



REVISTA  
INVESTIGACIÓN EN SALUD  
UNIVERSIDAD DE BOYACÁ

ISSN: 2389 - 7325 Versión impresa  
ISSN: 2539-2018 Versión electrónica en línea

**PRÓXIMA PUBLICACIÓN EN LÍNEA**

El Comité Editorial de la Revista de Investigación en Salud de la Universidad de Boyacá ha aprobado para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares evaluadores y la calidad del proceso de revisión. Se publica esta versión en forma provisional, como avance en línea de la última versión del manuscrito vinculada al sistema de gestión, previa a la estructura y composición de la maquetación y diagramación, como elementos propios de la producción editorial de la revista.

Esta versión se puede descargar, usar, distribuir y citar como versión preliminar tal y como lo indicamos, por favor, tenga presente que esta versión y la versión final digital e impresa pueden variar.

**Artículo de revisión**

**Proteínas importantes para la invasión de *Babesia bovis* a las células huésped.**

**Important proteins for *Babesia bovis* invasion to host cells.**

Laura Esperanza Cuy-Chaparro. <https://orcid.org/0000-0002-2016-2117>. Correo: [lauracuy@outlook.com](mailto:lauracuy@outlook.com). Estudiante doctorado Ciencias Biomédicas y Biológicas Universidad del Rosario. Colombia.

Anny Camargo Mancipe. <https://orcid.org/0000-0002-8691-2152>. Correo: [anncamargo@uniboyaca.edu.co](mailto:anncamargo@uniboyaca.edu.co). Universidad de Boyacá. Colombia.

Álida Marcela Gómez Rodríguez. <https://orcid.org/0000-0001-8747-1443>. Correo: [aligomez@uniboyaca.edu.co](mailto:aligomez@uniboyaca.edu.co). Universidad de Boyacá. Colombia.

-César Reyes Santofimio. <https://orcid.org/0000-0003-4577-9428>. Correo: [cmreyessa@unal.edu.co](mailto:cmreyessa@unal.edu.co). Universidad del Rosario. Colombia

-Darwin Andrés Moreno Pérez. <https://orcid.org/0000-0003-0101-5223>. Correo: [darandmorper@gmail.com](mailto:darandmorper@gmail.com). Universidad del Rosario. Colombia

\*Autor de Correspondencia: Laura Cuy-Chaparro. MD, PhD (s). Estudiante doctorado Ciencias Biomédicas y Biológicas Universidad del Rosario. Colombia. Correo electrónico: lauracuy@outlook.com. Número de teléfono: 312-502-3782.

## RESUMEN

**Introducción.** La babesiosis bovina es causada por parásitos *Apicomplexa* del género *Babesia*, siendo *Babesia bovis* la especie asociada con cuadros clínicos más graves de la enfermedad. La invasión de *B. bovis* a los eritrocitos bovinos implica la interacción entre moléculas de los merozoítos del parásito con receptores de las células huésped. Por ende, conocer las proteínas involucradas en este proceso supone un importante paso para entender la biología del parásito. **Objetivo.** Describir las principales moléculas implicadas en el proceso de invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos. **Metodología.** Se realizó una búsqueda en NCBI, Medline, LILACS y SciELO usando los términos: “*Babesia bovis* AND invasion process”, “MSA-1”, “RON2”, “AMA-1”, “moving junction”, “*B. bovis* AND Vaccine candidates”.

61 publicaciones disponibles en inglés que describen el estudio de las anteriores proteínas y su participación en la invasión los cuales han sido publicados hasta mayo 2020 se revisaron completamente. **Resultados:** Siendo el proceso de invasión a eritrocitos bovinos clave para la patogénesis de la babesiosis bovina, se hizo una revisión donde se encontraron 3 proteínas de *B. bovis* que participan en el reconocimiento e invasión a las células diana: MSA-1, AMA-1 y RON2. Sin embargo, los detalles a nivel molecular para las interacciones inter e intramoleculares aún no se han dilucidado por completo. **Conclusiones.** Conocer las moléculas involucradas en las interacciones parásito-hospedero permitirá comprender cómo ocurre el proceso de invasión de *B. bovis* a los eritrocitos y así evaluar su futura utilidad como componente de una estrategia de control efectiva contra esta parasitosis.

