

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN
DE LA PROTEÍNA VDAC DE *Rhipicephalus
microplus* (BmVDAC) AL PLASMINÓGENO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN:

CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

MARIANA AMARO IBARRA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Minerva Camacho Nuez

Ciudad de México, 28 de Enero del 2026.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Plantel Del Valle

Integración de Jurado

Presidente	Profesora-Investigadora, Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)
Secretario	Profesora-Investigadora, Dra. Minerva Camacho Nuez, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)
Vocal	Profesora-Investigadora, Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma De La Ciudad De México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por ser un espacio de formación académica esencial, incluyente y comprometida con el conocimiento de sus alumnos, la cual me permitió desarrollar este trabajo de investigación.

Agradezco al posgrado en Ciencias Genómicas por la sólida formación científica brindada y por fomentar la investigación durante mi tiempo en la Licenciatura para un óptimo desarrollo profesional.

A CONAHCYT por el financiamiento del proyecto (CB-2016-283344), el cual fue de gran apoyo al momento de desarrollar esta tesis.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, la Dra. Minerva Camacho Nuez, por su guía, paciencia, cariño y acompañamiento a lo largo de este proceso; de igual manera a la Dra. Jacqueline Castañeda por ser parte fundamental de nuestro equipo de trabajo y del desarrollo de la investigación; gracias a ambas por ser grandes guías.

A las y los profesores del posgrado, quienes a lo largo de la licenciatura compartieron su conocimiento y demostraron su compromiso con mi formación profesional y científica.

DEDICATORIA

A mis padres, gracias por su amor incondicional, por su paciencia infinita y por el apoyo constante que me brindaron en cada etapa de este camino. Gracias por creer en mí incluso en momentos de duda, por los valores que me han enseñado y que predicán con el ejemplo. Este logro no sería posible sin los sacrificios que han hecho por mí durante todos estos años, esta tesis les pertenece tanto como a mí.

A mis amigos de laboratorio: a Gahel por su apoyo en los experimentos y por siempre hacerme reír para hacer más llevadero el trabajo, a Itan que, a pesar de integrarse a mi vida en el último año, ha sido gran soporte y excelente amiga, a Michi y Ari por darme ánimos y siempre estar presentes cuando las necesitaba, a Marquitos y Alfredivito por ser los doctores del grupo y grandes amigos, a Ana Laura por sus consejos y apoyo moral; a todos ustedes, gracias por brindarme su amistad.

A mi gatita Leia, por acompañarme fielmente en las largas noches de desvelo durante el desarrollo de esta tesis. Por su silenciosa compañía y ronroneos oportunos en los momentos de cansancio o incertidumbre. Este trabajo también tiene su huella.

A la familia Ibarra por siempre tener curiosidad en lo que hago, gracias por su apoyo e interés en los proyectos en los que estoy involucrada.

Y, por último, pero no menos importante, a la Dra. Minerva Camacho, le agradezco profundamente todas las herramientas que me ha otorgado para mi desarrollo académico, gracias a usted me siento capaz de entrar a mundo laboral sin miedo alguno.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
I. INTRODUCCIÓN	12
1. Generalidades de la garrapata <i>Rhipicephalus spp.</i>	12
a) Distribución geográfica	12
b) Taxonomía	14
c) Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	14
d) Características del genoma de <i>R. microplus</i>	16
e) Impacto económico	17
f) Transmisión de enfermedades	18
2. Características generales de la babesiosis bovina	18
3. Generalidades de <i>Babesia bigemina</i>	19
a) Taxonomía	19
b) Ciclo biológico	20
c) Métodos de diagnóstico	22
d) Medidas de control para combatir la babesiosis bovina	23
4. Métodos de control para las garrapatas y sus mecanismos de resistencia	24
a) Mecanismos de resistencia	25
b) Métodos inmunológicos de control para <i>R. microplus</i> : Vacunas	26
5. Proteínas involucradas en la interacción parásito-vector	27
II. ANTECEDENTES PARTICULARES	30
1. La proteína VDAC	30
a) Generalidades de la proteína VDAC	30

b) Isoformas de VDAC	31
c) VDAC como candidato vacunal	32
d) VDAC en la membrana plasmática	35
e) VDAC como receptor del plasminógeno	36
2. Sistema fibrinolítico	37
a) Sistema fibrinolítico en las garrapatas	37
b) Regulación del sistema fibrinolítico	38
3. Plasminógeno y <i>Bm</i> VDAC	39
a) Dominios kringle del plasminógeno	40
III. HIPÓTESIS	41
IV. JUSTIFICACIÓN	41
V. OBJETIVO GENERAL	42
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	42
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. Material biológico	44
2. Obtención de la proteína recombinante <i>Bm</i> VDAC (<i>rBm</i> VDAC)	44
3. Análisis <i>in silico</i> del plasminógeno humano y bovino	46
4. Clonación de fragmentos <i>kringle</i> 4-5 y <i>kringle</i> 5 del plasminógeno bovino	47
a) Diseño de la secuencia a sintetizar <i>k4-5</i> y <i>k5</i>	47
b) Preparación del vector <i>pColdII</i> vacío	47
c) Clonación de fragmentos que codifican para <i>k4-5</i> y <i>k5</i> en <i>pColdII</i>	49
d) Inducción de las proteínas <i>k4-5</i> y <i>k5</i>	50
e) Purificación de las proteínas <i>k4-5</i> y <i>k5</i>	51
5. Ensayo de unión plasminógeno humano/ <i>rBm</i> VDAC en membrana de nitrocelulosa	52
a) Transferencia	52
b) Ensayo de unión a ligandos	52

6.	Ensayo de unión de ligando en placa dosis dependiente e inhibición con ϵ ACA	52
a)	Ensayo de unión de ligando con HPIg y <i>rBmVDAC</i>	52
b)	Ensayo de unión de ligando de los dominios k4-5, k5 de plasminógeno bovino y <i>rBmVDAC</i>	53
c)	Curva de inhibición de la unión de <i>rBmVDAC</i> con los dominios k4-5 y k5 del BoPIg con el análogo de la lys ϵ ACA	54
7.	Determinación de la activación de la plasmina en presencia de <i>rBmVDAC</i>	54
IX.	RESULTADOS	55
X.	DISCUSIÓN	76
XI.	CONCLUSIONES	79
XII.	BIBLIOGRAFÍA	80
XIII.	ANEXOS	
1.	Publicaciones	91
2.	Congresos	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades genómicas del genoma de <i>R. microplus</i>	17
Tabla 2. Acaricidas empleados como método de control de <i>R. microplus</i> en México	25
Tabla 3. Cronología de la resistencia de <i>R. microplus</i> a los acaricidas en México	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la situación zoonositaria de la campaña contra la garrapata del género <i>Rhipicephalus</i> en el territorio mexicano	13
Figura 2. Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	16
Figura 3. Frotis sanguíneos de diferentes formas parasitarias de <i>B. bigemina</i>	20
Figura 4. Ciclo biológico de <i>Babesia spp.</i>	22
Figura 5. Estructura VDAC-1 en humanos	32
Figura 6. Ensayo de overlay de proteínas de intestino de garrapata con fases sexuales de <i>Babesia spp.</i>	33
Figura 7. Expresión del gen <i>vdac</i> y abundancia de la proteína VDAC en el intestino de la garrapata durante el periodo de infección e inmunolocalización de <i>BmVDAC</i>	34
Figura 8. Mecanismo pro y anti-fibrinolítico	38
Figura 9. Interacción de <i>BmVDAC</i> con HPIg	39
Figura 10. Inducción de la proteína <i>rBmVDAC</i>	56
Figura 11. Cromatograma de <i>rBmVDAC</i> purificada por cromatografía de afinidad con el protocolo "On Column Refolding"	57

Figura 12. Fracciones 13-20 de <i>rBmVDAC</i> purificadas por FPLC	57
Figura 13. Unión de <i>rBmVDAC</i> al plasminógeno humano	58
Figura 14. Curva dosis dependiente de la interacción entre <i>rBmVDAC</i> /HPIg	60
Figura 15. Estudio de la interacción <i>rBmVDAC</i> /HPIg a [16 µg]	60
Figura 16. Ensayo de activación del plasminógeno	61
Figura 17. Homología entre el plasminógeno bovino y plasminógeno humano	63
Figura 18. Alineamientos de los dominios kringles del plasminógeno bovino y humano	64
Figura 19. Vector e insertos purificados	65
Figura 20. Análisis de las clonas obtenidas de la transformación con el producto de ligación pColdII/ <i>Kringle 5</i>	66
Figura 21. Análisis de las clonas resultantes de la transformación de la ligación con pColdII/ <i>Kringle 4-5</i>	67
Figura 22. Inducción de las proteínas <i>kringle 5</i> y <i>kringle 4-5</i>	68
Figura 23. Prueba de solubilidad de las proteínas <i>kringle 5</i> y <i>kringle 4-5</i>	69
Figura 24. Cromatograma de las proteínas <i>kringle 5</i> y <i>kringle 4-5</i> purificadas por cromatografía de afinidad con el protocolo “On Column Refolding”	70
Figura 25. Fracciones de <i>kringle 5</i> y <i>kringle 4-5</i> purificadas en FPLC	70
Figura 26. Fracciones dializadas y concentradas de <i>k5</i> y <i>k4-5</i>	71
Figura 27. Curva dosis dependiente de las interacciones entre <i>rBmVDAC</i> / <i>kringle 5</i> y <i>rBmVDAC</i> / <i>kringle 4-5</i>	72
Figura 28. Análisis de la interacción <i>rBmVDAC</i> / <i>k5</i> y <i>rBmVDAC</i> / <i>k4-5</i> a [8 µg]	73

Figura 29. Curvas de inhibición de la interacción rBmVDAC/k4-5

y rBmVDAC/k5

75

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

µg: Microgramo

µl: Microlitros

B. bigemina: *Babesia bigemina*

B. bovis: *Babesia bovis*

BmVDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje de *Rhipicephalus microplus*

BoPlg: Plasminógeno bovino

BSA: Albúmina de Suero Bovino

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas

HPlg: Plasminógeno humano

kb: kilobases

kDa: Kilodaltones

M: Molar

LB: Medio Luria-Bertani

nm: Nanómetros

pb: pares de bases

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PBS-T: Amortiguador de fosfatos salinos-Tween 20

PM: Peso molecular

R. microplus: *Rhipicephalus microplus*

rpm: revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

tPA: Activador tisular del plasminógeno

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinidasa

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje.

xg: gravedades

RESUMEN

Rhipicephalus microplus es un ectoparásito del ganado bovino, el cual causa pérdidas económicas debido al daño directo del hospedero, los costos de tratamiento y la transmisión de patógenos. El uso de compuestos químicos contra estos ectoparásitos posee desventajas, ya que contaminan al medio ambiente, así como la carne y la leche de los bovinos infestados. Actualmente solo existe una vacuna contra *R. microplus* que no protege adecuadamente contra aislados de diferentes regiones geográficas por lo que el estudio de proteínas de garrapata es esencial para el desarrollo de una nueva vacuna. La proteína VDAC (*BmVDAC*) de *R. microplus* fue identificada anteriormente y probada como candidato vacunal con resultados satisfactorios. Adicionalmente, se demostró que *BmVDAC* interactúa con las fases sexuales de *Babesia bigemina*, y los niveles de la proteína aumentan en las garrapatas infectadas, por lo que fue de nuestro interés profundizar en los estudios sobre la posible función de esta proteína. En la presente investigación se determinó a través de un ensayo de ligando en membrana, que *BmVDAC* interactúa con el plasminógeno humano; en ensayos de unión en placa se demostró que esta interacción es específica y dependiente de la dosis. Por otra parte, esta unión disminuye significativamente en presencia de 10mM y 40mM del ácido ϵ -aminocaproico (ϵ ACA), un análogo de la lisina, cuya presencia se ha reportado como esencial en la interacción de proteínas con el plasminógeno. Asimismo, *BmVDAC* incrementa significativamente la activación del plasminógeno. Debido a que la comercialización del plasminógeno bovino está prohibida en México, para demostrar esta interacción con el plasminógeno bovino se obtuvieron los péptidos recombinantes correspondientes a los dominios kringle 4-5 y kringle 5 del plasminógeno bovino. Los resultados mostraron una interacción dosis dependiente entre los péptidos recombinantes y *BmVDAC*, de igual forma la interacción disminuyó significativamente en presencia de ϵ ACA (10, 20 y 40 mM). En este trabajo se demostró que *BmVDAC* interactúa específicamente con el dominio kringle 5 del plasminógeno bovino, lo que sugiere que *BmVDAC* puede encontrarse en la membrana de las células del intestino, realizando funciones diferentes a las que realiza en la mitocondria. Este es el primer estudio en el que se reporta la activación del plasminógeno mediante su interacción con VDAC de un organismo no mamífero (*BmVDAC*).

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, los cuales, transmiten enfermedades a humanos y animales durante su alimentación. Estos artrópodos se consideran uno de los vectores de patógenos más importantes, siendo superados únicamente por los mosquitos (Parola and Raoult, 2001). A nivel mundial se han reportado alrededor de 900 especies de garrapatas en tres familias: *Ixodidae* (garrapatas duras), *Argasidae* (garrapatas blandas), y *Nuttalliellidae* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2016), de las cuales aproximadamente el 10% son vectores de enfermedades como la anaplasmosis, babesiosis, ehrlichiosis, enfermedad de Lyme y fiebre de las montañas rocosas en animales domésticos, silvestres y en humanos (NJ Health, 2022).

La distribución de las garrapatas a nivel mundial muestra una concentración en países con clima templado y subtropicales del hemisferio norte, principalmente en 3 regiones: Asia (China, Pakistán, India, Turquía, Japón, Myanmar y Vietnam), América del norte (Estados Unidos, México, una parte de Canadá y Cuba) y Europa occidental (Francia, España, Rusia, Ucrania, Alemania, Italia, Polonia, Rumania y Reino Unido). Los factores climáticos afectan directamente la distribución de las garrapatas, como la humedad, los rangos de temperatura, la biodiversidad y las prácticas agrícolas (Cao *et al.*, 2025).

En México se han encontrado 100 especies de garrapatas principalmente de las familias *Ixodidae* y *Argasidae* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2016), las cuales afectan al ganado bovino en regiones tropicales, subtropicales y templadas del país, siendo las de mayor importancia económica y sanitaria para la ganadería bovina, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus annulatus* y *Amblyomma mixtum* (Miguel Alonso and Fernández, 2022).

1. Generalidades de la garrapata *Rhipicephalus spp.*

a) Distribución geográfica

Actualmente, el 30.60% del territorio mexicano, equivalente a 599,367.84 km² se encuentra libre de *Rhipicephalus spp.*, correspondiente a los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, norte de Baja California Sur y Chihuahua (excepto por

los municipios de Guadalupe, Calvo y Morelos) y el Norte de Baja California Sur (SENASICA, 2025).

