en relación con la caracterización de las moléculas que éste usa para invadir a sus células diana es esencial para diseñar una medida de control eficaz contra la enfermedad, como es el caso de las vacunas. Por ende, este proyecto se encaminó a identificar proteínas de *B. bovis* o regiones derivadas de ellas que tengan capacidad de unirse a los eritrocitos bovinos como alternativa para contribuir al conocimiento de su biología en relación con la interacción parásito-célula. Para ello, se realizó la predicción de proteínas importantes para la invasión del parásito a sus células diana mediante la exploración *in silico* de los datos de transcriptoma y proteoma de *B. bovis*, obteniendo como resultado las proteínas *BbMSA-1*, *BbAMA-1* y *BbRON2*.

Posteriormente, varias regiones bajo restricción funcional y con presencia de codones seleccionados negativamente en *BbMSA-1*, *BbAMA-1* y *BbRON2* fueron inferidas a través de análisis de selección natural, con el objetivo de elegir fragmentos idóneos (regiones o péptidos de 20 residuos) y evaluar así su capacidad para unirse a los eritrocitos bovinos. Los ensayos altamente sensibles de interacción proteína-célula y péptido-célula permitieron identificar varias regiones con capacidad de unión a eritrocitos bovinos y diferentes péptidos



con alta capacidad de unión (HABP, del inglés *High Activity Binding Peptide*) a sus células diana para *Bb*MSA-1: 42422 (<sup>39</sup>PEGSFYDDMSKFGAVGSFD<sup>58</sup>), 42424 (<sup>91</sup>NALIKNNPMIRPDLFNATIV<sup>110</sup>) y 42426 (<sup>150</sup>TDIVEEDREKAVEYFKKHVY<sup>169</sup>); *Bb*AMA-1: 42437 (<sup>100</sup>YMQKFDIPRNHGSGIYVDLG<sup>119</sup>), 42438 (<sup>120</sup>GYESVGSKSYRMPVVGKSPVV<sup>139</sup>) y 42443 (<sup>302</sup>SPMHPVRDAIFGKWSGGSSV<sup>321</sup>); y *Bb*RON2: 42918 (<sup>1218</sup>SFIMVKPPALHCVLKPVETL1<sup>237</sup>). Además, los análisis de predicción de la estructura terciaria y secundaria de las moléculas permitieron evidenciar que los HABPs 42422 y 42426 de MSA-1, así como 42437 y 42438 de AMA-1, son altamente helicoidales y contienen epítopes de células B y T, mientras que los HABPs 42424 de MSA-1 y 42918 de RON2 son no estructurados estando este último, localizado en una región intrínsecamente desordenada flanqueada por dos regiones helicoidales.

Este es el primer estudio que analiza y describe las regiones mínimas (definidas en este estudio por componerse de 20 aminoácidos) implicadas en la unión de las proteínas MSA-1, AMA-1 y RON2 de *B. bovis* a su célula diana. En estudios futuros, se explorará el potencial antigénico de dichos péptidos durante la inmunización *in vivo*, y se evaluará su eficacia como potenciales candidatos a vacuna.

**Palabras claves:** *Babesia bovis*, péptidos con alta capacidad de unión, eritrocito bovino,

## ABSTRACT

Babesiosis is one of the most important tick-borne veterinary diseases affecting both wild and domestic animals. Recently, it has been considered also as an emerging zoonosis distributed in tropical and subtropical regions around the world. *Babesia bovis*, the hemoprotozoa responsible for bovine babesiosis, is the most pathogenic agent in the *Babesia* genus causing a negative impact on the livestock industry related to the high morbidity and mortality rates it generates.

The main control and treatment strategies for babesiosis have been focused on chemotherapeutics against the parasite or acaricides against the vector. However, the emergence of resistance against these chemicals have made vaccination with live attenuated *B. bovis* organisms the main infection control method. Although this type of vaccines has been associated with significant levels of protection, there are limitations such as a short shelf life, risk of virulence reversal, contamination with other blood-borne pathogens, failure to induce protective immunity against different strains and immunogenicity loss. Those restrictions have limited the vaccine commercialization making alternative strategies needed to improve bovine animal welfare.

Knowledge of the parasite's basic biology and the characterization of the molecules used to invade its target cells is essential to design an effective control measure against the disease. This project was thus aimed at identifying *B. bovis* proteins or protein-regions with the ability to bind to bovine erythrocytes (its target cell) to elucidate the parasite-cell interaction. For this, the prediction of parasite's important proteins for the invasion to its target cells was carried out *in silico* by transcriptome and proteome data exploration, which led to selecting *BbMSA-1*, *BbAMA-1* and *BbRON2* proteins.

Subsequently, several regions under functional restriction and presenting negatively selected codons in *BbMSA-1*, *BbAMA-1* and *BbRON2* were inferred through natural selection analysis to choose suitable fragments (20-mer peptide regions) to evaluate their ability to bind to bovine erythrocytes. Highly sensitive protein-cell and peptide-cell interaction assays allowed the identification of several binding regions to bovine erythrocytes and different High Activity Binding Peptides (HABPs) to their target cells; for *BbMSA1*: peptides 42422 (<sup>39</sup>PEGSFYDDMSKFYGA VGSFD<sup>58</sup>), 42424 (<sup>91</sup>NALIKNNPMIRPDLFNATIV<sup>110</sup>) and 42426 (<sup>150</sup>TDIVEEDREKAVEYFKKHVY<sup>169</sup>); for *BbAMA-1*: peptides 42437 (<sup>100</sup>YMQKFDIPRNHGSGIYVDLG 119), 42438 (<sup>120</sup>GYESVGSKSYRMPVVGKSPVV<sup>139</sup>) and 42443 (<sup>302</sup>SPMHPVRDAIFGKWSGGSSV<sup>321</sup>), and for *BbRON2*: peptide 42918 (<sup>1218</sup>SFIMVKPPALHCVLKPVETL<sup>1237</sup>).

Tertiary and secondary structure prediction analysis showed that HABPs 42422 and 42426 of MSA-1, together with 42437 and 42438 of AMA-1 are highly helical and can contain epitopes for B and T cells. MSA-1 HABP 42424 is unstructured, while RON2 HABP 42918 is in an intrinsically disordered region flanked by two helical regions.

This is the first study describing the minimal regions (considered for having 20 aa in this study) involved in the binding of the *B. bovis* MSA1, AMA-1 and RON2 proteins to their target cell. Further studies should follow to explore the antigenic potential of these peptides by *in vivo* immunization, to assess their efficacy as potential anti-*B. bovis* vaccine candidates.

**Keywords:** *Babesia bovis*, bovine erythrocytes, high activity binding peptides, parasite adhesion

## 1. CAPITULO I

### 1.1. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias son uno de los problemas más comunes que afectan la salud y productividad de animales en varios países del mundo (1). Dentro de éstas, se encuentra la babesiosis, una de las enfermedades veterinarias más importantes transmitida por garrapatas que afecta varios hospederos, como el ganado bovino y ocasionalmente seres humanos (2–4). *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, hemoprotozoarios pertenecientes al phylum Apicomplexa, son los principales agentes causales de esta enfermedad, siendo *B. bovis* el agente más virulento del género *Babesia*, dado que produce un cuadro clínico severo asociado con la morbilidad animal, la pérdida de productos lácteos y cárnicos, y las restricciones para el comercio internacional del ganado (5–7). A lo anterior se suma que su transmisión se encuentra determinada por la presencia de vectores *Ixodidos*, los cuales, además de estar ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales, tienen una presencia de carácter estacional de acuerdo al ciclo de vida de la garrapata en climas templados y fríos, lo que ha generado una amenaza global para la industria ganadera con pérdidas económicas estimadas de US\$ 10 mil millones por año en todo el mundo (8–10).

Actualmente, el control de la babesiosis bovina se basa principalmente en el uso de quimioterapéuticos y el control de vectores transmisores con acaricidas (11–13). Sin embargo, múltiples limitaciones como la aparición de resistencia a medicamentos, el costo elevado de los tratamientos y el desconocimiento de la distribución del vector, han llevado a considerar como estrategia alterna el uso de vacunas basadas en parásitos atenuados para lograr una protección mediada por una respuesta inmunológica celular y/o humoral (11,14–16). Desafortunadamente, las dificultades a nivel de producción han limitado la comercialización de la vacuna basada en parásitos atenuados y su uso no ha sido del todo eficaz, por lo que se hace necesario explorar otro método de control con mejor relación de costo/efectividad contra este agente patógeno, como por ejemplo el desarrollo de una vacuna basada en proteínas recombinantes o subunidades derivadas de proteínas del parásito (15–17).