**Palabras clave:** *Babesia bovis*, Babesiosis, interacciones huésped-parásito, proteínas, control de infección.

## ABSTRACT

**Introduction.** Bovine babesiosis is caused by Apicomplexas parasites of the genus *Babesia*, *Babesia bovis* being the species associated with the most serious clinical conditions of the disease. *B. bovis* invasion into the bovine erythrocytes involves the interaction between the parasites merozoites molecules with host cell receptors. Therefore, knowing the proteins involved in the invasion process will enable understanding the parasite biology. **Objective.** To describe the important molecules involved in the *B. bovis* invasion process to bovine erythrocytes. **Methodology.** A

search was made on NCBI, Medline, LILACS and SciELO databases using keywords as “*Babesia bovis* AND invasion process”, “MSA-1”, “RON2”, “AMA-1”, “moving junction”, “*B. bovis* AND Vaccine candidates”. 61 studies written in English describing the study for proteins that take place during invasion process which have been published until mayo were completely revised. **Results.** Given that the bovine erythrocyte invasion process is key for the pathogenesis of bovine babesiosis, a review was made where 3 proteins were found to be associated to the recognition and invasion processes of target cells: MSA-1, AMA-1 and RON2. However, the details at molecular level for the inter an intramolecular interaction have not yet been fully elucidated. **Conclusions.** Study the molecules involved in host-parasite interactions will allow understanding how the *B. bovis* invasion process to erythrocytes occurs and evaluating their future utility as a component of an effective control strategy for this parasitosis.

**Key words:** *Babesia bovis*, babesiosis, host-parasite interactions, proteins, infection control.

## INTRODUCCIÓN

La babesiosis ocasionada por hemoprotozoos del género *Babesia* es una enfermedad veterinaria transmitida por artrópodos que afecta principalmente al ganado bovino, con una proporción de infectados que supera los 1.3 billones de animales (1–3). *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, los principales agentes causales de la babesiosis (4), presentan una amplia distribución en zonas tropicales y sub-

templadas del mundo y causan distintos cuadros clínicos siendo los de mayor severidad los de *B. bovis* (1,5,6).

*B. bovis* tiene un complejo ciclo de vida que involucra el desarrollo de una etapa asexual y una etapa sexual (7). La etapa asexual inicia con la inoculación de esporozoítos por medio de la picadura de la garrapata, los cuales invaden los eritrocitos bovinos. Una vez en su interior, los parásitos se reproducen por fisión binaria dando lugar a la formación de merozoítos con capacidad infectiva con lo cual se perpetua el crecimiento del parásito dentro del hospedero (8,9).

El primer paso del proceso de invasión de merozoítos de Babesia a eritrocitos bovinos consiste en el reconocimiento inicial que se da gracias a la interacción entre proteínas de superficie de los merozoítos babesiales con las moléculas de superficie presentes en las células del hospedero (10,11). Posteriormente, el parásito se reorienta hacia su polo apical para disponer el contenido de las roptrias y micronemas y así establecer una unión móvil (UM) que facilita la invaginación de la membrana y la internalización del parásito dentro de la célula (12,13). Por lo tanto, conocer las proteínas involucradas en la etapa del contacto inicial y contacto fuerte supone un importante paso para entender la maquinaria de adhesión e invasión del parásito.

En ese orden de ideas, la presente revisión presenta aspectos relevantes de las principales moléculas implicadas en el proceso de invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos, con el fin de discutir una posible medida de control basada en la información encontrada. Estos datos serán de particular importancia para futuras

investigaciones orientadas a profundizar en el papel funcional de las proteínas descritas.

## **METODOLOGÍA**

Se realizó una revisión de literatura para analizar la información existente hasta mayo del año 2020,, relacionada con la descripción de las moléculas implicadas en el proceso de invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos. Se utilizaron fuentes de información primaria como ScienceDirect y Elsevier. Las bases de datos consultadas fueron: PubMed del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), Medline, LILACS y SciELO, utilizando diferentes combinaciones de palabras clave en inglés con el operador booleano AND, entre ellas: “(*Babesia bovis*) **AND** Erythrocyte invasion”, “babesiosis”, “MSA-1”, “RON2”, “AMA-1”, “moving junction”, “*B. bovis* AND Vaccine candidates”. Se obtuvo 312 publicaciones en total, de los cuales se seleccionaron 61 artículos científicos disponibles en texto completo en idioma inglés, que además de describir las principales proteínas de *B. bovis* involucradas en la adhesión de los eritrocitos bovinos, también daban evidencia de su participación en el proceso de invasión. No se utilizaron otros criterios de selección debido a la limitada información existente acerca del parásito.