Los municipios que se encuentran en fase de erradicación son Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur, los municipios de Ahome, el Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, los municipios de Cuatro Ciénegas, Ocampo y Sierra Mojada en Coahuila, que en conjunto corresponde al 3.44% del territorio nacional, equivalente a 67,472.76 km².

El resto del territorio nacional correspondiente a un 65.96% se encuentran regiones en fase de control y zonas libres naturales de garrapata *Rhipicephalus*, equivalente a 1,292,407.02 km cuadrados (Figura 1) (SENASICA, 2025).



Figura 1. Mapa de la situación zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata del género *Rhipicephalus* en el territorio mexicano (SENASICA, 2025).

Anteriormente se conocía a la garrapata común del ganado como *Boophilus microplus*, sin embargo, a partir de análisis moleculares y del genoma se reclasificó el género *Boophilus* como un subgénero del género *Rhipicephalus* (Barker and Murrell, 2004).

b) Taxonomía

La clasificación taxonómica de *R. microplus* se detalla a continuación:

- Reino: *Animalia*
- Filo: *Arthropoda*
- Clase: *Arachnida*
- Orden: *Ixodida*
- Familia: *Ixodidae*
- Género: *Rhipicephalus*
- Especie: *Rhipicephalus microplus*

c) Ciclo biológico de *R. microplus*

El ciclo biológico de *R. microplus* se desarrolla en un solo hospedero (bovinos) y se realiza de la siguiente manera:

1. Fase de vida libre

También conocida como fase no parasitaria, se lleva a cabo en la tierra o hierba en donde las garrapatas suben al bovino para alimentarse y posteriormente se desprenden del bovino post repleción, dando como resultado la aparición de larvas en los pastos (Sonenshine, 1991), durante esta fase ocurren 5 etapas distintas (Figura 2):

- a) Pre-ovoposición: Después de desprenderse del bovino, las garrapatas buscan un ambiente protegido de los rayos UV con condiciones favorables de humedad (80-90%), así como una temperatura de 28-30°C; esta fase dura de 2-4 días.
- b) Oviposición: La garrapata inicia la postura de los huevos, los cuales pueden ser entre 1500 a 5000; esta etapa dura entre 4 a 60 días dependiendo de las condiciones ambientales.

- c) Post-oviposición: Después de colocar el último huevo, la garrapata muere en un periodo de 2 a 15 días.
- d) Incubación: Es la etapa que inicia con el fin de la ovoposición y termina en la eclosión larvaria.
- e) Eclosión: Las larvas emergen del huevo con un porcentaje de eclosión superior al 80% en condiciones ambientales favorables.

2. Fase de encuentro

Las larvas eclosionadas suben a las plantas a esperar la llegada del bovino y así subir a él, estas larvas de vida libre pueden sobrevivir varios días dependiendo de las condiciones ambientales.

3. Fase de vida parasitaria

Las larvas se adhieren a la piel del bovino alimentándose de sangre durante las primeras 24 horas hasta saciarse, posteriormente se desarrolla la primera muda meta-larva para convertirse en ninfa, la cual continúa alimentándose de sangre y realiza la segunda muda a meta-ninfa y así da origen a machos y hembras adultas jóvenes.

Las garrapatas hembras comienzan a secretar feromonas que indican al macho el momento del apareamiento, posteriormente las hembras se alimentan de sangre hasta repletarse y se desprenden del bovino para comenzar nuevamente el ciclo, mientras que los machos no se repletan de sangre, ya que tiene la función de comer y aparearse, así entonces busca nuevas hembras para continuar con la reproducción hasta su muerte (M Alonso and Fernández, 2022).

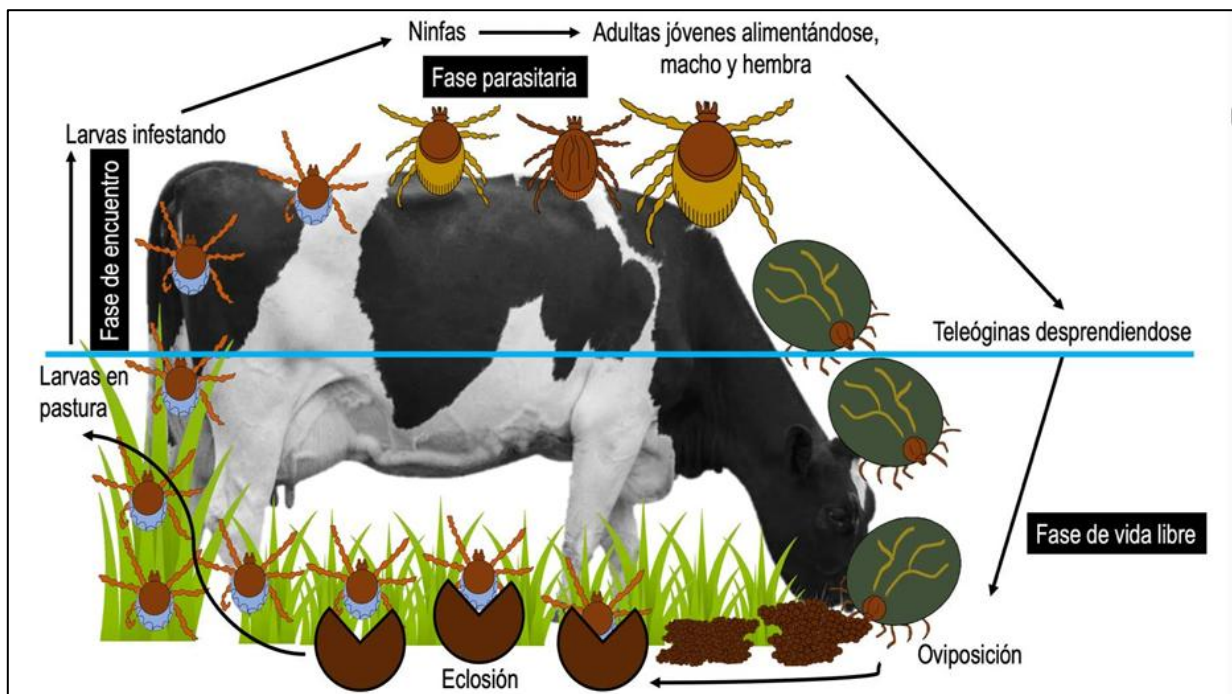


Figura 2. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Representación de las diferentes fases del ciclo biológico de la garrapata en su hospedero bovino. Imagen tomada de M Alonso and Fernández, 2022.

d) Características del genoma de *R. microplus*

En 2012 se realizó la notación del genoma de *R. microplus*, el cual actualmente se encuentra obsoleto debido a que solamente se logró secuenciar 145 Mbp (Bellgard *et al.*, 2012), posteriormente en 2017 se estimó que el genoma de *R. microplus* era de 7.1 Gbp y el 70% era DNA repetitivo, por lo tanto, se realizó un ensamblaje utilizando 195,084 scaffolds, con 51.46% de ensamblaje repetitivo, las muestras fueron colecciones agrupadas de óvulos de las generaciones f7, f10, f11 y f12 del aislado (Barrero *et al.*, 2017); más adelante en China se realizó un ensamblaje a nivel cromosómico con buena contigüidad (N50), el cual es recomendado para análisis estructurales sólidos debido a sus anotaciones robustas (Jia *et al.*, 2020), y finalmente en 2023 Clinglobal realizó una secuenciación por la técnica Oxford Nanopore MinION, en donde la fuente de aislamiento fueron huevos de garrapatas y el tipo de ensamblaje fue a través de contigs con alta longitud pero sin scaffolding (Clinglobal, 2023) (Tabla 1).

Tabla 1. Características del genoma de *R. microplus*. Diferentes tipos de técnicas de ensamblajes a lo largo de los años para el genoma de *R. microplus*.

Genoma de <i>Rhipicephalus microplus</i>				
	2012	2017	2020	2023
Tamaño del genoma	144.7 Mb	2 Gb	2.5 Gb	2.7 Gb
Cromosomas	0	0	12	0
Secuencia del genoma	175,208	195,084	7,048	11,348
Contenido de GC	41.5	45	46	45.5
No. De Scaffolds	175,208	195,084	7,048	NA
Scaffold N50 (pb)	827	60,268	183,350,851	NA
No. De secuencia Conting	175,211	280,296	8,624	11,348
Conting N50	-	-	1,791,079	1,889,595
Genes	-	38,827	28,973	59,923
Genes codificantes de proteínas	-	24,758	18,598	59,834

e) Impacto económico

Las garrapatas provocan pérdidas económicas directas al sector ganadero debido al daño causado en la piel del bovino por las picaduras del ectoparásito, desnutrición, abortos, baja producción de leche, deterioro de la salud del bovino y la muerte del ganado (Rodríguez-Vivas, Ojeda and Rosado, 2011).

Las pérdidas económicas indirectas están relacionadas con el costo del tratamiento clínico para el bovino, el costo de los garrapaticidas, baja reproducción de los bovinos y decomiso de los productos ganaderos por residuos de garrapaticidas (Dominguez, Torres and Rosario, 2016). En México se estima una pérdida de \$573.6 millones de dólares derivadas de la merma de leche y carne (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017), y el clima tropical propicia el desarrollo óptimo de las garrapatas asegurando su ciclo de vida, por lo que se calcula que más de 24 millones de cabezas de ganado están en riesgo de infestación (De la Fuente *et al.*, 2007). Adicionalmente las garrapatas pueden transmitir enfermedades de gran impacto económico para la ganadería.

f) Transmisión de enfermedades

R. microplus transmite principalmente 3 patógenos al ganado bovino: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* (protozoarios) y *Anaplasma marginale* (bacteria intracelular obligada), causantes de la babesiosis y anaplasmosis bovina, respectivamente (Jongejan and Uilenberg, 2004).

La tasa de transmisión de *B. bovis* y *B. bigemina* es alta, por lo tanto, hay una mayor prevalencia en las áreas donde la garrapata es endémica (Bock *et al.*, 2004). Consecuentemente, la babesiosis bovina representa un problema económico de aproximadamente 500 millones de dólares al año (De la Fuente, Estrada-Peña and Venzal, 2008).

2. Características generales de la babesiosis bovina

La babesiosis, también conocida como “fiebre de garrapatas”, es una enfermedad transmitida por garrapatas cuyo agente causal es *Babesia spp.* el cual es un hemoparásito intracelular del Filum *Apicomplexa*, orden *Piroplasmorida* y familia *Babesiidae* (Montes-Farah *et al.*, 2020). Existen 6 especies de *Babesia*, que pueden transmitir la babesiosis: *B. bovis*, *B. bigemina* (ambas transmitidas por *R. microplus*), *B. divergens* (transmitida por *Ixodes ricinus*), *B. major*, *B. ovata* y *B. jakimovi*; sin embargo, las de mayor importancia son *B. bovis* y *B. bigemina* (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2021).

El ganado infectado por *Babesia spp.* tiene un periodo de incubación de 6-12 días, siendo la fiebre el primer signo de la enfermedad y como consecuentes la hemoglobinuria, ictericia, anemia, pérdida de peso, deshidratación, temblor muscular, debilidad, constipación (Benavides and Sacco, 2007). En el caso de las terneras preñadas, puede causar el aborto (Bock *et al.*, 2004); además de una notoria falta de apetito, reduciendo su ingesta de alimento a 4.37kg en comparación con el ganado no infectado el cual consume un promedio de 5.66kg de alimento diario (Rodriguez-Vivas *et al.*, 2006), en casos graves o sin tratar puede conducir a la muerte del bovino. Adicionalmente, el ganado infectado también presenta agrandamiento del hígado y del bazo, distensión

de la vesícula biliar, edema pulmonar, congestión de los riñones y decoloración rosa de la materia gris del cerebro (Bock *et al.*, 2004).

Los animales infectados por *Babesia spp.* permanecen infectados incluso después del tratamiento y de haber sobrevivido a la infección, por lo tanto, son reservorios del parásito que infectan a las garrapatas que se alimenten del bovino, asegurando su permanencia en el medio ambiente (Mahoney, Wright and Mirre, 1973).

3. Generalidades de *Babesia bigemina*

a) Taxonomía

La clasificación taxonómica del agente etiológico de la babesiosis (Levine, 1971) es:

- Reino: *Protozoa*
- Phylum: *Apicomplexa*
- Clase: *Sporozoea*
- Subclase: *Piroplasma*
- Superfamilia: *Babesioidea*
- Familia: *Babesidae*
- Género: *Babesia*

Las babesias se dividen en 2 grupos: babesias pequeñas con un tamaño de entre 1,0-2,5 μm y babesias grandes de 2,5-5,0 μm ; *B. bigemina* se encuentra dentro del grupo de babesias “grandes” mientras que *B. bovis* se encuentra dentro del grupo de las babesias “pequeñas” (Petrigh, 2010). *B. bigemina* se puede observar morfológicamente como un par de corpúsculos en forma de pera unidos en un ángulo agudo con un tamaño de entre 4 y 5 micras dentro del eritrocito, aunque también se puede encontrar en forma redonda con un tamaño de entre 2 y 3 micras, al igual que pueden encontrarse de forma ovalada o incluso irregular (Gasque, 2008). Hay diferentes formas parasitarias dentro

del eritrocito, como lo es el trofozoito (Figura 3. Panel A y B) (Benavides *et al.*, 2012) o en merozoito (Mosqueda *et al.*, 2004) (Figura 3. Panel C).



Figura 3. Frotis sanguíneos de diferentes formas parasitarias de *B. bigemina*. Panel A. A= Trofozoito anular, Panel B: P= Trofozoito piriforme doble. Fotografía tomada por E. Benavides y O. Vizcaíno. Panel C. Merozoito de *Babesia*, fotografía tomada por J. Mosqueda.

b) Ciclo biológico

El ciclo biológico tanto de *B. bigemina* como de *B. bovis* consta de una etapa sexual en la garrapata y una etapa asexual en el bovino (Figura 4); la etapa asexual comienza cuando una larva infectada por *Babesia* se alimenta de un bovino, y a través de la saliva libera a los parásitos en forma de esporozoitos que son el estado infectante de *Babesia*, los cuales migran de las glándulas salivales de la garrapata hacia el torrente sanguíneo del bovino, en donde invaden a los eritrocitos (Figura 4-A) y posteriormente maduran a trofozoítos, los cuales tienen apariencia de anillo ya que pierden sus órganos especializados (Figura 4-B). Los trofozoitos están en contacto directo con el citoplasma de los glóbulos rojos y se dividen mediante fisión binaria (Figura 4-C) dando lugar a 2 merozoitos haploides por cada uno, al principio estos merozoitos se encuentran unidos por la porción anterior (Figura 4-D) y al madurar se separan por completo, causando una lisis celular para salir de la célula e invadir un nuevo eritrocito, continuando con la reproducción asexual indefinidamente hasta que el bovino muere o el parásito se elimina (Figura 4-E y F) (J. Mosqueda *et al.*, 2012) (Corona, 2021) (Luna, 2019).