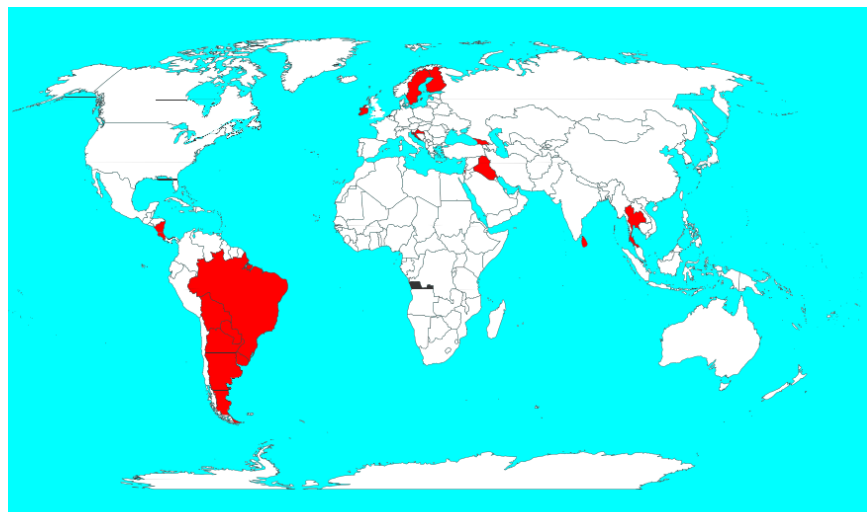
Para diseñar una vacuna completamente efectiva, idealmente se requiere conocer el mecanismo molecular mediante el cual un parásito infecta a sus células diana. En ese sentido, se ha propuesto como estrategia para el diseño de vacunas contra parásitos Apicomplexa un enfoque funcional que se basa en la identificación de regiones conservadas y con restricción funcional de aquellos genes codificantes de proteínas relacionadas con la adhesión e invasión de los parásitos a sus células diana (18). Esta metodología ha mostrado

ser prometedora en el desarrollo de una vacuna contra *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* (19,20). Teniendo en cuenta la escasa información en la biología básica de *B. bovis*, este proyecto pretende estudiar proteínas de este parásito involucradas en la adhesión a eritrocitos bovinos, con el fin de aportar conocimiento científico de utilidad para desarrollar a futuro estrategias de control más efectivas contra la enfermedad.

## 1.2. MARCO CONCEPTUAL

### 1.2.1. Epidemiología de la Babesiosis

De acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), la babesiosis es una enfermedad de declaración obligatoria, dada su importancia socioeconómica y sanitaria, y por las considerables repercusiones que tiene en el comercio internacional de animales y productos provenientes de ellos (21). Esta directriz fue adoptada por Colombia desde el año 2015, de acuerdo con la resolución 003714 emitida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (22). En el contexto internacional, para el año 2022, en las Américas se reportaron focos de babesiosis en Brasil, Argentina, Costa Rica, Nicaragua, Bolivia, Uruguay y Paraguay (23). Lo anterior posiciona a América Latina como un área en permanente riesgo, debido a que sus condiciones bioecológicas favorecen el desarrollo de garrapatas y la transmisión de enfermedades a través de estos vectores a cerca de 249 millones de bovinos distribuidos en países del Mercosur, de acuerdo con los datos registrados por la OMSA (23). En Europa y Asia, los reportes del año 2022 destacan la presencia de babesiosis bovina en Croacia, Finlandia, Irlanda, Suecia, Sri Lanka, Tailandia, Iraq, Georgia y Palestina (23) (Figura 1).



**Figura 1.** Países con reporte de babesiosis bovina para el año 2022. Datos tomados de OMSA (23) (Figura propia).

En el contexto nacional, Colombia es un país caracterizado por tener diversidad climática que favorece distintas condiciones agroecológicas apropiadas para la producción de diferentes cultivos y la explotación pecuaria. Dentro de este ámbito, la ganadería es una actividad de vital importancia, dado que el sector agropecuario es el más grande del país por encima del café, las flores y la producción porcina, de acuerdo con los datos mencionados por el Fondo para el financiamiento del sector agropecuario (FINAGRO). Aunque la ganadería es una actividad presente en la gran mayoría de los municipios del país y se ha convertido en un importante sector de la economía campesina de concentración minifundista, el ejercicio pecuario desarrollado por estos productores carece muchas veces de tecnología, asistencia técnica y buenas prácticas ganaderas. Lo anterior plantea una problemática para el registro de la enfermedad ante las entidades encargadas del seguimiento de sanidad animal a nivel local y nacional, debido al sub-diagnóstico de la enfermedad, lo que a su vez también dificulta establecer medidas de control oportunas y efectivas (24).

La presencia de babesiosis en el territorio colombiano se ha constituido en un riesgo potencial para ganaderías especializadas en la producción de carne, leche y el desarrollo de programas de mejoramiento bovino. Lo anterior se debe a que la enfermedad causa un desbalance nutricional y del bienestar animal, generando reducción en la condición corporal, bajas en la producción de carne y de leche, y afectación en el sistema inmune de los bovinos, que se refleja en un aumento de la susceptibilidad a morir (25). En el año 2016, a nivel nacional se registró un total de 117 áreas afectadas por babesiosis, siendo los departamentos de Antioquia, Casanare, Santander y Cesar los más afectados por la presencia de *B. bigemina* y *B. bovis* (26). Adicionalmente, los cambios ambientales en los últimos años han favorecido la adaptación de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* en regiones con altitudes inferiores a los 2.200 m.s.n.m., con temperaturas entre los 28-32°C y humedad entre 85-90 %, lo cual plantea un panorama de riesgo para la transmisión de la infección, principalmente por *B. bovis* (27).

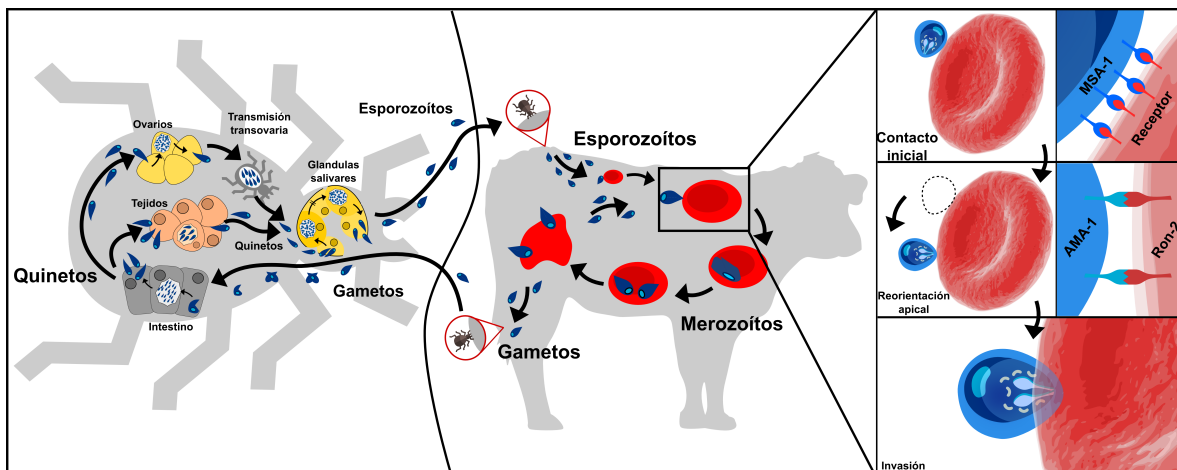
### **1.2.2. Agente etiológico y vectores**

La babesiosis es una enfermedad causada por protozoos del género *Babesia*, pertenecientes al phylum Apicomplexa. Las especies de mayor importancia que infectan bovinos son *B. bovis* y *B. bigemina* (3,5), mientras que *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* y *B. jakimovi* son otras especies que se encuentran en una menor prevalencia (28). *B. bovis* se considera el agente más virulento del género *Babesia*, al producir en el ganado infectado signos clínicos severos asociándose con altos índices de morbimortalidad animal (5). Este parásito es transmitido principalmente por garrapatas del género *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.* e *Ixodes spp.* los cuales están ampliamente distribuidos en regiones

tropicales y subtropicales del mundo, afectando a numerosos hospederos vertebrados, dentro de los que se incluyen animales domésticos y silvestres (8,29,30).

### 1.2.3. Ciclo de vida

*B. bovis* tiene un ciclo de vida complejo que requiere de un vector (garrapatas de la familia Ixodidae) donde ocurre la reproducción sexual del parásito y distintos hospederos vertebrados en donde tiene lugar la multiplicación asexual del parásito (31). La infección del hospedero se presenta durante el proceso de alimentación de las garrapatas infectadas, cuando, a través de su picadura, se inoculan esporozoítos en el torrente sanguíneo del bovino que invaden directamente eritrocitos mediante interacciones moleculares patógeno-célula (2,28). A diferencia del ciclo de vida de *Plasmodium*, *B. bovis* no desarrolla una vacuola parasitófora por lo que el esporozoítos se ubica libremente en el citoplasma y en pocas horas después se convierte en trofozoítos (32). Esto marca el comienzo de la fase de merogonia en donde el parásito se reproduce asexualmente, replicando su propio núcleo dentro de la célula hospedera, seguido de la segmentación para producir dos merozoítos infecciosos (32); estas formas parasitarias lisan los eritrocitos para quedar libres en la circulación sanguínea e invadir otros eritrocitos (Figura 2) (31,33,34). El proceso de invasión se presenta de forma continúa dando lugar a la producción sucesiva y asincrónica de merozoítos, lo que lleva a encontrar distintos estadios parasitarios en el torrente sanguíneo del animal (28,35). El tiempo en que se presentan los signos clínicos puede variar entre 7 a 35 días desde la inoculación del parásito (29).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *B. bovis*. La figura muestra las fases de desarrollo del parásito en el vector (Panel izquierdo) y en el hospedero vertebrado (Panel central), haciendo énfasis en la interacción parásito-eritrocito bovino (Panel derecho) (Figura propia).