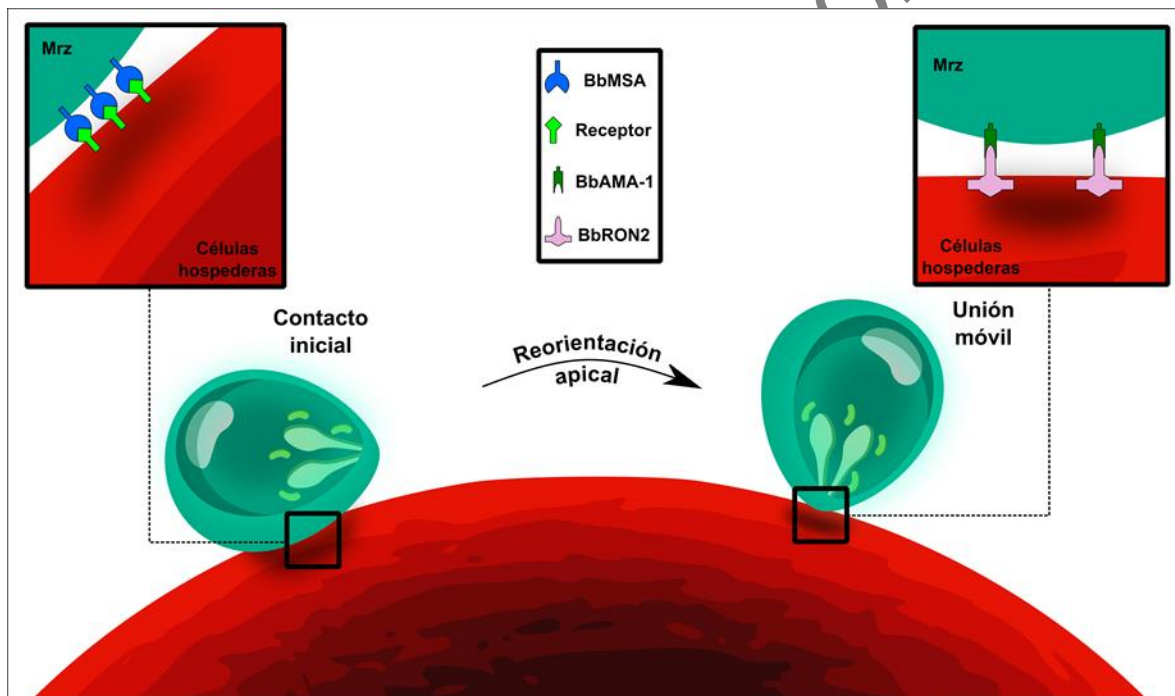
## RESULTADOS

### Dinámica del proceso de invasión en *Apicomplexa*

Los parásitos *Apicomplexa* tienen pasos de invasión muy conservados; dos de los más importantes involucran el contacto inicial y la unión móvil a la célula diana (14). Estos parásitos también se caracterizan por poseer organelos apicales denominados roptrias y micronemas y además presentan orgánulos densos que secretan proteínas a la superficie de la membrana de merozoítos o al medio externo para participar en la invasión a sus células diana (12,15,16). Las roptrias son organelos individuales que se dividen en dos compartimentos: un cuerpo bulboso y un cuello estrecho que se extiende por la porción apical del parásito a través del cual se secretan proteínas (17). Por su parte, los micronemas son pequeños organelos tubulares que contienen adhesinas las cuales, al igual que las de roptrias, son secretadas al entrar en contacto con la célula diana para facilitar la motilidad, la unión y la invasión (18,19).

Las principales proteínas implicadas en el contacto inicial con la célula huésped son aquellas localizadas en la superficie del parásito denominadas antígenos de superficie de merozoíto (MSA: Merozoite Surface Antigens) las cuales son abundantemente expresadas y por ende se cree que participan en el contacto inicial y reorientación del parásito hacia su polo apical (17,20–22). Después, participa el antígeno de membrana apical 1 (AMA-1: Apical Merozoite Antigen 1) derivado de las micronemas y las proteínas de cuello de roptrias (RONs: Roptry Neck Protein) secretadas por las roptrias (23–25). Estas moléculas forman un complejo proteico que establece la interacción con la membrana celular del hospedero a través de una

estructura denominada unión móvil esencial para el proceso de internalización del parásito (Figura 1). Por último, la membrana de la célula huésped sufre un resellado dejando encerrado al parásito en su interior (26–28). 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. Sin embargo, se describirán aquellas proteínas homologas a las mencionadas las cuales han sido estudiadas en la especie *B. bovis*.