La etapa sexual inicia cuando una garrapata se alimenta de la sangre de un bovino infectado e ingiere los parásitos en forma de merozoitos. En el proceso de digestión

dentro del intestino de la garrapata muere un gran porcentaje de los parásitos debido al medio en el que se encuentran, y los que sobreviven se convierten en gametocitos extracelulares (Figura 4-G) que al liberarse de los eritrocitos infectados, se diferencian en gametos masculinos y femeninos en las primeras 24 horas post-repleción; los gametocitos se reproducen de forma sexual (singamia) para formar un cigoto diploide (Figura 4-H), el cual madura a una etapa infectiva a las 48 horas post-repleción diferenciándose a un oocito que invade las células intestinales de la garrapata y luego se multiplica en las células basófilas. A través de meiosis del oocito se generan las formas móviles llamados quinetos, los cuales destruyen las células intestinales para salir a otros tejidos (Figura 4-I, J y K); posteriormente migran a través de la hemolinfa a las 72 horas post- repleción y se dividen de forma similar que en el intestino, ocasionando una infección transovárica (Figura 4-L) al penetrar las células embrionarias, para que cuando la hembra ovoposite, los embriones estén infectados por los quinetos (Figura 4-M). Cuando las larvas eclosionan de huevecillos infectados con quinetocitos, estos migran a las glándulas salivales y se diferencian en esporoblastos (Figura 4-N), y cuando la larva se adhiera a un nuevo bovino para alimentarse, cada esporoblasto dará lugar a miles de esporozoitos (Figura 4-O), los cuales vuelven a ser depositados en el torrente sanguíneo del bovino para continuar con el ciclo de vida (Figura 4-P) (Luna, 2019) (J. Mosqueda *et al.*, 2012).

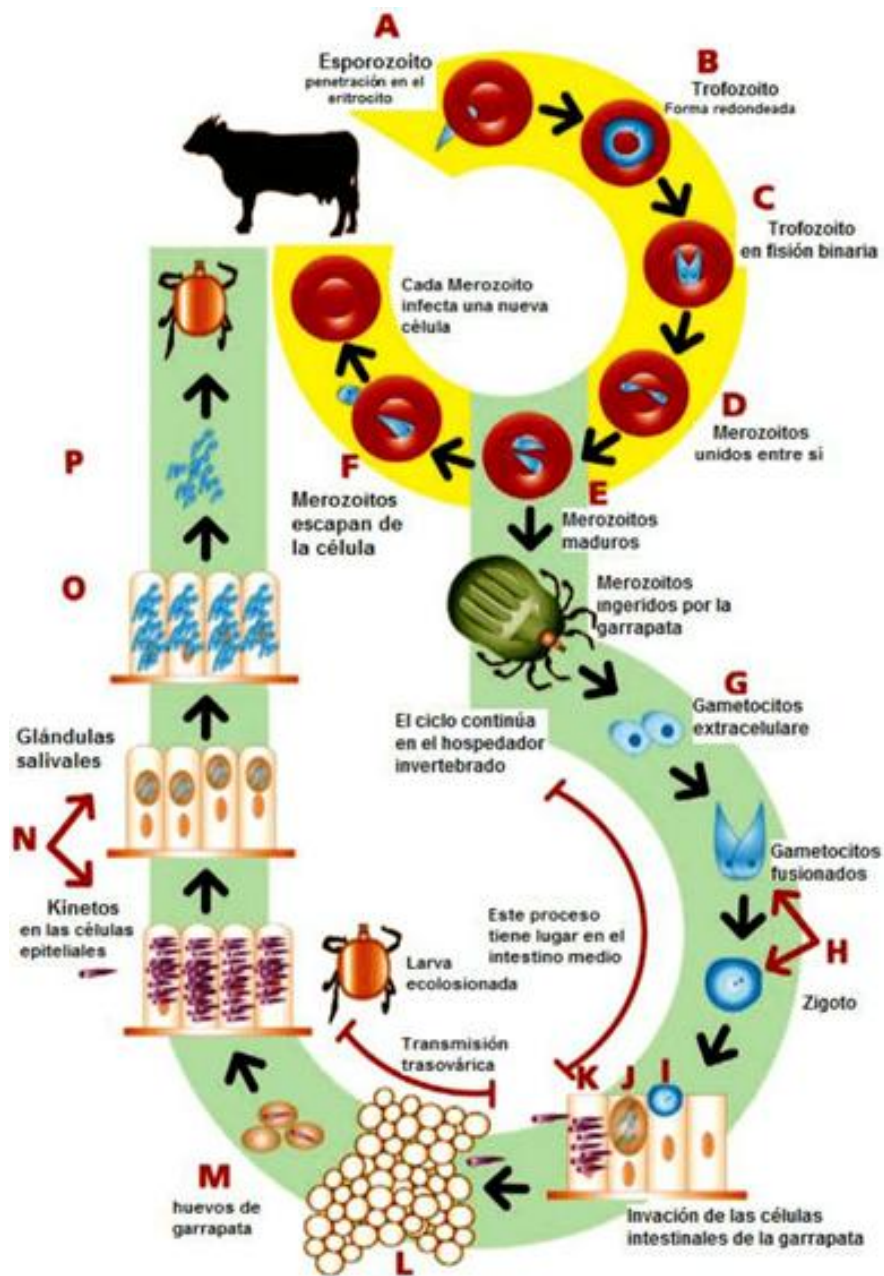


Figura 4. Ciclo biológico de *Babesia* spp esquematizado. El ciclo asexual dentro del hospedero (bovino) está marcado en amarillo y el ciclo sexual dentro de la garrapata en color verde. Imagen tomada de J. Mosqueda et al., 2012.

c) Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la babesiosis bovina se puede realizar de diferentes maneras, una de ellas a través de un examen microscópico de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Mallick *et al.*, 1987), sin embargo, requiere de mucha práctica y conocimiento de la patología; otra forma de detectarlo es utilizando un Ensayo Inmunoenzimático Ligado

a Enzimas (ELISA), la cual nos brinda la ventaja de poder identificar animales portadores asintomáticos (Álvarez and Cantó, 1991); de igual manera se puede realizar una inmunofluorescencia indirecta (IFI) la cual tiene alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, se puede ver afectada por la persona que realice la interpretación, ya que se requiere mucha experiencia además de ser una técnica donde se pueden analizar un número pequeño de muestras, contrario a un ELISA. La técnica más utilizada actualmente para detectar la enfermedad es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual brinda resultados con alta sensibilidad y especificidad (Bal *et al.*, 2016).

d) Medidas de control para combatir la babesiosis bovina

El método más antiguo para proteger a los animales es la inmunización, la cual consiste en inocular al bovino con una pequeña cantidad de sangre infectada por *Babesia spp.* o bien colocar larvas de garrapatas infectadas sobre el animal, posteriormente en un periodo de incubación variado, el bovino puede presentar síntomas y una vez recuperado puede ser introducido a una entidad enzoótica en la cual es prevalente de la *Babesia spp.* a la que fue expuesto; este método es costoso y hay un 5% de riesgo de perder a los animales expuestos, además del riesgo de introducir otros patógenos al bovino. En general la técnica tiene buenos resultados si se tienen buenas condiciones zoonóticas y la higiene adecuada.

La utilización de fármacos babesicidas ha sido el segundo método más empleado, sin embargo, han tenido un impacto contraproducente en los bovinos y en el medio ambiente; el azul tripano fue el primer fármaco utilizado contra la babesiosis bovina dando resultados positivos para infecciones por *B. bigemina*, sin embargo, no tenía ningún efecto sobre *B. bovis*, además de producir una decoloración en la carne del bovino (J. Mosqueda *et al.*, 2012). En Europa se utilizaban el sulfato de quinuronio y la amicarbilida, no obstante, tuvieron problemas de seguridad en su fabricación, por lo que fueron retirados del mercado.

Los fármacos más comunes son el imidocarb y el aceturato de diminazeno, los cuales permanecen cierto tiempo activos en los animales tratados. El imidocarb inhibe la producción de poliaminas y previene que el inositol entre en los eritrocitos infectados

conteniendo al parásito, a un principio parecía prometedor ya que es efectivo hasta un mes después de aplicado (Kuttler, 1988); sin embargo, en la actualidad no se recomienda puesto que tiene alta toxicidad y se han identificado residuos del fármaco en la carne y la leche. El aceturato de diminazeno es un antiparasitario que inhibe la glucólisis aeróbica y la síntesis de DNA, su comercialización continúa, aunque se han reportado resistencia en algunos parásitos (da Silva Oliveira and de Freitas, 2015).

Entre los nuevos fármacos antibabesiológicos se encuentran el triclosán, nerolidol, artesunato, epoxomicina, gosispol y atovacuona (J. Mosqueda *et al.*, 2012).

4. Métodos de control para las garrapatas y sus mecanismos de resistencia

El control de *R. microplus* se realiza principalmente con métodos químicos como lo son los acaricidas de las familias de los organofosforados, piretroides, amidinas, endectocidas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas e inhibidores del crecimiento (Rodriguez-Vivas, Jonsson and Bhushan, 2018) (Tabla 2), los cuales han sido de gran utilidad, pero el uso indiscriminado de los mismos han propiciado resistencia en las garrapatas, así como una mala aplicación del acaricida en el ganado, asegura la supervivencia del ectoparásito (Rodrigues *et al.*, 2015).

La población de garrapatas que no ha estado expuesta a acaricidas tendrá pocos individuos con alelos de resistencia, por lo que la dosis del acaricida sería letal para la mayoría de los individuos; sin embargo, cuando esa población se expone al garrapaticida los individuos con alelos de resistencia tienen ventaja selectiva y sobreviven a la exposición del químico, se reproducen y la siguiente generación hereda dicha resistencia, incrementando el porcentaje de garrapatas que sobreviven después de exponerse a una dosis estándar del acaricida (Roush, 1993).

Tabla 2. Acaricidas empleados como método de control de *R. microplus* en México.

Familia Química	Moléculas químicas	Mecanismo de acción
Organofosforados	Coumafos, Clorpirifos, Diazinon y Carbaryl	Alteran el sistema nervioso central (SNC) afectando la transmisión muscular y produce toxicidad.
Piretroides	Cipermetrina, Deltametrina, Flumetrina	Bloquean la transmisión del impulso nervioso inhibiendo la alimentación.
Amidinas	Amitraz	Actúa sobre el receptor de la octopamina de las garrapatas.
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina, Moxidectina, Doramectina, Milbemicina	Provocan hiperpolarización y muerte por parálisis flácida.
Fenilpirazolonas	Fipronil	Actúa sobre los canales de cloro provocando la muerte por hiperexcitación.
Inhibidores de desarrollo	Fluazuron	Inhibe la síntesis de quitina, por lo que se trunca el desarrollo del parásito.

a) Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia de *R. microplus* son principalmente 4:

- 1) Detoxificación metabólica: causada por la elevada actividad de enzimas como las oxidasas, esterasas, citocromo P450, glutatión S-transferasa y las carboxilesterasas, ya que tienen la capacidad de degradar y/o secuestrar las moléculas tóxicas de los acaricidas como piretroides y organofosforados (Miller *et al.*, 2008).
- 2) Modificación del sitio de acción de las moléculas químicas: causada por la mutación en el sitio blanco, evadiendo el efecto tóxico del ingrediente activo del garrapaticida al no completar la unión del químico con los receptores del parásito (Rosario-Cruz, 2009).
- 3) Disminución de la absorción del acaricida: consiste en el desarrollo de barreras en la cutícula externa de la garrapata que evitan la entrada del químico.
- 4) Mecanismos conductuales de la garrapata: Las garrapatas pueden evadir el contacto con el químico, sobre todo cuando no se aplica la cantidad adecuada de acaricida o bien, no se aplica en las zonas de fijación de las garrapatas al bovino (M. Alonso and Fernández, 2022).

En México, desde la década de 1980 se reportaron casos de resistencia de ciertas poblaciones de garrapatas a los distintos acaricidas empleados (Tabla 3). En Veracruz se tuvieron fallas en la campaña de control (Aguirre *et al.*, 1986) y posteriormente se describieron diferentes focos de resistencia y de multiresistencia, es decir, las garrapatas toleran la aplicación de diferentes familias de acaricidas (Rosario-Cruz, 2009).

Tabla 3. Cronología de la resistencia de *R. microplus* a los acaricidas en México.

Químico empleado	Año de reporte	Lugar	Referencia
Organofosforados	1981	Tuxpan, Veracruz	Aguirre, 1986
Piretroides sintéticos	1993	Zona del Golfo de México	Ortíz, 1995
Amitraz	2002	Tabasco	Soberanes, 2002
Ivermectina	2010	Yucatán	Pérez-Cogollo, 2010
Fipronil	2013	Norte de México	Miller, 2013

b) Método inmunológico de control para *R. microplus*: Vacunas

Las vacunas contra las garrapatas son una alternativa no química para su control, son sustancias fabricadas a partir de microorganismos patógenos o parte de ellos, las cuales al ser administradas al bovino producen inmunidad contra dicho patógeno.

Uno de los antígenos seleccionado para el desarrollo de una vacuna, fue la proteína *Bm86*, la cual es una glicoproteína localizada en la membrana de las células epiteliales del intestino medio de la garrapata *R. microplus*, que pudiera estar involucrada en la endocitosis de la sangre o de algún componente específico ingerido por las garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2016), el gen *Bm86* se expresa en diferentes estadios de la garrapata como lo son huevos, larvas, ninfas y se encuentra tanto en machos y hembras adultos (Nijhof *et al.*, 2010). Las vacunas basadas en el antígeno *Bm86* son seguras, no causan un impacto ambiental desfavorable, y son económicamente accesibles. En México se comercializaban las vacunas Gavac® (Cuba) y TickGard® (Australia), sin

embargo, se detectó que había variabilidad en la eficacia alrededor del país (Coate *et al.*, 2023). Posteriormente se desarrollaron las vacunas Go-Tick® (Colombia) y Bovimune Ixovac® (México) basadas en el mismo antígeno (*Bm86*); mostrando en el caso de la vacuna mexicana una efectividad del 86% en la reducción de la fertilidad de las garrapatas hembra (Guerra, 2016), y un rango de 64%-96% de reducción de la carga parasitaria con respecto a la vacuna colombiana (Betancour, 2019), la cual es empleada en el estado de Guerrero donde se han registrado poblaciones de garrapatas multiresistentes, algunas de ellas mueren sobre el bovino mientras que otras mueren en el suelo durante la oviposición; dando como resultado una reducción en el número de garrapatas hembras repletas (adultas), así como su peso y su capacidad reproductiva, sin embargo aún no hay reportes de la efectividad de la vacuna en otros estados de México (LAPISA, sin fecha).