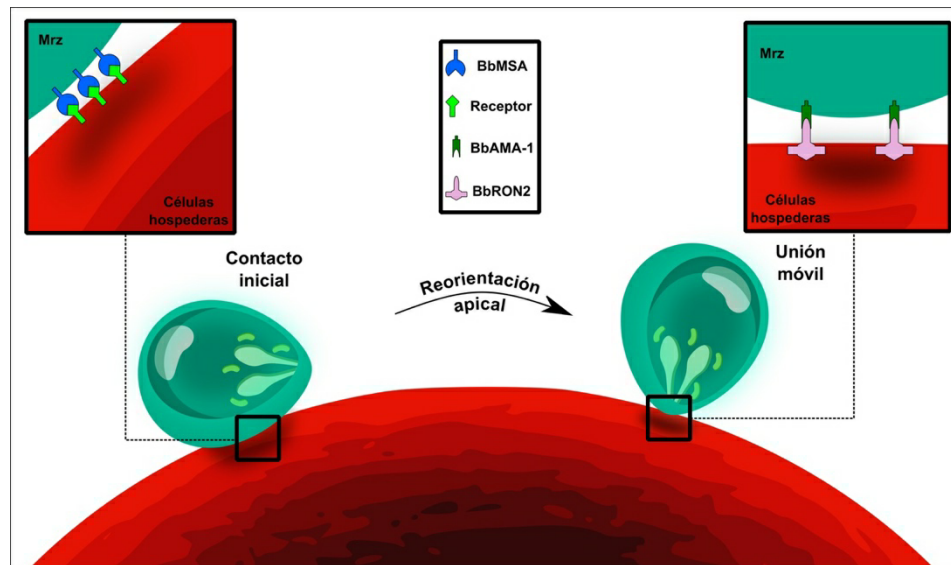
Existe controversia hasta la fecha, sobre el desarrollo de los pregametocitos dentro del torrente sanguíneo de un hospedero vertebrado debido a que no hay evidencia

experimental que respalde este suceso en *B. bovis* (28,36,37). El desarrollo de los gametos masculino y femenino de *B. bovis* comienza en la luz intestinal de la garrapata, en donde se fusionan para formar cigotos (conocidos como ooquinetos móviles) que invaden las células intestinales (38). Los ooquinetos móviles producen los quinetos (a través de la división meiótica) que pasan a la hemolinfa e invaden los tejidos periféricos del vector (incluidas las glándulas salivales y los ovarios), promoviendo así la transmisión transovárica y transtadial, estrategias utilizadas por *B. bovis* para la multiplicación biológica dentro de los ovarios de las garrapatas (32,39). Cuando los quinetos se diseminan a las glándulas salivales, se convierten en esporoblastos, los cuales presentan un proceso de multiplicación asexual por esporogonia, produciendo asincrónicamente entre 5.000 y 10.000 esporozoítos, que se liberan continuamente en la sangre del hospedador vertebrado durante la alimentación de la garrapata (32). La invasión exitosa del parásito dependerá del uso de sus proteínas transmembrana extracelulares que interactúan con los receptores de la superficie de la célula hospedera, como ocurre en otros Apicomplexa (38). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en las etapas del ciclo de vida de *B. bovis* aún no se comprenden por completo.

#### **1.2.4. Invasión de los merozoítos de *B. bovis* a los eritrocitos bovinos**

El proceso de invasión es bastante conservado entre los parásitos Apicomplexa y consta de cuatro etapas: reconocimiento, reorientación, unión fuerte e internalización (40). El reconocimiento inicial de la célula diana se da gracias a la interacción entre proteínas de superficie de los esporozoítos/merozoítos con las moléculas de superficie presentes en los eritrocitos del hospedero, sin la necesidad de requerir el paso por otros tipos de células u órganos (41). La reorientación hacia el polo apical se presenta con el fin de liberar el contenido de las roptrias y micronemas y así, establecer una unión móvil irreversible que facilita la invaginación de la membrana e internalización del parásito dentro de la célula (41,42) (Figura 3).





**Figura 3.** Esquema de las etapas del proceso de invasión de merozoítos (Mrz) de *B. bovis* a sus células hospederas. La figura muestra el contacto inicial que ocurre a través de interacciones intermoleculares entre proteínas de superficie (ej. MSA-1) del parásito y los receptores en las células diana, seguido de la formación de la unión móvil que se da por las interacciones intramoleculares entre las proteínas secretadas por los micronemas (ej. AMA-1) y roptrias (ej. RON2) (Figura propia).

#### 1.2.4.1. Contacto inicial y reorientación apical

Las principales proteínas implicadas en el contacto inicial con los eritrocitos bovinos y en la reorientación del parásito hacia su polo apical son aquellas localizadas en la superficie, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia de antígenos de superficie de merozoíto variables (VMSA, del inglés *Variable Merozoite Surface Antigens*) (43,44). Entre ellas, el antígeno de superficie de merozoíto 1 (MSA-1, del inglés *Merozoite Surface Antigen 1*) es una glicoproteína de 42 kDa abundantemente expresada en merozoítos maduros de *B. bovis* (43). Además, tiene una modificación postraduccional de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés *glycosylphosphatidylinositol*) ubicada en el extremo carboxilo terminal al igual que las proteínas de superficie de merozoíto (MSPs, del inglés *Merozoite Surface Proteins*) de otros Apicomplexa, por lo que se sugiere que dicha molécula permite la unión inicial del parásito a los eritrocitos bovinos (45,46). Otra característica particular de MSA-1 es su alta diversidad genética entre aislados de diferentes regiones del mundo, lo que se ha asociado con sus propiedades de antigenicidad y como una estrategia de supervivencia adoptada por *B. bovis* durante la infección (47,48).

MSA-1 es una proteína capaz de desencadenar la producción de anticuerpos (durante la infección natural o experimental) que tienen la capacidad de disminuir la invasión de merozoítos a los eritrocitos bovinos *in vivo* y neutralizar su infectividad *in vitro* (45,49–51). Sin embargo, se ha reportado que la inmunización con MSA-1 recombinante no confiere

protección contra el desafío con la cepa virulenta de *B. bovis*, destacando así que aunque se generó una respuesta inmunológica, ésta estuvo dirigida contra regiones no involucradas en la interacción proteína-célula (45).

#### **1.2.4.2. Formación de unión fuerte e irreversible**

Posterior al contacto inicial y reorientación de los parásitos hacia su polo apical, el Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA-1, del inglés *Apical Membrane Antigen 1*) es secretado por los micronemas a la superficie de los merozoítos, en donde forma un complejo con las proteínas de cuello de las roptrias (RONs, del inglés *Rhoptry Neck Proteins*) para establecer la unión móvil (52). AMA-1 de *B. bovis* es una proteína transmembrana tipo I con un peso molecular de 66,7 kDa, conservada dentro del phylum Apicomplexa, que comparte tres características estructurales: 1) una región amino terminal y un ectodominio que presenta 8 enlaces disulfuro formados por la asociación entre 16 cisteínas conservadas que pliegan la proteína en los dominios I (aa 41-271), II (aa 272-409) y III (aa 410-522), 2) un dominio transmembrana y 3) una cola citoplasmática en el C-terminal (6). Los diferentes trabajos realizados en *Toxoplasma*, *Plasmodium* y *Babesia* han demostrado que la presencia de mutaciones en AMA-1 y el uso de anticuerpos contra esta proteína pueden disminuir la capacidad de invasión del parásito a sus células diana (53–55). Aunque en *Toxoplasma* y *Plasmodium* ha sido descrita la unión de RON2 al surco hidrofóbico de AMA-1 ubicado en el dominio II (56,57), a la fecha no se conoce la dinámica de interacción entre estas dos moléculas en *B. bovis*.

RON2 es una proteína de 150 kDa de masa molecular codificada por un solo gen y localizada en la región del cuello de las Roptrias (58). Esta molécula posee tres dominios transmembrana y un dominio tipo CLAG (del inglés, *cytoadherence linked asexual gene*) que participa en el proceso de citoadherencia de parásitos Apicomplexa (58,59). El establecimiento de la unión móvil requiere que RON2 se inserte en la membrana de la célula hospedera a través de su dominio CLAG con el fin de asegurar una unión estrecha e irreversible, la cual es esencial para el proceso de internalización del parásito. Por último, la membrana de la célula hospedera sufre un resellado, dejando al parásito en su interior (60). Aunque el proceso de invasión ha sido ampliamente estudiado en *Plasmodium* y *Toxoplasma*, en la actualidad la falta de caracterización de antígenos de *B. bovis* y sus interacciones intermoleculares han limitado el total entendimiento de esta etapa.

#### **1.2.5. Desarrollo clínico de la enfermedad**

La babesiosis es una enfermedad aguda en la que se presenta una hemólisis continua y exponencial de eritrocitos que conduce al desarrollo de una anemia hemolítica acompañada

de reticulocitosis y eritrocitosis, ambas inducidas por los bajos niveles de oxígeno como consecuencia de la anemia. Sin embargo, esta respuesta es insuficiente para reponer la cantidad de células destruidas por el parásito. Adicionalmente, se acompaña de fiebre, anorexia, letargo, hemoglobinuria, taquicardia e ictericia (5). *B. bovis* puede originar un secuestro de parásitos en los capilares cerebrales dando lugar a un cuadro neurológico más grave, acompañado de convulsiones, hiperestesia y parálisis, que pueden conducir a la muerte del ganado (11). Cuando la respuesta inmunológica del hospedero no puede controlar la infección, la anemia puede persistir por varios meses o puede progresar a una fase crónica y producir una condición debilitante, ocasionando la muerte (29).