**Figura 1.** Esquema de los pasos iniciales del proceso de invasión de merozoítos (Mrz) de parásitos *Apicomplexas* a sus células hospederas. Se muestra el contacto inicial que ocurre a través de interacciones intermoleculares entre la proteína MSA1 localizada en la superficie del parásito y los receptores de las células, seguida de la formación de la unión móvil que se da por las interacciones intramoleculares entre las proteínas del parásito AMA-1 y RON2.



## **Antígeno de superficie de merozoíto 1 (MSA-1)**

MSA-1 es una glicoproteína de 42 kDa y 319 aminoácidos (aa), codificada por un solo gen que pertenece a la familia de antígenos de superficie de merozoíto variables (VMSA: variable merozoite surface antigen) (29,30). Esta proteína es abundantemente expresada en parásitos maduros y se encuentra distribuida sobre la superficie de merozoítos de *B. Bovis* (31). Además, presenta un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) ubicado en el extremo carboxilo terminal igual que las MSPs de otros *Apicomplexas*, por lo cual se cree que dicha molécula permite la unión inicial del parásito a los eritrocitos bovinos (32–34).

La alta diversidad genética de MSA-1 presente en cepas de diferentes regiones del mundo ha sido asociada con propiedades de antigenicidad y a una estrategia de supervivencia adoptada por *B. Bovis* (35,36). El polimorfismo de MSA-1 podría estar explicado por i) la presión inmune ejercida por el hospedero, ii) un proceso biológico independiente, o iii) ambos (37,38). La exposición de una proteína con diversidad antigénica al sistema inmunológico, como es el caso de MSA-1, podría considerarse un mecanismo utilizado por el parásito para evadir la respuesta inmunológica protectora desarrollada en el ganado durante exposiciones previas a *B. bovis* (34,39). Por lo tanto, la variación antigénica que caracteriza a MSA-1 es esencial para llevar a cabo el proceso de invasión (40).

Diferentes estudios han sugerido el papel crítico de MSA-1 en los primeros pasos de la invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos (32,33). La inmunización de ganado con MSA-1 recombinante induce anticuerpos que neutralizan la invasión de los merozoítos *in vitro*, evidenciando tan solo 0,34% de eritrocitos parasitados a las 96

h. Sin embargo, estos anticuerpos no confieren protección al ganado que fue sometido a un reto con la cepa virulenta T2BO de *B. bovis* (32).

La generación de sueros bovinos con anticuerpos dirigidos contra MSA-1 nativo logró neutralizar la infectividad de merozoítos *in vitro* en un 98% a las 96 h (33). Adicionalmente, el uso de anticuerpos específicos contra MSA-1 recombinante evidenció la disminución de la unión de esporozoítos a eritrocitos en un 63% a las 48 h (41). La expresión de MSA-1 tanto en merozoítos como en esporozoítos la ha postulado como un interesante candidato a vacuna, ya que al generar un bloqueo temprano en la ruta de invasión podría mejorar la efectividad de una vacuna contra *B. bovis* (41). Sin embargo, su uso debería estar asociado a inmunógenos que induzcan una respuesta inmunológica protectora para prevenir la aparición de babesiosis (32).

#### **Antígeno de membrana apical 1 (AMA-1)**

AMA-1 de *B. bovis* (BbAM-A1), una proteína transmembrana tipo I codificada por 605 aa y un peso molecular predicho de 66.7 kDa, es secretada por micronemas a la superficie del merozoíto y esporozoíto para participar en el proceso de invasión (28,42,43). Esta proteína es conservada dentro del filo *Apicomplexa* (42,44) ya que comparte tres características estructurales: 1) una región amino terminal compuesta por un péptido señal en los primeros 39 aa y un ectodominio que presenta 8 enlaces disulfuro formados por la asociación entre 16 cisteínas conservadas que pliegan la

proteína en los dominios I<sub>(41-271 aa)</sub>, II<sub>(272-409 aa)</sub> y III<sub>(410-522 aa)</sub>, 2) un dominio transmembranal y 3) una cola citoplasmática en el C-terminal (45–47).