5. Proteínas involucradas en la relación parásito- vector.

Los métodos de control antes mencionados no son totalmente eficaces y el tratamiento es limitado, por lo que es importante estudiar y analizar las moléculas implicadas en la interacción *Babesia*-garrapata y su participación en la transmisión y adquisición de dicho patógeno, para así evaluar su potencial como blanco terapéutico.

a) Proteínas de la hemolinfa y ovario de la garrapata.

Las garrapatas infectadas con *Babesia spp.* producen un mayor número de hemocitos circulantes para destruir al patógeno mediante fagocitosis (Villar *et al.*, 2015). *B. bigemina* muestra motilidad al llegar a la hemolinfa y se adhiere a los hemocitos de la garrapata (de Rezende *et al.*, 2015), algunas de las proteínas que actúan directamente sobre el patógeno son las lisozimas, proteasas, inhibidores de proteasas y lectinas (Kotsyfakis *et al.*, 2015).

En 2007 se realizó el primer perfil proteómico ovárico de *R. microplus* infectada por *B. bovis*, en el cual se identificaron proteínas como la calreticulina, la glutamina sintetasa, una familia de inhibidores de serina proteasa de tipo Kunitz y la inmunofilina; los genes de estos últimos dos mencionados se regulan positivamente cuando hay

infección en los ovarios de garrapatas por *Babesia spp.* Las proteínas ováricas pueden disminuir la ovogénesis y la embriogénesis, por lo que se reduce la tasa de reproducción y de transmisión de las garrapatas, por esto son blancos para el desarrollo de vacunas (Rachinsky, Guerrero and Scoles, 2007).

b) Proteínas de las glándulas salivales de la garrapata.

Las células de glándulas salivales son infectadas por quinetos de *B. bigemina* (Chauvin *et al.*, 2009), por los que se han realizado estudios de transcriptomas llamados “sialomas”. En la garrapata blanda *Ornithodoros parkeri* se encontró la proteína sérica amiloide A, la cual tiene un ortólogo codificado en el genoma de *Ixodes scapularis* (Francischetti *et al.*, 2008), la expresión del gen de dicha proteína aumentó en respuesta a la infección por *B. bigemina* y *R. annulatus*, y al momento de eliminar el gen dio como resultado una reducción del 66% y del 86% de los niveles de infección, en *R. microplus* y *R. annulatus*, respectivamente (Antunes *et al.*, 2012).

La calreticulina también se identificó en glándulas salivales además de en los ovarios, en donde el gen que codifica para esta proteína se encontraba sobreexpresado en *R. annulatus* infectada con *B. bigemina*. La reducción de la calreticulina no tuvo un efecto significativo en *R. annulatus*, pero sí fue significativo en la infección por patógenos en *R. microplus* al afectar el peso corporal de la garrapata (Antunes *et al.*, 2012). La calreticulina actúa durante la alimentación de sangre y puede alterar el metabolismo del calcio durante la infección por *Babesia* (Ferreira *et al.*, 2002).

c) Proteínas del intestino medio de la garrapata.

La glicoproteína Bm86 fue de las primeras proteínas del intestino medio en identificarse en *R. microplus*, la cual ha sido utilizada como vacuna, como se mencionó anteriormente (Gough and Kemp, 1993).

El receptor de garrapatas de la proteína de superficie externa A (TROSPA) fue identificada en *I. scapularis* como un receptor de *B. burgdorferi* (Pal *et al.*, 2004), posteriormente se identificó un ortólogo en *R. annulatus* durante la infección por *B. bigemina*, al eliminar el gen los niveles de infección disminuyeron en un 70% en *R.*

microplus (Antunes *et al.*, 2012), posteriormente al ganado infectado por *B. bigemina* se le administró una vacuna con TROSPA disminuyendo la transmisión del patógeno a las garrapatas en cerca de un 80% (Merino *et al.*, 2013).

Algunas otras proteínas identificadas en el intestino medio de la garrapata son la subolesina la cual tuvo resultados variables entre especies de garrapatas en los ensayos vacunales (Merino *et al.*, 2013), la longicina tiene un efecto babesicida ya que al silenciar el gen aumenta la parasitemia de *B. gibsoni* en varios tejidos de las garrapatas (Fogaça *et al.*, 2004); la microplusina es una proteína miembro de la familia de péptidos antimicrobianos (AMP) ricos en cisteína y se encontró sobreexpresada en respuesta a la infección por *B. bigemina* (Antunes *et al.*, 2012).

La proteína de Canal Aniónico Dependiente del Voltaje (VDAC) fue identificada a través de un análisis proteómico, en el intestino medio de *R. microplus*. Esta proteína se encontró unida a fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro* (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012), lo que la convierte en una proteína de interés para el desarrollo de una vacuna.

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

1. La proteína VDAC

La proteína VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, la cual permite el intercambio de iones (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , OH^-) y H_2O hacia el espacio intermembranal, permitiendo la comunicación entre la mitocondria y el resto de la célula; también está involucrada en el proceso de apoptosis y en la regulación del metabolismo (Roman *et al.*, 2006). VDAC desempeña un papel importante en el transporte de metabolitos de alto peso molecular, como ATP, ADP, piruvato, succinato y fósforo inorgánico (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003) (Pastorino and Hoek, 2008). Esta proteína fue identificada por primera vez en 1976 a partir de mitocondrias de *Paramecium tetraureliai* (Schein, Colombini and Finkelstein, 1976).

a) Generalidades de la proteína VDAC

VDAC forma un canal y el tamaño del poro se estima entre 2.5 a 3 nm, se puede encontrar en forma monomérica, dimérica y tetramérica. Adicionalmente VDAC tiene 2 estados: abierto y cerrado, en el estado abierto es principalmente permeable a aniones y metabolitos, en donde el poro se encuentra abierto a voltajes de 60 mV o menos (Mazure, 2017), el estado cerrado ocurre a potenciales de membrana más altos y es más permeable a cationes e impermeable a ATP, en este estado el poro se cierra a un voltaje mayor a 100 mV (Rostovtseva and Colombini, 1996).

VDAC está presente en diferentes organismos como mamíferos, plantas, hongos, bacterias y protozoos, en alguna de sus 3 isoformas, (VDAC-1, VDAC-2 y VDAC-3) las 2 primeras son las más comunes en eucariotas superiores, y la tercera isoforma es la más antigua con 300 millones de años (Saccone *et al.*, 2003). En los humanos las 3 isoformas se expresan en gran medida en el corazón, riñón, músculo esquelético y en el cerebro (Naghdi and Hajnóczky, 2016).

VDAC-1 es pro-apoptótica y específica para señales de Ca^{2+} de baja amplitud, VDAC-2 tiene un amino terminal más largo, sin embargo, tiene funciones muy similares de VDAC-1, con la diferencia de que es considerada anti-apoptótica y VDAC-3 a pesar de ser la menos conocida, se ha reportado que tiene una actividad baja en la formación de poros; VDAC-1 y VDAC-3 son codificadas por 9 exones y VDAC-2 por 10 exones, todas las isoformas cuentan con un promotor de caja TATA, característico de los genes constitutivos (Messina *et al.*, 2012).

b) Isoformas de VDAC

Las isoformas tienen un peso de entre 30-35 kDa y se encuentran altamente conservadas a pesar de las diferencias en la secuencias, la estructura de VDAC-1 humana fue obtenida por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear, demostrando un barril de 19 laminas β antiparalelas, excepto por la 1 y la 19 que son paralelas, el barril β tiene un diámetro de $\sim 30 \text{ \AA}$ y está conformada por una alfa hélice en el extremo N-terminal (Figura 5), esta conformación permite separar un medio apolar de uno polar (Bayrhuber *et al.*, 2008), debido a que hay residuos hidrofóbicos que se orientan hacia la membrana y los residuos hidrofílicos positivos miran hacia el lumen del barril β generando la fuerza impulsora de su selectividad aniónica en el estado abierto (Hiller *et al.*, 2008). Adicionalmente, se cree que las 3 isoformas comparten las mismas características estructurales, sin embargo, no se han reportado cristalografías de VDAC-2 ni de VDAC-3 (De Pinto, Guarino, *et al.*, 2010) (Hiller *et al.*, 2010) (Varughese, Buchanan and Pitt, 2021)

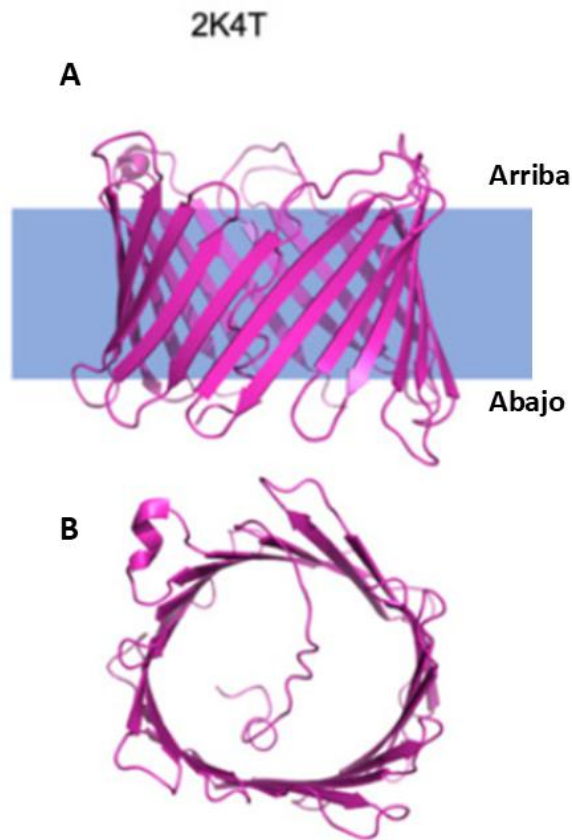


Figura 5. Estructura VDAC-1 en humanos. En el panel A se muestra la vista lateral de VDAC-1 identificando el lado superior e inferior, en el panel B se muestra la vista superior, ambas resueltas por RMN (PDB ID: 2K4T). Imagen tomada y modificada de Varughese, Buchanan and Pitt, 2021.

c) VDAC como candidato vacunal

Como resultado de un ensayo overlay realizado con el objetivo de identificar proteínas del intestino de la garrapata que podrían estar jugando una función en el proceso de la invasión de *B. bigemina*, se identificó a la proteína a la proteína de Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (VDAC) de *R. microplus* (*BmVDAC*) (Figura 6) (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012).

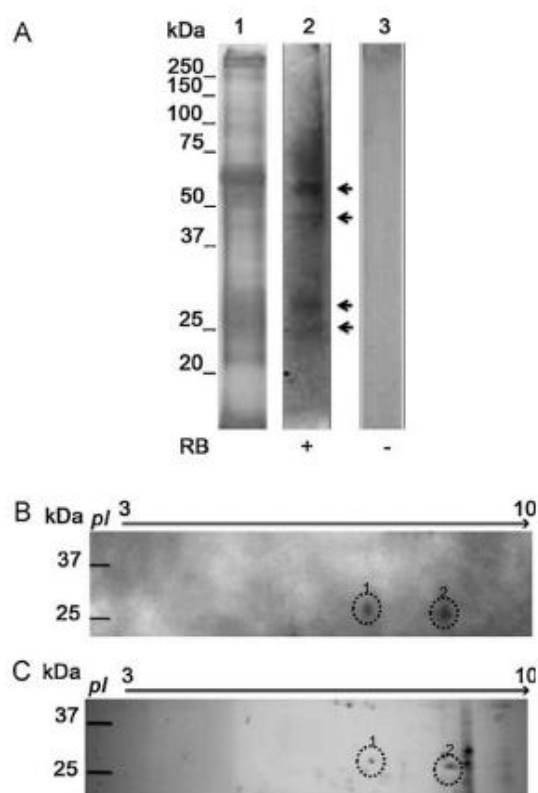


Figura 6. Ensayo de overlay de proteínas de intestino de garrapata con fases sexuales de *Babesia spp.* En el panel A. Carril 1 se muestran las proteínas del intestino de garrapatas, en el carril 2 el overlay de proteínas intestinales interaccionadas con fases sexuales de *Babesia spp.* y en el carril 3 se muestran las mismas proteínas intestinales sin las fases sexuales de *Babesia spp.* En el panel B se muestra el ensayo de overlay en 2 dimensiones, donde se observa la interacción entre las proteínas del intestino de la garrapata y las fases sexuales biotiniladas de *Babesia*. En el panel C se muestra un gel 2-D gemelo del panel B el cual se tiñó con Azul de Coomassie. Los spots 1 y 2 fueron analizados mediante espectrometría de masas. Imagen tomada de Rodríguez-Hernández et al., 2012.