#### **1.2.6. Respuesta inmune frente a *B. bovis***

El mecanismo inmunológico que interviene en la protección contra *B. bovis* requiere de una respuesta innata y adaptativa a través de la activación de linfocitos CD4+ Th1 y células B para la producción de anticuerpos neutralizantes contra merozoítos extracelulares y proteínas de superficie del parásito (61). Se ha descrito que los terneros jóvenes menores de 6 meses son relativamente más resistentes que el ganado adulto al desarrollo de formas graves de la enfermedad después de la infección inicial con *B. bovis* (62,63). Esta resistencia relacionada con la edad no se debe únicamente a los efectos protectivos de los anticuerpos maternos, sino también, a una respuesta inmune innata dependiente del bazo que genera una sobreproducción de mediadores como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (ON) y la activación de macrófagos. Estos últimos, además de propiciar la muerte del microorganismo por fagocitosis, secretan IL-12 e IL-18 para favorecer la diferenciación de linfocitos CD4+ Th1 y células natural killer (62,63).

En animales persistentemente infectados o inmunizados, la respuesta inmune adaptativa depende de la presentación de antígenos del parásito a los linfocitos T CD4+ por células presentadoras de antígenos profesionales como los macrófagos (64). El control de la infección es probablemente mediado por la destrucción de los eritrocitos infectados por los macrófagos esplénicos activados y por la producción de IFN- $\gamma$  que potencia una respuesta de anticuerpos IgG2 neutralizantes dirigidos contra antígenos de superficie de los merozoítos extracelulares (64,65).

#### **1.2.7. Vacunas contra *B. bovis***

La resistencia a los medicamentos dirigidos contra *B. bovis* o su vector transmisor ha hecho que la vacunación contra este parásito sea otra estrategia tenida en cuenta para el control de la parasitosis (15). Las principales vacunas desarrolladas y comercialmente disponibles en varios países han implicado el uso de parásitos vivos atenuados (15). Aunque se han estudiado vacunas basadas en proteínas recombinantes/vectores virales o vacunas basadas

en péptidos dirigidas contra el estadio sanguíneo de *B. bovis*, hasta la fecha, éstas solo se han utilizado en estudios científicos (15,66,67). Si bien la inmunización con estas plataformas ha inducido niveles de protección considerables (especialmente en terneros menores de un año), no han sido completamente efectivas y las dificultades relacionadas con la producción han limitado su comercialización.

Las vacunas basadas en el uso de parásitos vivos atenuados obtenidos a partir de pases en ganado esplenectomizado o de cultivos *in vitro* han desencadenado en los bovinos respuestas inmunológicas que los protegen de la infección natural (66,67). Sin embargo, la vida útil corta, el riesgo de reversión de la virulencia, la contaminación con otros patógenos transmitidos por sangre, la falla en la inducción de inmunidad protectora contra diferentes cepas y la pérdida de inmunogenicidad, son importantes limitaciones de este tipo de vacunas (6). Por otro lado, se presentan dificultades técnicas para su producción y mantenimiento, resultando en un incremento de la relación costo/beneficio debido a que: 1) hay que estandarizar las condiciones para mantener la atenuación de cepas y la inmunogenicidad, 2) la viabilidad es distinta según el crioprotector utilizado, el cual además, puede ser tóxico, 3) hay dificultad para el control de calidad en la producción, 4) la seguridad y protección debe ser evaluada en cada lote de producción, 5) los animales donde se produce deben estar libres de otros microorganismos para evitar la diseminación de patógenos, 6) hay dificultad para la certificación de calidad (15). Esto ha cuestionado la viabilidad de producir vacunas vivas o incluso se ha descontinuado su producción (16).

#### **1.2.8. Enfoque funcional**

El desarrollo de vacunas veterinarias ha sido considerada una estrategia eficaz y rentable para el control de enfermedades infecciosas como la babesiosis, siendo el enfoque convencional el más utilizado para su producción (15). Aunque el uso de vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes han demostrado resultados de protección parcial en los animales inmunizados, las limitaciones que presentan han impulsado la necesidad de adoptar metodologías alternas para generar vacunas más seguras y eficaces (68,69). En los últimos años, se ha propuesto una metodología alterna para el diseño de vacunas contra parásitos Apicomplexa basada en un enfoque funcional, el cual está dirigido a identificar las regiones conservadas y con señales de restricción funcional de genes que codifican proteínas que son críticas para la adhesión e invasión de los parásitos a sus células diana. A diferencia del enfoque clásico, se ha propuesto que más que conocer proteínas antigénicas, es ideal escoger moléculas o partes de ellas que tengan un rol importante en la unión del parásito a sus células diana (18).

Para el desarrollo del enfoque funcional ha sido muy importante la publicación de genomas de diferentes patógenos que, junto con el advenimiento de estrategias bioinformáticas, ha permitido agilizar la identificación de nuevos inmunógenos, realizar análisis de variabilidad genética y caracterizar dominios funcionales de proteínas que son importantes para llevar a cabo el proceso de invasión a células diana y que, por lo tanto, son de interés para incluir en una vacuna (70–72). Estos análisis *in silico*, además de evidenciar propiedades importantes para la expresión de antígenos, han facilitado el mapeo de epítopes de células T y B, y la predicción de su capacidad de unión por afinidad a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase I y II, con el fin de inducir una respuesta inmune potente y duradera (73).

De esta manera, mediante el enfoque funcional, se han encontrado regiones mínimas (compuestas por 20 aminoácidos) conocidas como péptidos con alta actividad de unión (HABP, del inglés *High Activity Binding Peptides*) a las células diana, derivados de proteínas parasitarias que son críticas para la supervivencia de los parásitos (74–76). Estas regiones se identificaron inicialmente en las proteínas de *P. falciparum* y posteriormente fue adaptado en *P. vivax*, examinando las propiedades de unión a eritrocitos y reticulocitos de péptidos no superpuestos de 20 residuos de longitud que abarcan las moléculas completas (75). En varios estudios se demostró la dificultad de los HABPs para ser reconocidos por el MHC de clase II y por ende de generar respuestas protectoras en el modelo experimental (77). Para solventar este silencio inmunológico, se realizaron modificaciones (m) rigurosas a los HABPs (mHABPs) con el fin de aumentar su inmunogenicidad y desencadenar fuertes respuestas protectoras en el hospedero (77,78). Esta metodología ha permitido conocer diferentes HABPs que además de inducir altos títulos de anticuerpos y protección cuando se evaluaron en el modelo experimental del mono *Aotus*, también tenían una gran capacidad para inhibir la invasión del parásito a los glóbulos rojos *in vitro*.

Estos resultados sugieren que el enfoque funcional podría facilitar la comprensión de la biología del parásito *B. bovis* en relación con la identificación y caracterización de las moléculas o regiones importantes en la adhesión e invasión a sus células diana, permitiendo a la vez entender la base molecular de la resistencia actual a las estrategias de control contra la babesiosis por *B. bovis*. Teniendo en cuenta lo anterior y, dadas las ventajas de seguridad, eficiencia y facilidad de mantenimiento y producción, el desarrollo de vacunas sintéticas basadas en péptidos podría ser considerada una estrategia idónea para identificar HABPs en *B. bovis* que sean útiles para ser considerados en futuros estudios de vacunación.

### **1.3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

El desarrollo de vacunas basadas en subunidades contra parásitos Apicomplexa involucra la identificación de proteínas parasitarias o regiones de éstas que tengan un rol en la interacción con la célula hospedera, con el fin de diseñar un método de control basado en el bloqueo de la interacción proteína-célula y, por ende, evitar la infección en el respectivo hospedero. Este enfoque funcional ha permitido caracterizar antígenos de Apicomplexas que han sido considerados como importantes candidatos vacunales en humanos (74-76). A pesar de esto, la información de los mecanismos de interacción molecular que participan en el proceso de invasión de otros Apicomplexa de importancia agropecuaria como *Babesia bovis* a las células diana es bastante escasa. Por lo tanto, existe la necesidad de conocer en más detalle la biología del parásito *B. bovis*, teniendo en cuenta el impacto que genera este parásito en el sector productivo nacional e internacional. Dadas las generalidades de la babesiosis y considerando la información descrita relacionada con el uso de regiones de unión que favorecen la invasión de parásitos Apicomplexa a sus células diana, se postula como hipótesis en esta investigación que *B. bovis* tiene proteínas que desempeñan un papel crucial en la adhesión a los eritrocitos bovinos el cual es determinado por la presencia de regiones conservadas y bajo selección negativa de sus genes codificantes.

### **OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Identificar proteínas de *Babesia bovis* o regiones derivadas de ellas que tengan capacidad de unirse a los eritrocitos bovinos.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar *in silico* genes codificantes de proteínas relacionadas con la adhesión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos.
- Evaluar la capacidad de unión de las regiones conservadas derivadas de proteínas importantes en la adhesión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos.
- Identificar las regiones mínimas implicadas en la unión de cada proteína de *B. bovis* a su célula diana.

#### 1.4. INTRODUCCION A LOS CAPÍTULOS II al V

Los reportes de caracterización de antígenos de *B. bovis* son escasos, resumiéndose en 9 proteínas que son sugeridas como candidatos a vacuna: MSA-1, MSA-2a1, MSA-2b y MSA-2c (17,51,79), RAP-1 (del inglés, *Rhoptry Associated Protein 1*) (80,81), TRAP2 (del inglés, *Thrombospondin-related anonymous protein*) (82), GASA-1 (del inglés, *GPI-Anchored Surface Antigen-1*) (83), RON2 (58) y AMA-1 (84). La mayoría de estas moléculas han sido inoculadas en animales de manera completa o en fragmentos antigénicos (enfoque clásico) para estimular la respuesta inmune en el hospedero. Sin embargo, a la fecha no se ha logrado generar una inmunidad protectora duradera (15,85–87).