Posterior al contacto inicial y reorientación de los parásitos Apicomplexas hacia su polo apical, AMA-1 es secretada para formar un complejo con las proteínas RONs y establecer la UM (24). Aunque en *Plasmodium* y *Toxoplasma* ha sido descrita la unión de RON2 al surco hidrofóbico de AMA-1 ubicado en el dominio II (48,49), hasta la fecha no se conoce con exactitud la dinámica de interacción entre estas dos moléculas en *B. bovis*.

El estudio de diversidad genética de *BbAMA-1* reveló bajos niveles de polimorfismo a lo largo de su secuencia completa, siendo los dominios I y III más polimórficos que el dominio II. Este resultado coincide con análisis de polimorfismo de AMA-1 de *Plasmodium falciparum* permitiendo inferir que estas regiones podrían estar participando en un proceso que garantiza la supervivencia de ambos parásitos (50,51).

Los diferentes trabajos realizados en *Toxoplasma*, *Plasmodium* y *Babesia* han demostrado como 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 (52–54). En *B. bovis*, la generación de anticuerpos contra tres péptidos sintéticos derivados de la región N-terminal y el dominio II de AMA-1 redujo la invasión a los eritrocitos en un 65% (55). Por otra parte, se ha demostrado el importante papel de la región central de *BbAMA-1* (que involucra los dominios I y II) al evidenciar como anticuerpos dirigidos contra esta región logran inhibir la invasión a eritrocitos en un 61% y 70% a las 3 h y 6 h, respectivamente (46). En conjunto,

estos resultados destacan que posiblemente *BbAMA-1* juegue un rol primordial en el proceso de invasión de *B. bovis* a eritrocitos bovinos y por ende destaca su importancia para postularlo como un antígeno candidato a vacuna.

### **Proteína de cuello de rotrias 2 (RON2)**

RON2 es una proteína de 1365 aa con 150 kDa de masa molecular la cual es codificada por un solo gen y localizada en la región del cuello de las rotrias. Esta molécula posee un péptido señal ubicado en los primeros 19 aa, tres dominios transmembrana y un dominio tipo cytoadherence linked asexual gene (CLAG) entre los aa 176 y 1168 que se encuentra implicado en el proceso de citoadherencia de *Apicomplexas* (10,56,57).

El establecimiento de la UM durante el proceso de invasión de *Apicomplexas* requiere la asociación de AMA-1 y RON2, en donde RON-2 a través de su dominio CLAG se inserta en la membrana de la célula huésped para asegurar una unión estrecha e irreversible (24,58). Adicionalmente, en *Plasmodium* y *Toxoplasma* se incluyen en este complejo las proteínas RON4, RON5 y RON8 (59–61) las cuales no han sido del todo caracterizadas en *Babesia*.

Análisis de identidad realizados con secuencias de aminoácidos de RON2 derivadas de cuatro cepas distintas de *B. bovis* y otras especies como *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. microti*, *Theileria equi* y *P. falciparum* revelaron un alto grado de conservación, entre 99,78% y 26%, lo que sugiere su participación en procesos esenciales para la supervivencia de *B. bovis* como por ejemplo la invasión de

eritrocitos bovinos (10). Esta hipótesis se confirmó a través de ensayos de neutralización *in vitro* usando anticuerpos anti-BbRON2 generados contra péptidos epítopes de células B. El estudio permitió confirmar que los anticuerpos eran capaces de bloquear la invasión de merozoítos de *B. bovis* hasta en un 43% durante 72 h (10). Considerando estos datos, se ha propuesto a RON2 como una molécula con potencial para ser estudiada como candidato a vacuna contra *B. bovis*.

## CONCLUSIÓN

La invasión de los parásitos *Apicomplexa* a sus células diana es un proceso bastante conservado que comprende las etapas de contacto inicial, la reorientación y la invasión la cual es facilitada por proteínas que establecen las interacciones específicas receptor-ligando. *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* han sido las especies con mayor número de estudios relacionados con proteínas que participan en el proceso de invasión celular. Estas especies tienen proteínas de superficie muy variables que se unen a tres principales glicoforinas (GPA, GPB y GPC) y al receptor Banda 3 mientras que presentan otras proteínas como AMA-1 y RONs cuya funcionalidad es muy conservada dado que ayudan a establecer la unión fuerte entre el parásito y su célula diana. En el caso de *Babesia*, este mecanismo es poco conocido dada la poca investigación en este campo. Aunque en la última década diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han revelado características de la dinámica de invasión como el tiempo de duración, los efectos sobre la membrana del eritrocito y el papel de algunos ligandos liberados por organelos apicales en especies como *B. divergens* y *B. microti*, no se conoce por completo