En estudios posteriores (Figura 7) se demostró que la expresión del gen *Bmvdac* (Fig. 7-A) y la abundancia de la proteína aumentaban en el intestino medio de la garrapata durante el periodo de la infección por *babesia* (Fig. 7-B), alcanzando los valores más altos a las 24 horas post-repleción. Adicionalmente, se demostró mediante una inmunolocalización que *BmVDAC* se redistribuía en las células del intestino medio de las garrapatas infectadas en comparación con las no infectadas, lo cual fue más evidente

a las 24 horas post-repleción en las garrapatas infectadas (Fig. 7-C) (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

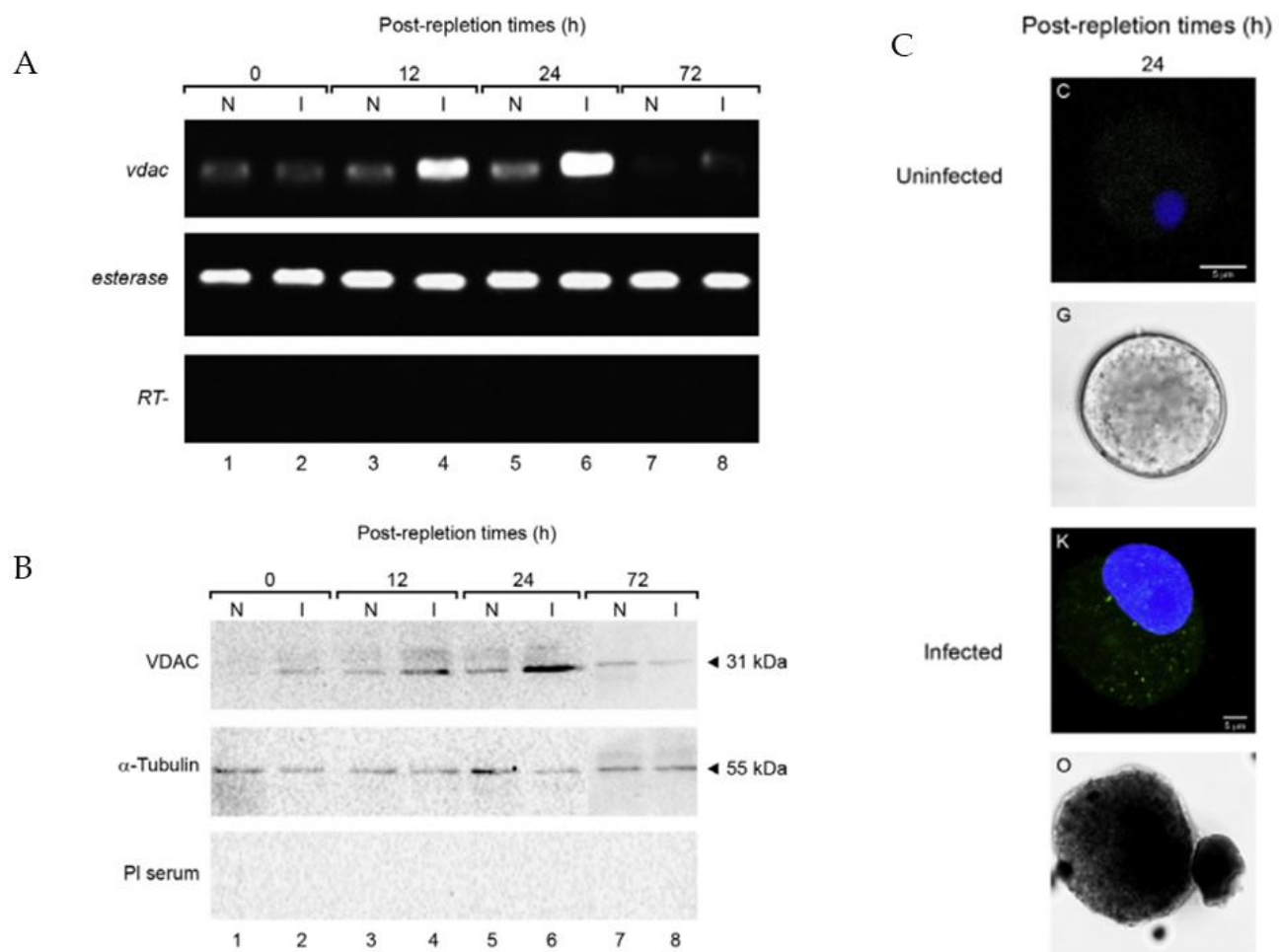


Figura 7. Expresión del gen *vdac* y abundancia de la proteína VDAC en el intestino de la garrapata durante el periodo de infección e inmunolocalización de *BmVDAC*.

A) Ensayo de RT-PCR para demostrar la expresión de *BmVDAC* en intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N) con *B. bigemina* a diferentes tiempos de post-repleción (0, 12, 24 y 72 hrs). B) Expresión de la proteína *BmVDAC* en intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N) con *B. bigemina* a diferentes tiempos post-repleción (0, 12, 24 y 72 hrs), comparando la expresión utilizando el suero inmune, control anti-tubulina y control suero preinmune. C) Inmunolocalización de *BmVDAC* a las 24 horas post-repleción, el núcleo se puede observar en color azul (DAPI) y en

color verde a *Bm*VDAC. Imagen tomada y modificada de Rodríguez-Hernández et al., 2015.

Por otra parte, los ensayos de vacunación con la proteína *rBm*VDAC, mostraron resultados favorables debido a que el ganado inmunizado con la proteína *rBm*VDAC generaba anticuerpos específicos que reconocían a la proteína nativa; y el número y peso de las garrapatas que se alimentaron del ganado inmunizado disminuyeron significativamente en comparación con las garrapatas alimentadas de animales inmunizados solo con el adyuvante y los no inmunizados. La eficacia de la vacuna fue de más del 82% en el ganado no infectado con *B. bigemina* y del 34% en el ganado infectado, por lo tanto, se concluyó que *Bm*VDAC es un candidato vacunal con potencial para reducir la población de garrapatas *R. microplus* y de las enfermedades que transmiten (Ortega-Sánchez et al., 2020).

d) VDAC en la membrana plasmática

Aunque VDAC originalmente se reportó como una proteína mitocondrial, se ha descrito que también puede encontrarse en la membrana plasmática, reportada por primera vez en la superficie de los linfocitos B humanos (Blachly-Dyson et al., 1993) y subsecuentemente reportada en linfocitos cultivados *in vitro*, células epiteliales, astrocitos y en fracciones celulares de cerebro (Puchelle et al., 1993) (Dermietzel et al., 1994)(Moon et al., 1999). Posteriormente, se confirmó la presencia de VDAC en la membrana plasmática de células humanas mediante estudios proteómicos (Ning et al., 2007), ensayos de inmunofluorescencia, pruebas de fraccionamiento subcelular y microscopía electrónica (De Pinto, Messina, et al., 2010a).

Como se mencionó anteriormente, diferentes estudios han demostrado que VDAC también se localiza en la membrana celular, puede funcionar como una enzima redox capaz de reducir ferrocianuro extracelular en presencia de NADH (Baker et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que VDAC se une a la región kringle 5 del plasminógeno en las células endoteliales humanas induciendo una disminución del pH intracelular y la hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Gronow, 2003).

e) VDAC como receptor del plasminógeno

El plasminógeno es un zimógeno el cual es parte del sistema fibrinolítico y se encuentra en el plasma de los vertebrados. Esta proteína se sintetiza en el hígado de manera constitutiva y circula en el plasma a concentraciones de 1-5 $\mu\text{mol/L}$. La plasmina producto de la activación del plasminógeno, tiene la función de degradar el fibrinógeno y participa en la migración celular, la embriogénesis, la formación del tejido y la angiogénesis (Celkan, 2017). La estructura del plasminógeno se caracteriza por tener 7 dominios estructurales: un péptido pre-activador, cinco zonas homólogas llamadas kringle: de la 1 a la 5 y el dominio proteinasa (Duboscq, 2017). El plasminógeno tiene 3 conformaciones distintas: alfa, es una conformación cerrada y predominante cuando el plasminógeno circula; beta, es una conformación semiabierta cuando el plasminógeno se une a la fibrina a través de un residuo de lisina carboxiterminal; y gamma la cual es una conformación totalmente abierta que se presenta cuando el plasminógeno está unido a 2 residuos de lisina carboxiterminales (Rijken and Lijnen, 2009).

El plasminógeno es activado a plasmina por el corte entre los residuos de arginina-valina en la posición 560-561 por el activador del plasminógeno tipo tejido (tPA) y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), los cuales son activadores fisiológicos del plasminógeno; el tPA solamente activa al plasminógeno en presencia de fibrina en su forma insoluble o soluble, enlazándose a los residuos de lisina en la superficie de la fibrina, completando la conversión (Chapin and Hajjar, 2015).

El activador tisular de plasminógeno (tPA) es una proteasa sérica la cual tiene 5 dominios estructurales, un factor de crecimiento similar epidérmico, dedo similar a fibronectina, 2 dominios kringles y un dominio de proteasa sérica (Hoylaerts *et al.*, 1982), esta molécula es sintetizada y secretada por células endoteliales, se encuentra en circulación aproximadamente 5 minutos como vida media, adicionalmente activa al plasminógeno para disolver coágulos de fibrina y para mantener la homeostasis vascular (Zamarron, Lijnen and Collen, 1984).

El activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) es sintetizado en el pulmón y en el riñón, aunque también se ha reportado la síntesis de la proteína en células

endoteliales, queratinocitos e incluso en células tumorales; se encuentra conformado por una sola cadena multidominio de glicoproteínas, las cuales incluyen un factor de crecimiento epidermal y 3 serin proteasas catalíticas (Schaller and Gerber, 2011).

La plasmina es el producto final del sistema fibrinolítico y ejerce una función proteolítica sobre los coágulos de fibrina y en algunos componentes de la matriz extracelular (Chapin and Hajjar, 2015).

2. Sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico también denominado sistema plasminógeno-plasmina es crucial para regular el depósito y la eliminación intravascular de la fibrina por acción de la plasmina, además de mantener la hemostasia y facilitar la cicatrización de heridas, evitando una trombosis (Ismail, Shaker and Bajou, 2021). También se ha reportado su participación en procesos como la remodelación tisular, la angiogénesis, el desarrollo neuronal, la inflamación y la invasión del trofoblasto (Stepanova *et al.*, 2016) (Brodsky *et al.*, 2001) (Friedman and Seeds, 1994).

a) Sistema fibrinolítico en las garrapatas

En las garrapatas y otros hematófagos, el sistema fibrinolítico es esencial debido a que necesitan evadir el sistema hemostático del hospedero para una eficaz alimentación, incluyendo la coagulación y fibrinólisis (Assumpção *et al.*, 2016), la cual es iniciada por activadores del plasminógeno (tPA y/o uPA) que convierten al plasminógeno en plasmina, y esta a su vez degrada a la fibrina, propiciando el desarrollo de componentes anticoagulantes, antiplaquetarios, vasodilatadores, antiinflamatorios e inmunomoduladores, generalmente en cantidades excesivas para combatir la pérdida de sangre (hemostasia), las reacciones inflamatorias en el sitio de alimentación (Andersen *et al.*, 2003) y para evitar la formación de coágulos en el intestino del ectoparásito durante la ingestión de la sangre (Assumpção *et al.*, 2016).

El sistema de activación del plasminógeno también está involucrado en la remodelación de la matriz extracelular, la migración, la quimiotaxis, la adhesión celular, la mitogénesis y la transducción de señales (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005).

Los basófilos se infiltran en el sitio de la picadura de la garrapata, impidiendo una alimentación eficiente (Brown and Askenase, 1985); adicionalmente, la IL-16 también activa el sistema fibrinolítico promoviendo la migración de la matriz extracelular de eosinófilos al sitio de alimentación (Ferland *et al.*, 2004).

b) Regulación del sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico está regulado a dos niveles: PAI-1 (inhibidor del plasminógeno 1) bloquea al tPA mediante su interacción con vitronectina, un cofactor que ayuda a estabilizar las moléculas de PAI-1 (Figura 8) (Dellas and Loskutoff, 2005). Otro modulador de la fibrinólisis es el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI), el cual es una carboxipeptidasa que separa las lisinas del carboxilo terminal de la fibrina, la activación de TAFI da como resultado la inhibición del ataque fibrinolítico. Por último, existen dos inhibidores de la plasmina los cuales modulan la fibrinólisis, llamados α 2-antiplasmina y en menor medida el α 2-macroglobulina (Mosnier, 2006).

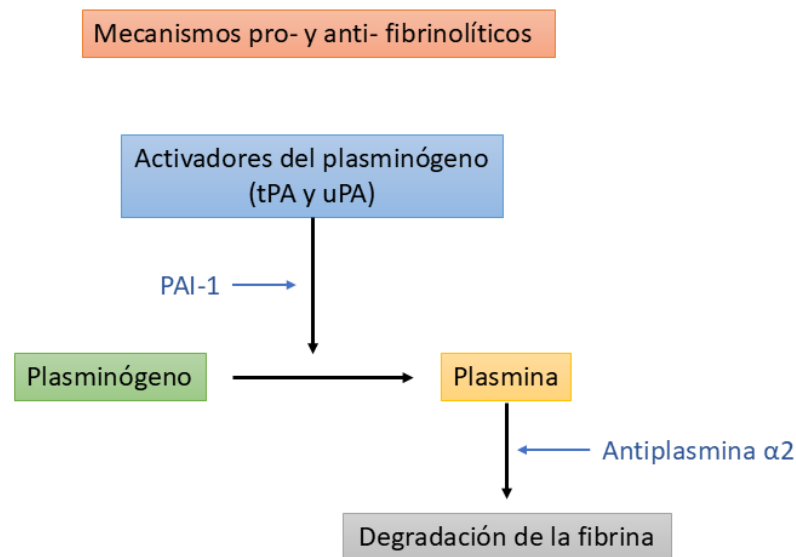


Figura 8. Mecanismo pro y anti-fibrinolítico. El plasminógeno se convierte en plasmina mediante los activadores tPA o uPA, los cuales pueden ser inhibidos por PAI-1, mientras que la plasmina es inhibida por α -antiplasmina y en menor medida por α 2-macroglobulina.

La activación del sistema fibrinolítico a través de la activación del plasminógeno juega un papel fundamental en los procesos de infección por patógenos, los cuales necesitan eliminar varias barreras de la matriz extracelular y la fibrina para invadir y establecerse en las células del hospedero, evadiendo el sistema inmune innato (Whyte, 2023). El reclutamiento del plasminógeno por las proteínas receptoras del parásito ayuda a inmovilizarlo, facilitando su conversión a plasmina por sus activadores, lo que resulta en un aumento significativo de la actividad de la plasmina. La mayoría de los receptores de plasminógeno en bacterias y parásitos muestran patrones similares de unión a través de residuos de lisina (Figuera *et al.*, 2013), un ejemplo de una proteína receptora es la enolasa, la cual está localizada en la superficie celular e interacciona con el plasminógeno, promoviendo la diseminación de microorganismos en la célula hospedera desencadenando la fibrinólisis (Avilán *et al.*, 2011).

3. Plasminógeno y *Bm*VDAC

En estudios preliminares se encontró que el plasminógeno bovino interaccionaba con *Bm*VDAC, y para demostrarlo se utilizó un ensayo de binding blot (Figura 9) en el cual a partir de plasminógeno fijado a una membrana de nitrocelulosa (Figura 9-A) se incubó a diferentes concentraciones de *Bm*VDAC, utilizando como control positivo a la proteína enolasa y como control negativo BSA, demostrando que existía la unión *Bm*VDAC-plasminógeno humano (Figura 9-B) (Hernández-Aparicio, 2020).