Con base en lo anterior, se realizó la predicción de proteínas con un papel potencial en la adhesión a las células diana, dado el antecedente sugiriendo que el diseño de vacunas debe incluir moléculas clave o fragmentos utilizados por agentes infecciosos para unirse a las células hospederas (18,88). Analizando los datos de transcriptoma y proteoma de *B. bovis*, se predijeron *in silico* proteínas con potencial rol en la invasión a eritrocitos bovinos basados en el perfil de expresión de los genes en la forma infectiva del parásito (merozoítos), la presencia de una secuencia señal de secreción y de secuencias transmembranales o de anclaje GPI, la localización celular y la capacidad de adherirse a los eritrocitos (moléculas tipo adhesinas). Las moléculas seleccionadas fueron comparadas con aquellas cuyo rol en invasión celular fue reportado experimentalmente en otros organismos Apicomplexa como *Toxoplasma* y *Plasmodium*.

De acuerdo con lo anteriores resultados y teniendo en cuenta que los antígenos descritos en *B. bovis* no cuentan con una caracterización funcionalmente exhaustiva, se seleccionaron tres moléculas (MSA-1 (**capítulo 2**), AMA-1 (**capítulo 3**) y RON2 (**capítulo 4**)) para identificar sus regiones funcionales (péptidos) siguiendo el enfoque funcional. Por otro lado, se realizó una revisión de los diferentes enfoques de desarrollo de vacunas para comparar el método clásico y funcional, y de esta manera actualizar la información en lo que a vacunas contra *B. bovis* se refiere (**capítulo 5**).

## 2. CAPÍTULO II

“Identification of *Babesia bovis* MSA-1 functionally constraint regions capable of binding to bovine erythrocytes”

**Revista:** Veterinary Parasitology

**Factor de impacto:** 2,7

**Cuartil:** 1

**Año de publicación:** 2022



### 3. CAPÍTULO III

*“Babesia Bovis* Ligand-Receptor Interaction: AMA-1 Contains Small Regions Governing Bovine Erythrocyte Binding”

**Revista:** International Journal of Molecular Sciences

**Factor de impacto:** 5,923

**Cuartil:** 1

**Año de publicación:** 2021

#### 4. CAPÍTULO IV

*“Babesia bovis* RON2 binds to bovine erythrocytes through a highly conserved epitope”

**Revista:** Veterinary Parasitology

**Factor de impacto:** 2,7

**Cuartil:** 1

**Año de publicación:** 2023

## 5. CAPÍTULO V

“Developing Anti-*Babesia bovis* Blood Stage Vaccines: A New Perspective Regarding Synthetic Vaccines”

**Revista:** International Journal of Molecular Sciences

**Factor de impacto:** 6,1

**Cuartil:** 1

**Año de publicación:** 2023

## 6. DISCUSIÓN

La industria ganadera es un importante sector de la economía mundial que contribuye con la seguridad alimentaria y nutricional de la humanidad, aportando cerca del 40% de la producción agrícola total en los países desarrollados y 20% en países en desarrollo (89). La afección del ganado por parásitos es uno de los problemas más comunes que afectan la salud y productividad de bovinos (1), dentro de éstas, los patógenos transmitidos a través de garrapatas afectan el 80% de la población mundial de ganado especialmente en áreas tropicales y subtropicales (90).

La babesiosis bovina, una de las enfermedades veterinarias más importantes transmitida por garrapatas, resulta de la infección con protozoos del género *Babesia*, considerándose a *B. bovis* el agente más virulento (3,5). El proceso de invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos implica la participación de moléculas de superficie y proteínas liberadas del complejo apical del parásito (91). Si bien este proceso de invasión es conservado dentro del phylum Apicomplexa, aún existen vacíos en el conocimiento respecto a las proteínas involucradas y a las interacciones moleculares que ocurren durante el proceso de invasión de los merozoitos de *B. bovis*.

Con base en estudios comparativos con diferentes especies de *Babesia* y con otros parásitos Apicomplexa como *P. falciparum*, *P. vivax* y *Toxoplasma gondii*, así como en reportes del genoma, transcriptoma y proteoma de merozoitos de *B. bovis*, se ha planteado una metodología que implica un enfoque bioinformático y posterior confirmación experimental para identificar en *B. bovis* proteínas con posible función en la invasión a eritrocitos bovinos. De esta manera y teniendo en cuenta la relevancia funcional de las proteínas MSA-1, AMA-1 y RON2 durante el proceso de invasión en parásitos Apicomplexa, en este trabajo se identificaron regiones de 20 aa conservadas de interacción de estas tres proteínas con receptores sobre la membrana de eritrocitos bovinos.

En varios estudios se ha descrito que las regiones funcionales o estructuralmente importantes dentro de una proteína tienden a evolucionar mucho más lentamente que aquellas que no están limitadas por la funcionalidad, manteniendo de esta manera una alta conservación de la secuencia entre especies (92,93). Los análisis de diversidad genética y la búsqueda de señales de selección natural a través de métodos basados en la comparación de la tasa de mutaciones no sinónimas ( $d_N$ , mutaciones que alteran secuencias de proteínas) con la tasa de mutaciones sinónimas ( $d_S$ , mutaciones que codifican el mismo aminoácido) han permitido identificar señales de selección natural negativa ( $d_N < d_S$  o  $\omega < 1$ ), es decir,

regiones que a pesar de poder estar variando en la secuencia de ADN, mantienen relativamente conservada la secuencia de aminoácidos (94). Teniendo en cuenta lo anterior, se identificaron regiones bajo restricción funcional en los genes codificantes de las proteínas aquí estudiadas.

El análisis de selección natural del gen *msa-1* permitió encontrar dos regiones con valores  $d_N/d_S < 1$  entre homólogos, así como entre diferentes aislados de *B. bovis*, con la mayoría de los sitios seleccionados negativamente. Por otro lado, *ama-1* demostró una variabilidad limitada y huellas de selección negativa dentro de *B. bovis*, sugiriendo que el gen podría estar bajo intensa restricción funcional, similar a la reportada para otros parásitos Apicomplexa (95). Con respecto al gen *ron2*, se encontró conservación de las regiones codificantes de los extremos N-terminal y C-terminal. Estos hallazgos bioinformáticos sugieren que MSA-1, AMA-1 y RON2 se componen de regiones funcionalmente importantes las cuales podrían estar relacionadas con el rol de cada molécula en la adhesión a sus células diana.

Diferentes metodologías para el desarrollo de una vacuna contra la babesiosis bovina han sido utilizadas, entre las que se incluye el uso del microorganismo completo atenuado, antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, todas basadas en aquellas regiones con capacidad antigénica o inmunogénica (58,67,96). Sin embargo, a pesar de los resultados con las diferentes plataformas probadas, aún no se encuentra disponible una vacuna contra la babesiosis bovina (11). La falta de caracterización de proteínas del parásito y sus interacciones con los eritrocitos bovinos durante el proceso de invasión, así como la elección de antígenos polimórficos con capacidad antigénica que inducen una respuesta alelo-específica (respuesta cepa-específica), podrían ser consideradas la principal explicación de la falla en la inducción de protección de las vacunas anteriormente mencionadas. Según lo anterior y teniendo en cuenta los resultados de análisis de selección natural de cada gen, se estudió la capacidad de varias regiones de MSA-1, AMA-1 y RON2 para unirse a los eritrocitos bovinos. En resumen, los ensayos de interacción de proteínas recombinantes permitieron corroborar la función de los fragmentos N-terminal y C-terminal de RON2 y el fragmento que abarca los dominios I y II de AMA-1 dado que fueron capaces de unirse a los eritrocitos bovinos. Adicionalmente, utilizando el enfoque funcional, se identificaron 3 HABPs para cada una en las proteínas MSA-1: 42422 (<sup>39</sup>PEGSFYDDMSKIFYGAVGSFD<sup>58</sup>), 42424 (<sup>91</sup>NALIKNNPMIRPDLFNATIV<sup>110</sup>) y 42426 (<sup>150</sup>TDIVEEDREKAVEYFKKHVY<sup>169</sup>), y AMA-1: 42437 (<sup>100</sup>YMQKFDIPRHHGSGIYVDLG<sup>119</sup>), 42438 (<sup>120</sup>GYESVGSKSYRMPVVGKSPVV<sup>139</sup>) y 42443 (<sup>302</sup>SPMHPVRDAIFGKWSGGSSV<sup>321</sup>), y uno solo para RON2: 42918 (<sup>1218</sup>ŞFIMVKPPALHCVLKPVETL1<sup>237</sup>). En particular, dichas regiones se unen específicamente y con alta afinidad a receptores presentes en la superficie de la membrana de la célula

hospedera, lo que soporta la noción de estudiar su papel como nuevas dianas moleculares para el desarrollo de vacunas eficaces y seguras contra la infección por *B. bovis*.