como pueden llegar a participar en el proceso de invasión. Si embargo, los pocos estudios de caracterización descritos a la fecha para las proteínas de *B. bovis* han permitido sugerir el posible rol en el contacto inicial para MSA-1 y en la unión móvil para AMA-1 y RON2, siendo desconocidos los receptores para estas moléculas. Teniendo claro el rol que representan las anteriores moléculas para el reconocimiento, la motilidad, reorientación e internalización de parásitos *Apicomplexa* dentro de sus células diana, es importante profundizar su estudio en la especie *Babesia bovis*. Por lo tanto, estudiar moléculas involucradas en estos pasos podría contribuir con el entendimiento de la biología de *B. bovis* y al desarrollo de estrategias de control efectivas contra esta parasitosis.

### **CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

### **FINANCIACIÓN**

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Boyacá.

### **CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES**

LC, AC y MG escribieron el borrador inicial. DAMP realizó la revisión crítica del manuscrito. CR modeló la figura. Todos los autores han leído y aprobado la versión final del manuscrito.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por permitirnos desarrollar este trabajo en la Línea de Investigación Básica en Biología Molecular.

## REFERENCIAS

1. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 2004;129(7): S247-69. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>.
2. Lew-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick-Borne Dis*. 2016;7(4):573-85. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>.
3. Hunfeld K, Hildebrandt A, Gray J. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1219-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>.
4. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol*. 2011;180(1-2):109-25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>.
5. Ishizaki T, Sivakumar T, Hayashida K, Tuvshintulga B, Igarashi I, Yokoyama N. RBC invasion and invasion-inhibition assays using free merozoites isolated after cold treatment of *Babesia bovis* in vitro culture. *Exp Parasitol*. 2016;166:10-5. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.010>.
6. Nava A, Verzal J, González-Acuña D, Martins T, Guglielmone A. Ticks of the Southern Cone of America. Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Academic Press. 2017. 372.
7. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol*. 2008;47(1):261-73. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.012>.
8. Lobo CA, Rodriguez M, Cursino-Santos JR. Babesia and red cell invasion: *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):170-5. <https://doi.org/10.1097/moh.0b013e328352245a>.
9. 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. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>.

10. 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. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3164-2>
11. Kwong WK, del Campo J, Mathur V, Vermeij MJA, Keeling PJ. A widespread coral-infecting apicomplexan contains a plastid encoding chlorophyll biosynthesis. bioRxiv. 2018; <https://doi.org/10.1101/391565>
12. Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. Int J Parasitol. 1998;28(7):1007-13. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00076-9).
13. 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>.
14. Bargieri D, Lagal V, Andenmatten N, Tardieux I, Meissner M, Ménard R. Host cell invasion by apicomplexan parasites: the junction conundrum. PLoS Pathog. septiembre de 2014;10(9):e1004273. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004273>.
15. Proellocks NI, Coppel RL, Waller KL. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. Trends Parasitol. 2010;26(6):297-304. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.02.012>.
16. Tyler JS, Treeck M, Boothroyd JC. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. Trends Parasitol. 2011;27(9):410-20. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.002>.
17. Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, et al. Proteomic Analysis of Rhoptry Organelles Reveals Many Novel Constituents for Host-Parasite Interactions in *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem. 2005;280(40):34245-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504158200>.
18. Morrissette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2002;66(1):21-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
19. Portman N, Foster C, Walker G, Šlapeta J. Evidence of intraflagellar transport and apical complex formation in a free-living relative of the apicomplexa. Eukaryot Cell. 2014;13(1):10-20. <https://doi.org/10.1128/EC.00155-13>.
20. Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol. 1997;73(2):114-23.
21. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. Curr Opin Microbiol. 2007;10(6):582-7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.013>.
22. Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite Plasmodium falciparum



- inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malar J.* 2010;9:77. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-77>.
23. Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, et al. Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(32):13275-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108>.
  24. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>.
  25. Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial H, et al. The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.* 2005;7(12):1823-33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00646.x>.
  26. 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. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.02.007>.
  27. Besteiro S, Michelin A, Poncet J, Dubremetz J-F, Lebrun M. Export of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000309. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>.
  28. Besteiro S, Dubremetz J-F, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion: The moving junction of apicomplexan parasites. *Cell Microbiol.* 2011;13(6):797-805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>.
  29. 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. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90096-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90096-0).
  30. 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. <https://doi.org/10.1128/iai.56.9.2363-2368.1988>
  31. Johnson WC, Taus NS, Reif KE, Bohaliga GA, Kappmeyer LS, Ueti MW. Analysis of Stage-Specific Protein Expression during *Babesia Bovis* Development within Female *Rhipicephalus Microplus*. *Journal of proteome research.* 2017;16(3):1327-38. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00947>.
  32. 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. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.349-352.1995>
  33. 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. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90129-8).
34. Carcy B, Précigout E, Schetters T, Gorenflot A. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet Parasitol.* 2006;138(1-2):33-49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.038>.
  35. 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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2145>.
  36. 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;1149:121-5. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.070>.
  37. Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Hines SA, Lew AE, et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun.* 2005;73(9):5388-94. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5388-5394.2005>.
  38. Tattiyapong M, Sivakumar T, Takemae H, Simking P, Jittapalapong S, Igarashi I, et al. Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2016;41:255-61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.021>.
  39. Sivakumar T, Okubo K, Igarashi I, de Silva WK, Kothalawala H, Silva SSP, et al. Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2013;19:134-40. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.001>.
  40. 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. *Infect Immun.* 2000;68(12):6865-70. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6865-6870.2000>.
  41. 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1599-1603.2002>.
  42. Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* 2000;38(4):706-18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x>.
  43. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the Protective Antibody Response to Apical Membrane Antigen 1. *Infect Immun.* 2001;69(5):3286-94. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3286-3294.2001>.

44. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz J-F, Ortega-Barria E, et al. Toxoplasma gondii Homologue of Plasmodium Apical Membrane Antigen 1 Is Involved in Invasion of Host Cells. *Infect Immun.* 2000;68(12):7078-86. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7078-7086.2000>.
45. Montero E, Rodriguez M, Oksov Y, Lobo CA. Babesia divergens Apical Membrane Antigen 1 and Its Interaction with the Human Red Blood Cell. *Infect Immun.* 2009;77(11):4783-93. <https://doi.org/10.1128/IAI.00969-08>.
46. Salama AA, Terkawi MA, Kawai S, AbouLaila M, Nayel M, Mousa A, et al. Specific antibody to a conserved region of Babesia apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of B. bovis into the erythrocyte. *Exp Parasitol.* 2013;135(3):623-8. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.09.017>.
47. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CHM, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol.* 2008;24(2):74-84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002>.
48. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144764>.
49. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001282>.
50. Rittipornlertrak A, Nambooppha B, Simking P, Punyapornwithaya V, Tiwananthagorn S, Jittapalpong 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.009>.
51. Polley SD, Conway DJ. Strong diversifying selection on domains of the Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 gene. *Genetics.* 2001;158(4):1505-12.
52. 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):4341-49. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0281>.
53. Yap A, Azevedo MF, Gilson PR, Weiss GE, O'Neill MT, Wilson DW, et al. Conditional expression of apical membrane antigen 1 in Plasmodium falciparum shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. *Cell Microbiol.* 2014;16(5):642-56. <https://doi.org/10.1111/cmi.12287>.
54. Bilgic HB, Hacilarlioglu 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. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101280>.

55. 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2947-2955.2004>.
56. 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1098-4>.
57. Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, Howell S, Shirano M, Tachibana M, et al. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;118(2):223-31. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00391-7](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00391-7).
58. Cao J, Kaneko O, Thongkukiakul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, et al. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Int*. 2009;58(1):29-35. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.09.005>.
59. Morahan BJ, Sallmann GB, Huestis R, Dubljevic V, Waller KL. *Plasmodium falciparum*: genetic and immunogenic characterisation of the rhoptry neck protein PfRON4. *Exp Parasitol*. 2009;122(4):280-8. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.013>.
60. Mutungi JK, Yahata K, Sakaguchi M, Kaneko O. Expression and localization of rhoptry neck protein 5 in merozoites and sporozoites of *Plasmodium yoelii*. *Parasitol Int*. 2014;63(6):794-801. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.013>.
61. Straub KW, Peng ED, Hajagos BE, Tyler JS, Bradley PJ. The moving junction protein RON8 facilitates firm attachment and host cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2011;7(3):e1002007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002007>.