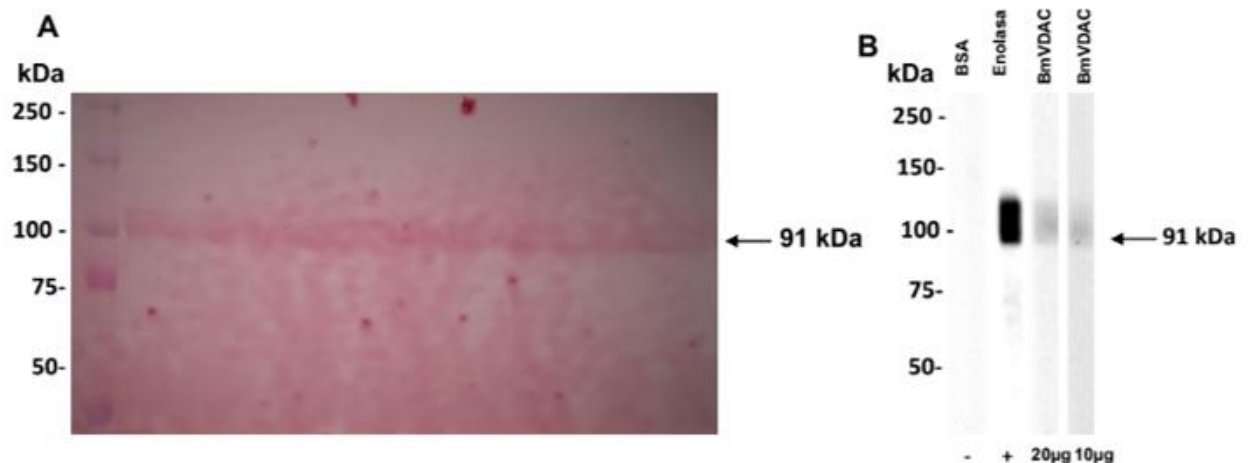


Figura 9. Interacción *Bm*VDAC-HPIg. A) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo ponceau. B) carril 1: interacción del plasminógeno-BSA, carril 2: interacción del plasminógeno-enolasa, carril 3: Interacción del plasminógeno con 20 µg de *Bm*VDAC y carril 4: Interacción plasminógeno con 10 µg de *Bm*VDAC. Imagen tomada de la tesis Hernández-Aparicio, 2020.

a) Dominios kringle del plasminógeno

El plasminógeno humano y bovino contienen 5 dominios kringle (1-5). En el plasminógeno humano los dominios kringle 1 y kringle 4 muestran sitios de alta y baja afinidad por residuos lisina carboxiterminales, respectivamente (Christen *et al.*, 2010) y el dominio kringle 5 tiene un peso aproximado de 8 kDa el cual se encuentra estabilizado por 3 enlaces disulfuro y 2 láminas β antiparalelas. Estos 3 dominios son los más importantes en las interacciones con ligandos (inhibidores, receptores, activadores) y en la regulación del plasminógeno (Castellino and McCance, 2007). También se ha reportado que el dominio kringle 5 interactúa con la cadena ligera del plasminógeno en su estado no activado, contribuyendo así a la estabilidad conformacional de la molécula completa.

En el plasminógeno bovino los dominios kringle se encuentran en las siguientes posiciones:

- Kringle 1: Posición 101-188 aa
- Kringle 2: Posición 192-269 aa
- Kringle 3: Posición 282-359 aa
- Kringle 4: Posición 384-461 aa
- Kringle 5: Posición 485-564 aa

Dados los antecedentes presentados, en este estudio se evaluó si la unión entre el plasminógeno y *Bm*VDAC es específica, además de estudiar si los residuos de lisina de *Bm*VDAC participan en la interacción con el plasminógeno y si dicha unión es específica con el dominio kringle 5 del plasminógeno.

III. HIPÓTESIS

La proteína *BmVDAC* se une y aumenta la activación del plasminógeno y se une específicamente al dominio kringle 5 del plasminógeno.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas son uno de los vectores de patógenos más importantes en el mundo, siendo superadas únicamente por los mosquitos y tienen un gran impacto en el ámbito clínico y veterinario, provocando problemas de salud graves a humanos y animales.

En el ganado bovino, las garrapatas transmiten enfermedades como la babesiosis bovina y la anaplasmosis. Las infecciones causadas por estos ectoparásitos causan pérdidas económicas sustanciales en el ámbito ganadero debido a la pérdida de producción de leche, la piel lacerada por las picaduras que no se puede vender, la carne contaminada que no se puede consumir, además de que las hembras infectadas pueden abortar. El costo de los garrapaticidas, las vacunas y el tratamiento veterinario del ganado infectado es elevado, lo que llega a causar pérdidas de hasta 500 millones de dólares al año, además del impacto ambiental que representa el uso indiscriminado de los garrapaticidas.

Debido a que las garrapatas han desarrollado multiresistencia a los acaricidas empleados como medida de control, se desarrolló una vacuna basada en la proteína *Bm86*, la cual tiene la principal desventaja de presentar variabilidad en la eficacia en el país, por lo que se propuso como candidato vacunal a otra proteína llamada *VDAC*.

BmVDAC fue identificada previamente en el intestino medio de *R. microplus* durante la infección con *babesia* y se ha demostrado su potencial como vacuna, por lo tanto, es importante continuar con el estudio de *BmVDAC*.

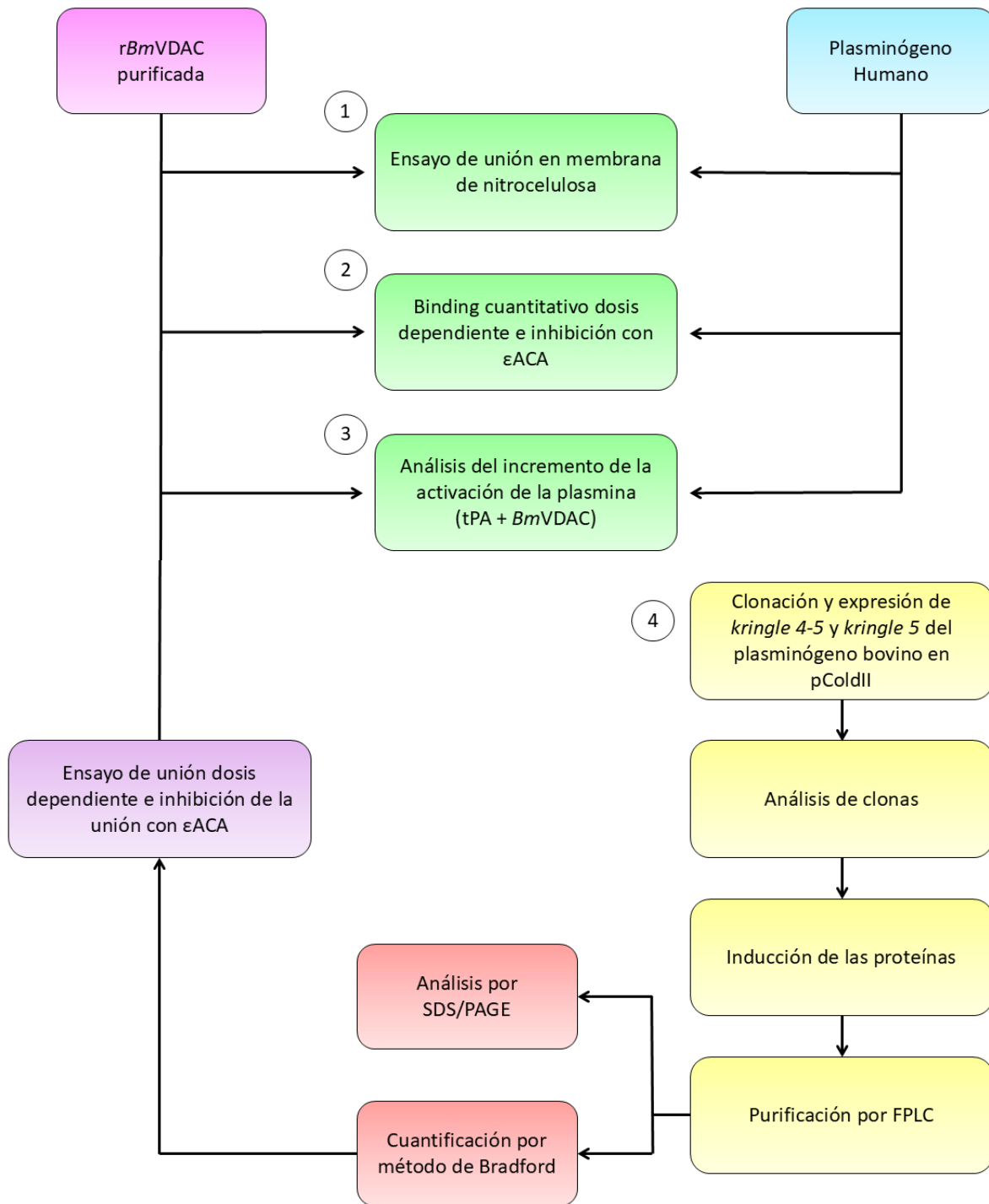
V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la unión de *Bm*VDAC al plasminógeno.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar la unión de *Bm*VDAC al plasminógeno en membranas de nitrocelulosa.
2. Determinar si la unión de *Bm*VDAC al plasminógeno es específica y dependiente de residuos de lisina.
3. Estudiar la actividad del plasminógeno en presencia de r*Bm*VDAC.
4. Demostrar que la proteína *Bm*VDAC se une específicamente al dominio kringle 5 del plasminógeno bovino.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Cepas de *Escherichia coli* para mantenimiento del gen:

- DH5α fue obtenida de forma casera y es utilizada para la clonación debido a que tiene una mutación *rec A1*, la cual ayuda a la estabilidad del inserto, también brinda alto rendimiento y calidad del DNA debido a que tiene una mutación en el extremo A, además de tener una alta eficiencia de transformación.
- Las células competentes caseras TOP10 fueron utilizadas para obtener una alta eficiencia de transformación, se utilizan para clonación de DNA superenrollado (metilado) y permiten la replicación estable de plásmidos con un alto número de copias.

Cepas de *E. coli* para la propagación:

- BL21 (DE3) casera, fue utilizada para expresión de proteínas recombinantes, derivada de la cepa B de *E.coli*, tiene ausencia de actividad proteolítica lo cual ayuda a prevenir la degradación de la proteína de interés y contiene un gen de la ARN polimerasa T7 controlado por el promotor lac UV5, lo que permite la expresión de proteínas bajo el promotor T7.
- Rosetta 2 es una cepa derivada de *E. coli* BL21 diseñada para favorecer la expresión de proteínas eucariotas que contengan codones raramente usados en *E.coli*. También fueron obtenidas de forma casera.

2. Obtención de la proteína recombinante *BmVDAC* (r*BmVDAC*)

Se utilizó la construcción p*ColdII/BmVDAC* desarrollada por Rodríguez-Hernández a través de un vial de DNA [180 ng/μl] y se realizó una transformación tomando 1 μl de DNA y 50 μl de células competentes *E.coli* BL-21 (DE3), se mezcló en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se incubó durante 20 minutos en hielo y se le dio un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos e inmediatamente se colocó en hielo durante 15

minutos. Posteriormente se adicionaron 250 µl de medio Luria Bertani (LB) sin ampicilina y se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación de 180 rpm. La siembra de las células transformadas se realizó en 2 cajas de LB-Agar con Ampicilina [100 µg/µl], una caja con 50 µl de la transformación y otra con 100 µl de esta; las cajas se dejaron crecer a 37 °C en una incubadora durante 16 horas.

A partir de las colonias que crecieron en las cajas, se seleccionó una que estuviera aislada y se conservó en una caja de LB-agar con ampicilina, simultáneamente la misma colonia se dejó crecer en un preinóculo de 20 ml de LB-Ampicilina a 37 °C durante 16 horas con agitación de 200 rpm. En un matraz de 500 ml de LB-Ampicilina se adicionaron los 20 ml del preinóculo y se incubó a 37 °C con agitación de 200 rpm, monitoreando la densidad óptica (OD) cada hora hasta alcanzar un valor entre 0.4-0.6, llegando a este valor se tomaron 5 ml como control no inducido, y al resto del volumen del matraz se le adicionó IPTG [1 mM], el cultivo se dejó creciendo a 16 °C con agitación de 200 rpm durante 16 horas.

Pasado este tiempo se tomó 1 ml de cada cultivo inducido y no inducido para medir los valores de OD, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C, se dejó secar la pastilla y se resuspendió con PBS para igualar las concentraciones a partir de los valores de la OD, posteriormente se sonicó durante 3 min con 80% de amplitud 30/30, se añadió buffer de carga de proteínas 2x y se hirvió durante 5 minutos.

Se prepararon 100 µl de cada muestra para analizar en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad (No. de catálogo 161-0374) y se corrió a 100 volts. El gel se tiñó con Azul de Coomassie de Bio-Rad (No. de catálogo 161-0786) durante toda la noche en agitación suave a temperatura ambiente y se lavó con solución desteñidora por 30 min en agitación suave.

El resto del medio inducido se empastilló en tubos Falcon de 50 ml a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C, en cada tubo se empastillaron 100 ml de medio, se dejó secar la pastilla y se guardó a -20 °C hasta su uso.

La purificación de rBmVDAC se realizó mediante una cromatografía de afinidad con el protocolo “On Column Refolding” en condiciones desnaturalizantes usando una columna His-Trap mediante el equipo ÄKTA prime Plus FPLC System (GE Healthcare, SE).

A partir de la pastilla mencionada anteriormente, se resuspendió en 10 ml de PBS y se sonicó de 1 ml en 1 ml durante 3 min con 80% de amplitud 30/30, se recolectaron los 10 ml sonicados y se volvieron a centrifugar a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de buffer de unión (A1), se filtró con una pirinola de 0.45 µm y la muestra se inyectó al equipo, se corrió el programa y se recolectaron 30 fracciones.

En un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) se corrieron 10 µl de la fracción 6 en adelante a 100 volts y se tiñó con Azul de Coomassie. Posteriormente se destiñó durante 30 min; las fracciones que contenían la proteína recombinante fueron dializadas usando 6 litros de PBS durante 2 días, se recolectó la muestra en tubos de 1.5 ml y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Después de la diálisis, la proteína se cuantificó por método de Bradford, usando una curva estándar de BSA con 5 diluciones seriadas partiendo de una concentración de [80 µg/ml], las siguientes diluciones [40 µg/ml], [20 µg/ml], [10 µg/ml] y [5 µg/ml], como blanco se utilizó PBS y para la muestra se utilizó de forma directa sin diluir. En una placa de 96 pozos se cargaron las muestras por triplicado, en cada pozo se añadieron 80 µl de muestra más 20 µl de Dye Reagent concentrado de Bio-Rad (no. de catálogo 5000006EDU), se mezcló y se leyó en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) a una absorbancia de 595 nm.

3. Análisis *in silico* del plasminógeno humano y bovino.

Para comprobar el porcentaje de identidad entre el plasminógeno bovino y humano, se realizó un alineamiento múltiple. La búsqueda de la secuencia de aminoácidos del plasminógeno humano y del plasminógeno bovino se llevó a cabo en la base de datos internacional situada en la página del National Center for Biotechnology Information

(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), y con la secuencia de aminoácidos se realizó un alineamiento múltiple en BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) para determinar el porcentaje de identidad entre ambas proteínas.

4. Clonación de fragmentos *kringle 4-5* y *kringle 5* del plasminógeno bovino

a) Diseño de la secuencia a sintetizar *k4-5* y *k5*

La búsqueda del gen del plasminógeno bovino se llevó a cabo en GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), y a través de Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org>) se realizó la búsqueda de exones e intrones. Una vez que se obtuvo la secuencia codificante, se analizó mediante la herramienta ExPASy-Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>) para encontrar el marco de lectura abierto (ORF) y se comparó con la secuencia reportada en UniProt (<https://www.uniprot.org/>), finalmente se localizaron las secuencias correspondientes a *k4-5* y *k5*.