Las interacciones receptor-ligando son cruciales para llevar a cabo diferentes procesos biológicos dentro de los cuales se incluye la adhesión/invasión de microorganismos a sus células diana (97). Diferentes trabajos se han centrado en identificar la dinámica de interacciones entre antígenos de *P. falciparum* y *P. vivax* con receptores presentes en eritrocitos y/o reticulocitos humanos, permitiendo conocer, por ejemplo, que los fragmentos de PfMSP1 interactúan con la glicoforina A y con banda 3 (98,99), mientras que la proteína homóloga 5 a la proteína de unión a reticulocitos (Rh5, del inglés, *reticulocyte-binding protein homolog 5*) se une al receptor de basigina (CD147) en los eritrocitos (100). En cuanto a *P. vivax*, el primer receptor descrito fue el receptor del antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) que interactúa con la proteína de unión a Duffy 1 (DBP1, del inglés, *Duffy-binding protein 1*) (101). Adicionalmente, se caracterizó al receptor de transferrina 1 (TfR1) como el receptor de la proteína de unión a reticulocitos 2b (PvRBP2b, del inglés, *reticulocyte-binding protein 2b*) (102). Lo anterior ha sido importante para poder desarrollar fármacos que inhiban la interacción de los parásitos con sus células diana. En ese orden de ideas, los ensayos realizados en esta investigación permitieron identificar que las proteínas MSA-1, AMA-1 y RON2 pueden unirse a un receptor de proteína tipo sialoglicoproteína. En particular, cada molécula mostró un patrón de unión diferente frente a distintos sitios del receptor, lo que puede explicar las discrepancias encontradas en varios estudios con respecto a la invasión *in vitro* sensible o resistente a las proteasas (103,104). La comprensión de los anteriores mecanismos moleculares involucrados en la adhesión de los merozoítos a los eritrocitos bovinos puede ser útil para desarrollar futuros fármacos que contrarresten la infección por parásito.

La publicación de estructuras conformacionales de proteínas ha permitido establecer las regiones importantes de interacción entre los ligandos del parásito y los receptores de la célula hospedera e identificar epítopes funcionales y no funcionales de complejos de anticuerpos neutralizantes y/o inhibidores de ligandos; en conjunto, estos datos podrían servir para el diseño de métodos profilácticos y de tratamiento contra diferentes enfermedades (105). Los análisis de la estructura terciaria y secundaria desarrollados en este estudio evidenciaron que los HABPs 42422 y 42426 de MSA-1, y 42437 y 42438 de AMA-1 son helicoidales y pueden contener epítopes de células B y T, mientras que el HABP 42424 es no estructurado, igual que el HABP 42918 de RON2, localizado en una región intrínsecamente desordenada flanqueada por dos regiones helicoidales. Es importante resaltar que los HABPs de *BbAMA-1* están localizados en el dominio I que ha sido descrito como funcionalmente importante en la interacción de homólogos de esta proteína con sus

células diana (106–108). Además, todos los péptidos descritos como HABPs están ubicados en regiones de las proteínas expuestas al medio por lo que podrían estar involucrados en interacciones con otras proteínas del parásito o con su célula diana. De acuerdo con lo anterior, podría esperarse que los anticuerpos generados sean capaces de reconocer estas regiones y así puedan bloquear/inhibir su función de adhesión a los eritrocitos durante el proceso de invasión.

Este es el primer estudio en el que se describen varias regiones conservadas y con presencia de epítopes T y B implicadas en la unión específica de las proteínas MSA1, AMA-1 y RON2 de *B. bovis* a su célula diana. Además, se describe el perfil de unión de los péptidos a eritrocitos tratados enzimáticamente y su localización espacial, destacando su importancia para ser considerados como candidatos a vacuna. En estudios futuros, se explorará el potencial antigénico de dichos péptidos durante la inmunización in vivo y se evaluará la eficacia protectora inducida, al evaluarlos como potenciales candidatos a vacuna anti-*B. bovis*.

## 7. CONCLUSIONES

1. El uso de herramientas bioinformáticas junto con el avance de las ciencias ómicas han permitido agilizar la predicción *in silico* de antígenos y, por ende, disminuir considerablemente la cantidad elevada de experimentos biológicos orientados a determinar cuáles regiones de las proteínas son importantes en una función en particular. Lo anterior soporta que los análisis *in silico* son útiles para acertar en la identificación de diferentes regiones de los genes codificantes de proteínas relacionadas con la adhesión a eritrocitos bovinos, como las aquí estudiadas: *BbMSA-1*, *BbAMA-1* y *BbRON2*.
2. Los ensayos de interacción proteína-célula y péptido-célula altamente sensibles son importantes para confirmar la función de unión de regiones de proteínas y/o péptidos. En este estudio, se reportan por primera vez, varias regiones de unión a los eritrocitos bovinos de las proteínas MSA1: 42422 (<sup>39</sup>PEGSFYDDMSKFGAVGSFD<sup>58</sup>), 42424 (<sup>91</sup>NALIKNNPMIRPDLFNATIV<sup>110</sup>) y 42426 (<sup>150</sup>TDIVEEDREKAVEYFKKHVY<sup>169</sup>); AMA-1 (localizados en los dominios I-II (42437 (<sup>100</sup>YMQKFDIPRNHGSGIYVDLG<sup>119</sup>), 42438 (<sup>120</sup>GYESVGSKSYRMPVGKSPVV<sup>139</sup>) y 42443 (<sup>302</sup>SPMHPVRDAIFGKWSGGSSV<sup>321</sup>))); y RON2 (localizado en el C-terminal (42918 (<sup>1218</sup>SFIMVKPPALHCVLKPVETL1<sup>237</sup>))).
3. La naturaleza de los receptores celulares para moléculas parasitarias puede ser determinada mediante ensayos de unión a eritrocitos tratados enzimáticamente. Teniendo en cuenta que la quimotripsina escinde los esqueletos peptídicos y la neuraminidasa escinde selectivamente los residuos de ácido siálico de las proteínas de la membrana, se puede sugerir que los hallazgos de esta investigación apuntan a que MSA-1, AMA-1 y RON2 utilizan sialoglicoproteínas como receptores. Adicionalmente, en el caso de AMA-1, los tres péptidos fueron capaces de unirse específicamente a un receptor que tenía un peso molecular aparente de 75 kDa.
4. La estructura tridimensional o secundaria de las proteínas es útil para determinar su acoplamiento molecular y dilucidar las posibles funciones de las moléculas. En este estudio, se predijo la localización de los HABPs y con ello se logró conocer cuáles tendrían mayor visibilidad ante el sistema inmune. Por ende, los HABPs 42422 y 42426 (epítipo de célula B) de MSA-1 pueden ser péptidos idóneos, al igual que los HABPs 42437 y 42438 de AMA-1 (que contienen epítopos de células B y T), dada su exposición en la superficie de cada proteína, y el HBP 42918 de RON2 por estar



dentro de una región intrínsecamente desordenada de la estructura secundaria de RON2 flanqueada por dos regiones helicoidales.

5. Los hallazgos de esta investigación soportan la utilidad del enfoque funcional como una estrategia óptima para el estudio de proteínas de *B. bovis* y/o fragmentos derivados de éstas con potencial papel en el proceso de adhesión celular.

## 8. PERSPECTIVAS

- Se requiere aumentar el número de secuencias de los genes *BbMSA-1*, *BbAMA-1* y especialmente de *BbRON2* provenientes de diferentes localizaciones geográficas para dar más robustez a los análisis de selección natural, siguiendo la metodología planteada en este trabajo doctoral.
- Utilizar otros sistemas de expresión eucariota como levaduras, células de insecto o células de mamífero para obtener de forma recombinante y soluble la proteína MSA-1, esto con el fin de realizar ensayos de interacción proteína-célula que puedan contribuir a su caracterización funcional.
- Evaluar la capacidad de los anticuerpos generados ante la inmunización en bovinos con los HABPs para inhibir la invasión in vitro de *B. bovis*.
- Evaluar la capacidad protectora de los HABPs reportados en este estudio al usarlos como candidatos a vacuna en el modelo bovino.

## 9. REFERENCIAS

1. Singh B, Varikuti S, Halsey G, Volpedo G, Hamza OM, Satoskar AR. Host-directed therapies for parasitic diseases. *Future Med Chem.* 2019;11(15):1999-2018.
2. Hunfeld K, Hildebrandt A, Gray J. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol.* 2008;38(11):1219-37.
3. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 2004;129(S1):S247-69.
4. Gray JS. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:131-6.
5. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol.* 2011;180(1-2):109-25.
6. Rittipornlertrak A, Nambooppha B, Simking P, Punyapornwithaya V, Tiwananthagorn S, Jittapalapong S, et al. Low levels of genetic diversity associated with evidence of negative selection on the *Babesia bovis* apical membrane antigen 1 from parasite populations in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2017;54:447-54.
7. Bram RA, George JE, Reichard RE, Tabachnick WJ. Threat of Foreign Arthropod-Borne Pathogens to Livestock in the United States. *J Med Entomol.* 2002;39(3):405-16.
8. Gray JS, Estrada-Peña A, Zintl A. Vectors of Babesiosis. *Annu Rev Entomol.* 2019;64(1):149-65.
9. He L, Bastos RG, Sun Y, Hua G, Guan G, Zhao J, et al. Babesiosis as a potential threat for bovine production in China. *Parasit Vectors.* 2021;14(1):460.
10. Satti RA, Awadelkareem EA, Sukanuma K, Salim B, Inoue N, Xuan X, et al. Cattle anaplasmosis and babesiosis: Major tick-borne diseases affecting the cattle industry in Khartoum State, Sudan. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* 2021;26:100632.
11. Suarez CE, Alzan HF, Silva MG, Rathinasamy V, Poole WA, Cooke BM. Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *Int J Parasitol.* 2019;49(2):183-97.
12. Vial HJ, Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol.* 2006;138(1-2):147-60.
13. Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol.* marzo de 1995;57(1-3):153-65.
14. Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Léon AP de. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* 2011;20(2):127-33.
15. Florin-Christensen M, Suarez CE, Rodriguez AE, Flores DA, Schnittger L. Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology.* 2014;141(12):1563-92.