Se diseñaron genes sintéticos de los dominios *k4-5* y *k5* flanqueados con sitios de restricción *Bam*HI (GGATCC) y *Xba*I (TCTAGA) en el plásmido *pColdII* y se solicitaron a Gene Universal para su fabricación.

b) Preparación del vector *pColdII* vacío

Se realizó una transformación tomando 1 µl del vial *pColdII* y 50 µl de células competentes *E.coli* DH5α y se realizó de la misma forma mencionada anteriormente. La siembra de las células transformadas se realizó en 2 cajas con LB-Agar con Ampicilina [100 µg/µl], una caja con 50 µl de la transformación y otra con 100 µl de esta; las cajas se dejaron crecer a 37 °C en una incubadora durante 16 horas.

Se tomó una colonia aislada para inocularse en 5 ml de LB-Ampicilina durante 16 horas a 37 °C y 200 rpm, el cultivo se empastilló por centrifugación a 10,000xg durante 5 min, posteriormente se purificó el DNA con el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, No de catálogo A1330), la pastilla se resuspendió en 250

μl de solución de resuspensión de células, se adicionaron 250 μl de la solución de lisis y en cuanto se observó el clarificado se adicionaron 10 μl de proteasa alcalina y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, después se adicionaron 350 μl de la solución de neutralización y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a temperatura ambiente y en un solo movimiento se decantó el lisado transparente en una columna sin dejar pasar líquido blanco y se centrifugó durante 1 min a las mismas condiciones. La columna se lavó con 750 μl de la solución de lavado y se centrifugó durante 1 min más, se agregaron 250 μl más de la solución de lavado y se centrifugó por 2 min. Para eluir el DNA se añadieron 100 μl de agua libre de nucleasas y se centrifugó por 1 min. La columna se desechó y el DNA obtenido se cuantificó en un Nanodrop a través de la medición de la absorbancia de 260 nm y 280 nm y se determinó la integridad y pureza de este. Adicionalmente el DNA se visualizó en un gel de agarosa al 1% con un marcador de 1Kb (Promega, no de catálogo G5711) y se almacenaron a -20 °C.

Posteriormente se realizó una restricción con 10 μl del plásmido y 5 μl de *Xba*I durante 2 horas a 37 °C en un baño térmico, subsiguientemente a esa misma reacción se le añaden 4 μl de *Bam*HI y se dejó a 37 °C durante 2 horas. Se realizó la desfosforilación del plásmido con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) (Promega, no de catálogo M2825) durante 1 hora a 37 °C en baño térmico, se inactivó por 10 min a 70 °C.

Se corrió un gel de agarosa al 1% a 80 V para observar la banda producto de la desfosforilación a través de la luz UV en un transluminador y se cortó la banda con ayuda de un bisturí estéril, se realizó una extracción del gel de agarosa con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, no de catálogo A9281) de la siguiente manera, se colocó la banda de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 10 μl de la solución de unión de membrana por cada 10 mg de agarosa y se incubó a 65 °C hasta disolverse, en un tubo colector se colocó una columna y se transfirió la mezcla del gel disuelto y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 16,000 xg por un min, se descartó el líquido y se añadieron 700

μl de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000 xg durante 5 min. Se descartó el líquido nuevamente y se añadieron 500 μl más de la solución de lavado y se centrifugó la columna durante 5 min, se descartó el líquido y se centrifugó la columna sola durante 1 min con la tapa de la centrifuga abierta, por último, se pasó la columna a un tubo nuevo y se añadieron 50 μl de agua libre de nucleasas, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000 xg por 1 min, se guardó a -20 °C hasta su uso.

Adicionalmente se corrió otro gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del plásmido linearizado y desfosforilado.

c) Clonación de fragmentos que codifican para *k4-5* y *k5* en *pColdII*

Se realizó una transformación a partir de los viales recibidos por Gene Universal, se utilizaron 50 μl de células competentes *E.coli* Rosetta 2 y 1 μl de las construcciones respectivamente [210 ng/μl]. Se tomaron las colonias aisladas y se dejaron crecer en 5 ml de LB-Ampicilina durante 16 horas a 37 °C y 200 rpm, posteriormente se purificaron con el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, no de catálogo A1330). El DNA obtenido se cuantificó en un Nanodrop y se visualizó en un gel de agarosa al 1% con un marcador de 1Kb.

Posteriormente se realizó una restricción doble para ambos plásmidos, se tomaron 8 μl del miniprep correspondiente y se adicionaron 1 μl de *Xba*I y 1 μl de *Bam*HI, se dejaron incubar en un baño térmico durante 3 horas a 37 °C, se corrió un gel de agarosa al 1% a 80V y las bandas visualizadas en el gel con ayuda de un transluminador UV se cortaron con un bisturí estéril y se realizó una extracción del gel de agarosa con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, no de catálogo A9281), por último se corrió otro gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de las extracciones y se cuantificaron con ayuda del Nanodrop.

Se preparó una reacción de ligación para cada construcción en una relación 1:3 de vector: inserto para *k4-5* (60 ng: 23 ng) y para *k5* (60 ng: 10.45 ng) con 1 μl de enzima T4 ligasa, 2 μl de buffer de ligasa (5X) en un volumen final de 20 μl, como controles se

prepararon reacciones sin el inserto y otra sin inserto ni T4 ligasa, todas las reacciones se incubaron toda la noche a 16 °C. Posteriormente se realizó una transformación con 50 µl de células competentes *E.coli* TOP10 y 10 µl de cada reacción y controles de ligación. La siembra de las células transformadas se realizó en 2 cajas con LB-Agar con Ampicilina [100µg/µl], una caja con 50 µl y otra con 100 µl de cada reacción; las cajas se dejaron crecer a 37 °C en una incubadora durante 16 horas.

Se seleccionaron 10 clonas aisladas de la construcción pColdII-k4-5 y 10 clonas de pColdII-k5, se inocularon en una caja de LB-agar ampicilina para su conservación, simultáneamente las mismas colonias se dejaron crecer en un preinóculo en 5 ml de LB-Ampicilina a 37 °C durante 16 horas con agitación de 200 rpm. El DNA se purificó a través de la técnica de miniprep antes mencionada. Posteriormente se realizó una restricción doble con *Bam*HI y *Xba*I durante 2 horas a 37 °C y se observaron en geles de agarosa al 1%.

d) Inducción de las proteínas k4-5 y k5

Para expresar la proteína se eligió la cepa *E.coli* BL21, la transformación se realizó con 50 µl de células competentes y 1 µl de DNAP de una clona positiva de k4-5 en concentración [116.6 ng/µl] y una clona positiva de k5 en concentración [253.6 ng/µl], las condiciones de transformación fueron las mismas mencionadas para rBmVDAC. La siembra de las células transformadas se realizó en 2 cajas con Agar LB con Ampicilina [100 µg/µl], una caja con 50 µl y otra con 100 µl de cada reacción; las cajas se dejaron crecer a 37 °C en una incubadora durante 16 horas.

A partir de las clonas que crecieron de la transformación antes mencionada, se seleccionaron clonas aisladas y se conservaron en una caja de Agar LB con ampicilina, simultáneamente las mismas colonias se dejaron crecer en preinóculos de 20 ml de LB-Ampicilina a 37 °C durante 16 horas con agitación de 200 rpm.

Se realizó el mismo procedimiento de inducción que con rBmVDAC, posteriormente se prepararon 100 µl de cada muestra para analizar en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando un marcador de peso molecular

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad (No. de catálogo 161-0374). Para determinar si las proteínas son solubles o insolubles se empastilló 1 ml de cultivo inducido y se resuspendió en 1 ml de PBS y se sonicó a 80% Amp 30/30 durante 3 min. Posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 15 min a 4 °C, para la fracción soluble se recuperó el sobrenadante y a 100 µl de la muestra se le agregaron 100 µl de Buffer de carga 2X y se hirvió durante 5 min; para la fase insoluble se resuspendió el pellet en 100 µl de PBS y se añadieron 100 µl de Buffer de carga 2X, se hirvió durante 5 min y se sonicó nuevamente a 80% de Amp 30/30 por 1 min, ambas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE). El resto del medio inducido se empastilló en tubos Falcon de 50 ml a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C, en cada tubo se empastillaron 100 ml de medio, se dejó secar la pastilla y se guardó a -20 °C hasta su uso.

e) Purificación de los dominios k4-5 y k5

La proteína se localizó en la fracción insoluble por lo tanto se purificó por cromatografía líquida con el protocolo “On Column Refolding” en condiciones desnaturizantes utilizando una columna His-Trap mediante el equipo ÄKTA prime Plus FPLC System (GE Healthcare, SE). Se utilizó el mismo protocolo que con *rBmVDAC*.

En un gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) se corrieron 10 µl las fracciones recolectadas a 100 voltios y se tiñó con Azul de Coomassie. Posteriormente se destiñó durante 30 min. Para hacer el recambio de buffer, se utilizó un filtro de ultracentrífuga Amicón® (Millipore, no. de catálogo UFC9100), primero se limpió con 15 ml de PBS y se centrifugó 15 min a 5000xg, después se agregaron las fracciones de la purificación que contenían la proteína y se centrifugó 15 min a 5000 xg, se bajó el volumen hasta 500 µl y se agregaron 5 ml de PBS con inhibidor de proteasa 1X (Roche, no de catálogo 11836170001) y se centrifugó durante 15 min a 5000 xg, se recuperó el volumen del cassette y se guardó a -20 °C.

Se cuantificaron ambas proteínas por el método de Bradford, de igual manera que la cuantificación de *rBmVDAC*.

5. Ensayo de unión de plasminógeno humano/*rBmVDAC* en membrana de nitrocelulosa.

a) Transferencia

En un gel preparativo de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) se corrieron 20 µg de plasminógeno humano (HPIg) (Sigma Aldrich no. de catálogo P7999), Albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo y *rBmVDAC*. El gel se transfirió durante 1 hora a una membrana de nitrocelulosa en condiciones húmedas, la membrana se bloqueó con durante toda la noche a 4 °C en agitación suave con PBS-Tween + leche al 5%. Posteriormente se realizaron lavados con PBS-Tween (0.05%).

b) Ensayo de unión a ligandos

Las tiras de membrana que contenían 1.8 µg de HPIg y BSA, se incubaron con 14 µg de *rBmVDAC* purificada, durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) de 15 min cada uno y se incubaron con anticuerpo anti-*rBmVDAC* (1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) de 15 min y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-bovino conjugado con peroxidasa (1:1750) durante 1 hora a temperatura ambiente y nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) de 15 min. Para confirmar la especificidad del anticuerpo, adicionalmente se incubó una tira de HPIg sin *rBmVDAC* con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HPIg (1:5000) y con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:3500) y otra tira que contenía solamente *rBmVDAC* se incubó con anti *rBmVDAC* (1:500) y anticuerpo secundario anti-bovino conjugado con peroxidasa (1:1750).

La detección de todas las tiras se realizó mediante quimioluminiscencia con el Kit ECL Western Blotting Substrate (Promega No. de catálogo W1001) con una solución de trabajo 1:1 entre la solución de peróxido y luminol del kit, se retiró el exceso de líquido y se leyó en el sistema Chemi-Doc en High Resolution.

6. Ensayo de Binding en placa dosis dependiente e inhibición con ϵ ACA.

a) Ensayo de Binding con HPIg y *rBmVDAC*

En una placa de 96 pozos se fijaron 4 μ g de HPIg por pozo con buffer de carbonatos pH 9.6 y se dejó incubando la placa toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se bloqueó con BSA 2% durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se colocaron diferentes concentraciones de *rBmVDAC* (16, 8, 4 y 2 μ g/ml), en ausencia o presencia de ϵ ACA [10 mM] y [40 mM], como control negativo se utilizó BSA a las mismas concentraciones que *rBmVDAC* sin ϵ ACA y PBS como blanco, todas por triplicado y se dejó incubando la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se incubó con anticuerpo primario anti-*rBmVDAC* (1:300) durante 1 hora a 37 °C, se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-bovino (1:1000) durante 1 hora a 37 °C, se realizaron los últimos 3 lavados con PBS-T (0.05%) y finalmente se añadió el sustrato σ -Fenilendiamina dihidroclorada (Sigma Aldrich, no. de catálogo P1526). Las absorbancias de las muestras fueron leídas a 492 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano of BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). Los resultados se analizaron a través de Kruskal-Wallis utilizando GraphPad Prism V6.0.

b) Ensayo de unión de ligando de los dominios k4-5, k5 de plasminógeno bovino y *rBmVDAC*

En una placa de 96 pozos se fijaron 4 μ g de k4-5 y k5 por pozo, respectivamente, con buffer de carbonatos pH 9.6 y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se bloqueó con BSA 2% durante 1 hora a 37 °C, se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se colocaron diferentes concentraciones de *rBmVDAC* (8, 4, 2 y 1 μ g/ml) en ausencia o presencia de ϵ ACA 40 mM, como control se utilizó BSA a las mismas concentraciones que *rBmVDAC* sin ϵ ACA y PBS como blanco, todas por triplicado y se dejó incubando la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se incubó con

anticuerpo primario anti-*rBmVDAC* (1:150) durante 1 hora a 37 °C, se realizaron 3 lavados con PBS-T (0.05%) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-bovino (1:1000) durante 1 hora a 37 °C y se realizaron los últimos 3 lavados con PBS-T (0.05%). Finalmente se añadió el sustrato σ -Fenilendiamina dihidroclorada (Sigma Aldrich, No. de catálogo P1526) y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano of BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). Los resultados se analizaron a través de Kluska-Wallis utilizando GraphPad Prism V6.0.

c) Curva de inhibición de la unión de *rBmVDAC* con los dominios k4-5 y k5 de BoPlg con el análogo de la lys ϵ ACA

En una placa de 96 pozos se fijaron 4 μ g de los péptidos de los dominios k4-5 y de k5, respectivamente en buffer de carbonatos pH 9.6 y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (0.05%) y se bloqueó con BSA al 2% durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (0.05%) y se puso a interaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente con *rBmVDAC* a una concentración de 8 μ g/ml en ausencia y presencia de ϵ ACA a diferentes concentraciones (10, 20 y 40 mM), como controles se utilizaron BSA a las mismas concentraciones sin ϵ ACA y PBS como blanco, todas por triplicado. Se siguió el protocolo como en el experimento anterior con los mismos análisis estadísticos.