16. de Waal DT, Combrink MP. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet Parasitol.* 2006;138(1-2):88-96.
17. Gimenez AM, Françoso KS, Ersching J, Icimoto MY, Oliveira V, Rodriguez AE, et al. A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN- $\gamma$  producing cells. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):577.
18. Patarroyo ME, Bermúdez A, Patarroyo MA. Structural and Immunological Principles Leading to Chemically Synthesized, Multiantigenic, Multistage, Minimal Subunit-Based Vaccine Development. *Chem Rev.* 2011;111(5):3459-507.
19. López C, Yepes-Pérez Y, Hincapié-Escobar N, Díaz-Arévalo D, Patarroyo MA. What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates? *Front Immunol.* 2017;8.
20. Patarroyo ME, Alba MP, Rojas-Luna R, Bermudez A, Aza-Conde J. Functionally relevant proteins in *Plasmodium falciparum* host cell invasion. *Immunotherapy.* 2017;9(2):131-55.
21. OIE. World Organization for Animal Health. 2019.
22. ICA. Enfermedades de declaración obligatoria en Colombia. 2019.
23. OIE. World Organization for Animal Health. 2022.
24. ICA. Censo pecuario. 2018.
25. Calderon Alfonso, Martinez Nicolás, Iguarán Haydée. Bovine hemoparasites frequency from colombian caribbean region. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica.* 2016;19(1):131-8.
26. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. Boletín Sanidad Animal. 2016.
27. Vecino JAC, Echeverri JAB, Cárdenas JA, Herrera LAP. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Cienc Tecnol Agropecu.* 2010;11(1):73-84.
28. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res.* 2009;40(2):37.
29. Vannier EG, Diuk-Wasser MA, Ben Mamoun C, Krause PJ. Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(2):357-70.
30. Kivaria FM. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 2006;38(4):291-9.
31. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):451-69.
32. Jalovecka M, Sojka D, Ascencio M, Schnittger L. *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends Parasitol.* 2019;35(5):356-68.
33. Ueti MW, Johnson WC, Kappmeyer LS, Herndon DR, Mousel MR, Reif KE, et al.

- Comparative analysis of gene expression between *Babesia bovis* blood stages and kinetes allowed by improved genome annotation. *Int J Parasitol.* 2021;51(2-3):123-36.
34. Hutchings CL, Li A, Fernandez KM, Fletcher T, Jackson LA, Molloy JB, et al. New insights into the altered adhesive and mechanical properties of red blood cells parasitized by *Babesia bovis*. *Mol Microbiol.* 2007;65(4):1092-105.
  35. Lobo CA, Rodriguez M, Cursino-Santos JR. *Babesia* and red cell invasion: *Curr Opin Hematol.* 2012;19(3):170-5.
  36. Jalovecka M, Bonsergent C, Hajdusek O, Kopacek P, Malandrin L. Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):439.
  37. Jalovecka M, Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Malandrin L. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:248.
  38. Mehlhorn H, Schein E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. En: *Advances in Parasitology* [Internet]. Elsevier; 1985: 37-103.
  39. Howell JM, Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Knowles DP. Transovarial Transmission Efficiency of *Babesia bovis* Tick Stages Acquired by *Rhipicephalus ( Boophilus ) microplus* during Acute Infection. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):426-31.
  40. Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Ménard R. Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: The Junction Conundrum. *PLoS Pathog.* 2014;10(9):e1004273.
  41. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet Parasitol.* 2006;138(1-2):22-32.
  42. Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol.*1998;28(7):1007-13.
  43. Hines S, McElwain T, Buening G, Palmer G. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol Biochem Parasitol.*1989;37(1):1-9.
  44. Goff WL, Davis WC, Palmer GH, McElwain TF, Johnson WC, Bailey JF, et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect Immun.*1988;56(9):2363-8.
  45. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, Goff WL, McElwain TF. Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect Immun.* 1995;63(1):349-52.
  46. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, McGuire TC, McElwain TF. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic

- gene family. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;55(1-2):85-94.
47. Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, Falcón A, Alvarez A, Camacho M, et al. Phylogenetic Analysis of Mexican *Babesia bovis* Isolates Using *msa* and *ssrRNA* Gene Sequences. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1149(1):121-5.
  48. Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(7):493-503.
  49. Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, McGuire TC, McElwain TF. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;55(1-2):85-94.
  50. Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, Palmer GH, Brown WC, McElwain TF. 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. Petri WA, editor. *Infect Immun.* 2000;68(12):6865-70.
  51. Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH. *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen 1 and Rhoptry-Associated Protein 1 Are Expressed in Sporozoites, and Specific Antibodies Inhibit Sporozoite Attachment to Erythrocytes. *Infect Immun.* 2002;70(3):1599-603.
  52. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J, et al. The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001276.
  53. Mital J, Meissner M, Soldati D, Ward GE. Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4341-9.
  54. Yap A, Azevedo MF, Gilson PR, Weiss GE, O'Neill MT, Wilson DW, et al. Conditional expression of apical membrane antigen 1 in *P. lasmodium falciparum* shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. *Cell Microbiol.* 2014;16(5):642-56.
  55. Bilgic HB, Hacılarlıoğlu S, Bakirci S, Kose O, Unlu AH, Aksulu A, et al. Comparison of protectiveness of recombinant *Babesia ovis* apical membrane antigen 1 and *B. ovis*-infected cell line as vaccines against ovine babesiosis. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2020;11(1):101280.
  56. Tyler JS, Boothroyd JC. The C-Terminus of *Toxoplasma* RON2 Provides the Crucial Link between AMA1 and the Host-Associated Invasion Complex. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001282.
  57. Delgadillo RF, Parker ML, Lebrun M, Boulanger MJ, Douguet D. Stability of the *Plasmodium falciparum* AMA1-RON2 Complex Is Governed by the Domain II (DII) Loop. *PLOS ONE.* 2016;11(1):e0144764.
  58. Hidalgo-Ruiz M, Suarez CE, Mercado-Uriostegui MA, Hernandez-Ortiz R, Ramos JA, Galindo-Velasco E, et al. *Babesia bovis* RON2 contains conserved B-cell epitopes that

- induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):575.
59. Gardiner DL, Spielmann T, Dixon MWA, Hawthorne PL, Ortega MR, Anderson KL, et al. CLAG-9 is located in the rhoptries of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2004;93(1):64-7.
  60. Shen B, Sibley LD. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(4):449-55.
  61. Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol*. 2006;138(1-2):75-87.
  62. Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA. 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: Type-1 attributes of innate immunity in calves to *B. bovis*. *Parasite Immunol*. 2001;23(9):463-71.
  63. Goff WL, Johnson WC, Horn RH, Barrington GM, Knowles DP. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol*. 2003;25(4):185-8.
  64. Torina A, Blanda V, Villari S, Piazza A, La Russa F, Grippi F, et al. Immune Response to Tick-Borne Hemoparasites: Host Adaptive Immune Response Mechanisms as Potential Targets for Therapies and Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22).
  65. Brown WC, Zhao S, Woods VM, Dobbelaere DAE, Rice Ficht AC. Des clones de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques pour *Babesia bovis*, de bovins immunisés, expriment le profil de cytokines des cellules Th0 ou des Th1. *Rev D'élevage Médecine Vét Pays Trop*. 1993;46(1-2):65-9.
  66. Shkap Varda, de Vos Albertus J, Zwegarth Erich, Jongejan Frans. Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends in Parasitology*. 2007;23(9):420-6.
  67. Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. An Overview of Current Knowledge on in vitro *Babesia* Cultivation for Production of Live Attenuated Vaccines for Bovine Babesiosis in Mexico. *Front Vet Sci*. 2020;7:364.
  68. Jorge S, Dellagostin OA. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol Res Innov*. 2017;1(1):6-13.
  69. Bagnoli F, Baudner B, Mishra RPN, Bartolini E, Fiaschi L, Mariotti P, et al. Designing the Next Generation of Vaccines for Global Public Health. *OMICS J Integr Biol*. 2011;15(9):545-66.
  70. Rappuoli R. Reverse Vaccinology and Genomics. *Science*. 2003;302(5645):602-602.

71. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001;19(17-19):2688-91.
72. Bambini S, Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discov Today*. 2009;14(5-6):252-60.
73. Rappuoli R, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(34):12288-93.
74. Patarroyo MA, Arévalo-Pinzón G, Moreno-Pérez DA. From a basic to a functional approach for developing a blood stage vaccine against *Plasmodium vivax*. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19(2):195-207.
75. Patarroyo ME, Arevalo-Pinzon G, Reyes C, Moreno-Vranich A, Patarroyo MA. Malaria Parasite Survival Depends on Conserved Binding Peptides' Critical Biological Functions. *Curr Issues Mol Biol*. 2016;18:57-78.
76. Vera-Bravo R, Torres E, Valbuena JJ, Ocampo M, Rodríguez LE, Puentes Á, et al. Characterising Mycobacterium tuberculosis Rv1510c protein and determining its sequences that specifically bind to two target cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(3):771-81.
77. Patarroyo ME, Alba MP, Reyes C, Rojas-Luna R, Patarroyo MA. The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures. *Curr Issues Mol Biol*. 2016;18:11-9.
78. Cubillos M, Salazar LM, Torres L, Patarroyo ME. Protection against experimental P falciparum malaria is associated with short AMA-1 peptide analogue alpha-helical structures. *Biochimie*. 2002;84(12):1181-8.
79. Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Lew AE, McElwain TF. Merozoite Surface Antigen 2 Proteins of *Babesia bovis* Vaccine Breakthrough Isolates Contain a Unique Hypervariable Region Composed of Degenerate Repeats. *Infect Immun*. 2005;73(11):7180-9.
80. Suarez CE, Laughery JM, Bastos RG, Johnson WC, Norimine J, Asenzo G, et al. A novel neutralization sensitive and subdominant RAP-1-related antigen (RRA) is expressed by *Babesia bovis* merozoites. *Parasitology*. 2011;138(7):809-18.
81. Yokoyama N, Suthisak B, Hirata H, Matsuo T, Inoue N, Sugimoto C, et al. Cellular Localization of *Babesia bovis* Merozoite Rhoptry-Associated Protein 1 and Its Erythrocyte-Binding Activity. *Infect Immun*. 2002;70(10):5822-6.
82. Terkawi MA, Ratthanophart J, Salama A, AbouLaila M, Asada M, Ueno A, et al. Molecular Characterization of a New *Babesia bovis* Thrombospondin-Related Anonymous Protein (BbTRAP2). *PLoS ONE*. 2013;8(12):e83305.
83. Flores DA, Rodriguez AE, Tomazic ML, Torioni de Echaide S, Echaide I, Zamorano P, et al. Characterization of GASA-1, a new vaccine candidate antigen of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol*. 2020;287:109275.

84. Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FFJ, de Vries E. Erythrocyte Invasion by Babesia bovis Merozoites Is Inhibited by Polyclonal Antisera Directed against Peptides Derived from a Homologue of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1. *Infect Immun*. 2004;72(5):2947-55.
85. Antonio Alvarez J, Lopez U, Rojas C, Borgonio VM, Sanchez V, Castañeda R, et al. Immunization of Bos taurus Steers with Babesia bovis Recombinant Antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3: Recombinant Proteins Immunization and Babesia bovis. *Transbound Emerg Dis*. 2010;57(1-2):87-90.
86. Fish L, Leibovich B, Krigel Y, McElwain T, Shkap V. Vaccination of cattle against B. bovis infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. *Vaccine*. 2008;26:G29-33.
87. Norimine J, Suarez CE, McElwain TF, Florin-Christensen M, Brown WC. Immunodominant Epitopes in Babesia bovis Rhoptry-Associated Protein 1 That Elicit Memory CD4+-T-Lymphocyte Responses in B. bovis-Immune Individuals Are Located in the Amino-Terminal Domain. *Infect Immun*. 2002;70(4):2039-48.
88. Lanzavecchia A, Frühwirth A, Perez L, Corti D. Antibody-guided vaccine design: identification of protective epitopes. *Curr Opin Immunol*. 2016;41:62-7.
89. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
90. Yusuf JJ. Review on Bovine Babesiosis and its Economical Importance. *J Vet Med Res*. 2017;4 (5):1090.
91. Tonkin ML, Roques M, Lamarque MH, Pugnère M, Douguet D, Crawford J, et al. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*. 2011;333(6041):463-7.
92. Nielsen R. Molecular Signatures of Natural Selection. *Annu Rev Genet*. 2005;39(1):197-218.
93. Camargo-Ayala PA, Garzón-Ospina D, Moreno-Pérez DA, Ricaurte-Contreras LA, Noya O, Patarroyo MA. On the Evolution and Function of Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Surface Antigen (pvrbsa). *Front Genet*. 2018;9:372.
94. Baquero LA, Moreno-Pérez DA, Garzón-Ospina D, Forero-Rodríguez J, Ortiz-Suárez HD, Patarroyo MA. PvGAMA reticulocyte binding activity: predicting conserved functional regions by natural selection analysis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):251.
95. Treeck M, Zacherl S, Herrmann S, Cabrera A, Kono M, Struck NS, et al. Functional Analysis of the Leading Malaria Vaccine Candidate AMA-1 Reveals an Essential Role for the Cytoplasmic Domain in the Invasion Process. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000322.
96. Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF. Prospects for recombinant vaccines against Babesia bovis and related parasites. *Parasite Immunol*. 2006;28(7):315-27.



97. Tonkin ML, Boulanger MJ. The shear stress of host cell invasion: exploring the role of biomolecular complexes. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004539.
98. Baldwin MR, Li X, Hanada T, Liu SC, Chishti AH. Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood.* 2015;125(17):2704-11.
99. Li X, Chen H, Oo TH, Daly TM, Bergman LW, Liu SC, et al. A Co-ligand Complex Anchors *Plasmodium falciparum* Merozoites to the Erythrocyte Invasion Receptor Band 3. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5765-71.
100. Crosnier C, Bustamante LY, Bartholdson SJ, Bei AK, Theron M, Uchikawa M, et al. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2011;480(7378):534-7.
101. Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med.* 1996;184(4):1531-6.
102. Gruszczyk J, Kanjee U, Chan LJ, Menant S, Malleret B, Lim NTY, et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. *Science.* 2018;359(6371):48-55.
103. Gaffar FR, Franssen FFJ, de Vries E. *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. *Int J Parasitol.* 2003;33(14):1595-603.
104. Takabatake N, Okamura M, Yokoyama N, Okubo K, Ikehara Y, Igarashi I. Involvement of a Host Erythrocyte Sialic Acid Content in *Babesia bovis* Infection. *J Vet Med Sci.* 2007;69(10):999-1004.
105. Patarroyo MA, Molina-Franky J, Gómez M, Arévalo-Pinzón G, Patarroyo ME. Hotspots in *Plasmodium* and RBC Receptor-Ligand Interactions: Key Pieces for Inhibiting Malarial Parasite Invasion. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4729.
106. Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9490-6.
107. Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF, et al. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(36):12736-41.
108. Arévalo-Pinzón G, Bermúdez M, Hernández D, Curtidor H, Patarroyo MA. *Plasmodium vivax* ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain I contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Sci Rep.* 2017;7(1):9616.

## 1. ANEXOS

### 10.1 Aval de los Comités de Bioética



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
APLICADAS Y AMBIENTALES  
**U.D.C.A**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COMITÉ DE BIOÉTICA U.D.C.A  
2019**

*Bogotá, D.C. Miércoles, 14 de Agosto de 2019*

*Doctor*

**MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ**

*Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC*

*U.D.C.A*

*Ciudad*

*Respetado Doctor, reciba un cordial saludo.*

*En reunión de sesión del comité de bioética, realizado el pasado 9 de Agosto de 2019, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, se analizó el Programa **"Contribución al conocimiento relacionado con la interacción patógeno-hospedero de parásitos Apicomplexa que afectan la salud y producción animal"**, presentado por usted y Catalina Avendaño Valenzuela, Darwin Andrés Moreno Pérez, Diana Díaz Arévalo; una vez recibidas las correcciones sugeridas en carta de Agosto 12 de 2019, se tomó la siguiente decisión:*

*Teniendo en cuenta que en la propuesta de investigación se han acogido las definiciones en las normas nacionales e internacionales sobre bienestar animal, **este comité da su aval para el desarrollo de la propuesta.***

*Cabe aclarar que este aval cubre el Programa titulado: **"Contribución al conocimiento relacionado con la interacción patógeno-hospedero de parásitos Apicomplexa que afectan la salud y producción animal"**, el cual está conformado por tres proyectos cuyos títulos son:*

- 1. Estudio de interacciones proteína-proteína esenciales en la invasión de Babesia bovis a eritrocitos bovinos.*
- 2. Caracterización de proteínas de esporozoítos de Cryptosporidium parvum implicadas en el proceso de invasión a enterocitos.*
- 3. Evaluación del efecto sobre la invasión de Toxoplasma gondii a la célula hospedera con péptidos de proteínas involucradas en la adhesión/invasión del parásito.*

*Cordialmente,*

  
**Teresa Carvajal Salcedo**  
*Decana Facultad de Ciencias Agropecuarias*



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
COMITÉ DE BIOÉTICA DE INVESTIGACIONES  
CONCEPTO BIOÉTICO

ACTA N° 25 16-08-2019 COMITÉ DE BIOÉTICA DE INVESTIGACIONES FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD (Resolución 0600 del 29 de octubre de 2001)

FECHA: agosto 16 - 2019

**NOMBRE DEL PROGRAMA:** Contribución al conocimiento relacionado con la interacción patógeno-hospedero de parásitos Apicomplexa que afectan la salud y producción animal

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez

Integrado por los siguientes proyectos:

1. Caracterización de proteínas de esporozoitos de *Cryptosporidium parvum* implicadas en el proceso de invasión a enterocitos  
Investigador Principal: Catalina Avendaño Valenzuela
2. Estudio de interacciones proteína-proteína esenciales en la invasión de *Babesia bovis* a eritrocitos bovinos  
Investigador Principal: Darwin Andrés Moreno Pérez
3. Evaluación del efecto sobre la invasión de *Toxoplasma gondii* a la célula hospedera con péptidos de proteínas involucradas en la adhesión/invasión del parásito  
Investigador Principal: Jorge Enrique Gómez Marín

Se certifica que los investigadores dieron respuesta satisfactoria a todos los ítems durante la sesión y que por lo tanto se considera **APROBADO** el mencionado proyecto por parte del Comité de Bioética de Investigaciones de la Facultad Ciencias de la Salud.

**DIANA MARCELA CURTIDOR GUTIERREZ MD, Msc**  
Presidente Comité De Bioética de Investigaciones  
Facultad Ciencias De La Salud  
Creado mediante Resolución 0600 del 29 de octubre de 2001  
Universidad del Quindío

PERTINENTE CREATIVA INTEGRADORA  
Carrera 15 Calle 12 Norte Tel: (57) 6 7 35 9300 Armenia, Quindío - Colombia

www.uniquindio.edu.co