7. Determinación de la activación de la plasmina en presencia de *rBmVDAC*

En microtubos de 1.5 ml se mezclaron [20 μ g/ml] de *rBmVDAC* y [20 μ g/ml] de plasminógeno humano durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, en una placa de 96 pozos se añadieron 100 μ l/pozo de la mezcla por triplicado y se adicionaron 50 μ l de activador tisular del plasminógeno humano (tPA) (Sigma Aldrich, No de catálogo T0831) a una concentración de [500 ng/ml] por pozo y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Por último, se añadieron 50 μ l de Chromozyme PL (Roche, no de catálogo 10378461001) a una concentración de [0.3 mM] y se incubó a 37 °C en condiciones de oscuridad. Las absorbancias se midieron a 405 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano of BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) cada 2 minutos los

primeros 10 minutos, posteriormente cada 5 minutos hasta llegar al minuto 40, después cada 10 minutos hasta los 60 minutos y finalmente cada 15 minutos hasta los 120 minutos.

Como controles se utilizaron mezclas de *rBmVDAC*- HPIg- sin tPA- sustrato, *rBmVDAC*- sin HPIg- tPA- sustrato y PBS- HPIg- tPA- sustrato. Los resultados se analizaron a través de Kruskal-Wallis utilizando GraphPad Prism V6.0.

IX. RESULTADOS

Para completar todos los objetivos primero se obtuvo la proteína recombinante *rBmVDAC*, ya que se utilizó en cada uno de los ensayos. A partir de la construcción *pColdII/BmVDAC* se realizó una transformación y se procedió a la inducción de la proteína, para verificar la integridad de esta se analizó en un gel SDS-PAGE al 10% en donde se observó una banda enriquecida en el carril que corresponde a la condición inducida (I) a la altura de 27 kDa, la cual indica una sobreexpresión de *rBmVDAC* con respecto al carril no inducido (NI) (Figura 10).

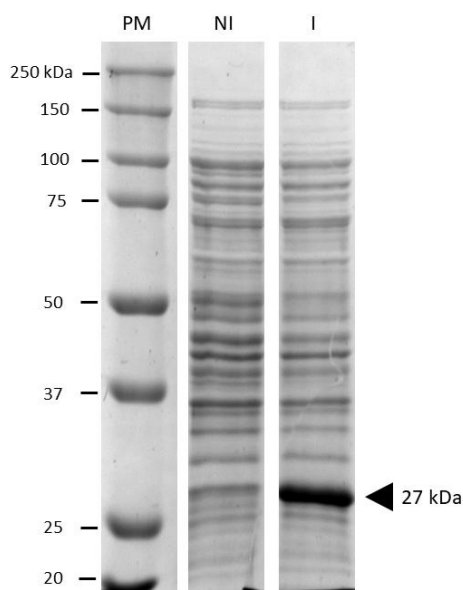


Figura 10. Inducción de la proteína *rBmVDAC*. A partir de una cepa de *E.coli* BL21 se observó una sobreexpresión de *rBmVDAC*, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular Dual Color (PM), en el segundo carril se muestra a *rBmVDAC* no inducido (NI) y el último carril corresponde a *rBmVDAC* inducida (I) con 1mM de IPTG. La flecha de la derecha señala a *rBmVDAC* con un peso de 27 kDa.

Posteriormente se realizó la purificación de la proteína inducida por cromatografía de afinidad, en el cromatograma se observó un pico entre las fracciones 6 y 7, lo cual indica la presencia de la proteína *rBmVDAC* a partir de esa fracción (Figura 11).

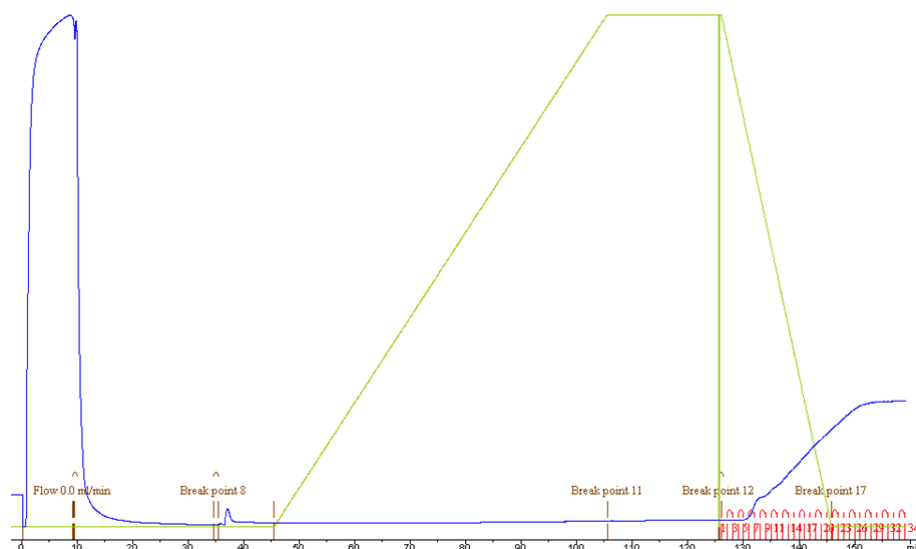


Figura 11. Cromatograma de *rBmVDAC* purificada mediante cromatografía de afinidad con el protocolo “On Column Refolding”. En color azul se muestra la medición de luz UV a 290 nm, la construcción del gradiente se muestra en verde y en rojo se muestran las fracciones eluidas de la proteína *rBmVDAC*.

Las fracciones eluidas fueron analizadas a través de un gel SDS-PAGE al 10% para verificar en cuales estaba presente la proteína *rBmVDAC*, en este análisis se observó una sola banda que corresponde a aproximadamente 27 kDa en las fracciones 13-20 sin observarse otras proteínas contaminantes (Figura 12).

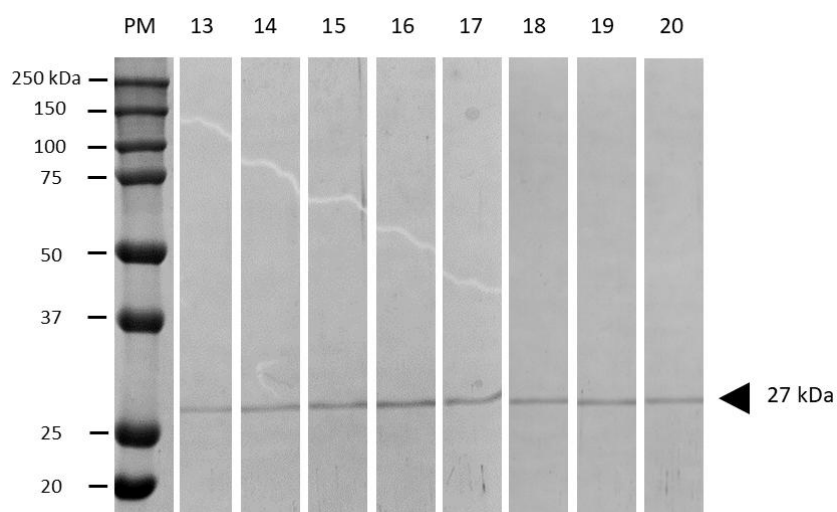


Figura 12. Fracciones 13-20 de *rBmVDAC* purificadas en FPLC. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Dual color (PM), del carril 2-9 se muestran las

fracciones 13-20 respectivamente, de la proteína *rBmVDAC* purificada, la flecha indica el peso molecular de 27 kDa en cada una de las fracciones.

1. Ensayo de unión entre *rBmVDAC* y HPIg en membrana de nitrocelulosa.

Para completar el objetivo 1, se realizó una transferencia del HPIg a una membrana de nitrocelulosa y se dejó interaccionar con *rBmVDAC* durante toda la noche, pasado el tiempo se reveló la reacción y como se muestra en la (Figura 13), se observó que el anticuerpo anti-VDAC, reconoció específicamente al complejo *rBmVDAC*/plasminógeno a la altura de 92 kDa (carril 2) y como control positivo reconoció a *rBmVDAC* sola marcada a 27 kDa (carril 5), no reconoció al plasminógeno por sí mismo (carril 3) ni a BSA (carril 7), por lo que no se mostró reactividad cruzada con sus respectivos controles, en el carril 4 se observó una banda a la altura del plasminógeno 92 kDa debido a que se interaccionó el HPIg directamente con los anticuerpos anti- plasminógeno y anti-ratón, en el carril 6 se colocó el SDS-PAGE de *rBmVDAC* y como controles en los carriles 7, 8 y 9 se fijó BSA a la membrana, en el carril 7 se interaccionó con *rBmVDAC* y sus debidos anticuerpos, en el carril 8 y 9 se realizaron las mismas interacciones salvo sin anticuerpo primario o sin anticuerpo secundario, respectivamente, a lo que no se observó ninguna banda por reactividad cruzada.

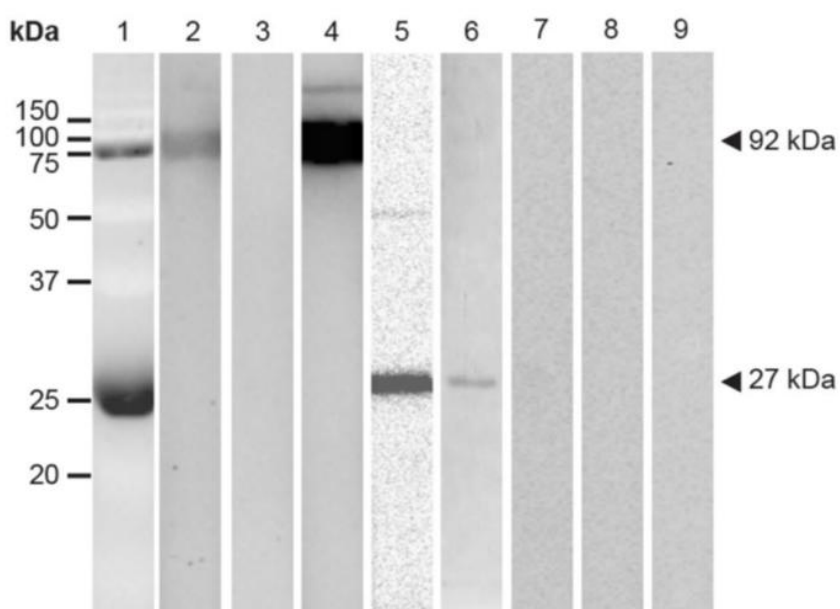


Figura 13. *rBmVDAC* se une al plasminógeno humano. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Dual Color (PM), del carril 2 a 4 se fijó HPIg en la membrana, en el carril 2 la tira de nitrocelulosa fue incubada con *rBmVDAC* y revelada con anti *rBmVDAC*, carril 3: la tira de NC incubada con PBS en lugar de *rBmVDAC* y revelada con anti *rBmVDAC* (control de unión), carril 4: se incubó sin *rBmVDAC* con anticuerpo anti-plasminógeno y anti-ratón, carril 5: se fijó en la membrana *rBmVDAC* y se interaccionó con sus respectivos anticuerpos, carril 6: se muestra el SDS-PAGE de *rBmVDAC* purificada. En los carriles 7, 8 y 9 se encuentran los controles negativos, se utilizó BSA en lugar de HPIg para fijar en la membrana de nitrocelulosa, carril 7: se incubó con *rBmVDAC* y se reveló con sus respectivos anticuerpos, carril 8 y 9: se interaccionó con *rBmVDAC* y se reveló solamente con anti- *rBmVDAC* y en otro solo con anti- bovino, respectivamente, para verificar que no hubiera reacción cruzada de alguno de los anticuerpos.

2. Análisis cuantitativo de la interacción dosis dependiente de *rBmVDAC*/HPIg e inhibición por ϵ ACA.

La interacción entre *rBmVDAC* y HPIg se realizó en una placa de 96 pozos donde se fijó una misma concentración de HPIg y posteriormente se añadió *rBmVDAC* a diferentes concentraciones, en presencia o ausencia del análogo de la lisina (ϵ ACA) como inhibidor de la interacción, lo cual se muestra en la (Figura 14). A mayor concentración de *rBmVDAC* aumentó la interacción con el HPIg (barras negras) y, a mayor concentración de ϵ ACA, disminuyó la interacción entre ambas proteínas (barras verdes y azules). Como control, se interaccionó BSA con HPIg (barras rosas), donde sí se detectó señal; sin embargo, es la más débil de todas.

Para realizar el análisis estadístico se decidió elegir la concentración de [16 μ g] con sus respectivos controles, al ser pocos datos y que no tienen una distribución normal, se empleó una prueba de Kruskal-Wallis (Figura 15), en el gráfico se representa la interacción *rBmVDAC*/HPIg con barras negras a diferentes concentraciones de ϵ ACA y en color gris se muestra a BSA/HPIg, la significancia es de ($p < 0.0001$) entre todas las

barras. Esta interacción podría potenciar el incremento de la activación del plasminógeno.

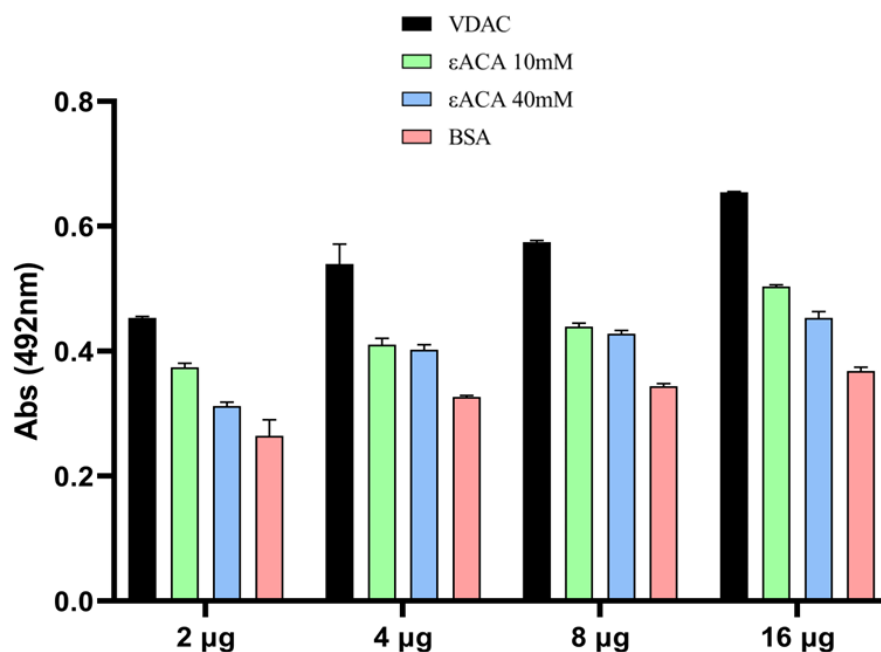


Figura 14. Curva dosis dependiente de la interacción entre rBmVDAC/HPIg. En color negro se muestra la interacción entre rBmVDAC/HPIg sin εACA, en verde se observa la interacción rBmVDAC/HPIg con εACA [10mM], en azul se representa la interacción rBmVDAC/HPIg con εACA [40mM] y como control negativo se muestra la interacción HPIg/BSA mostrada con color rosa. Cada condición de las interacciones se realizó por triplicado y el experimento completo se realizó por duplicado para verificar la reproducibilidad de este.

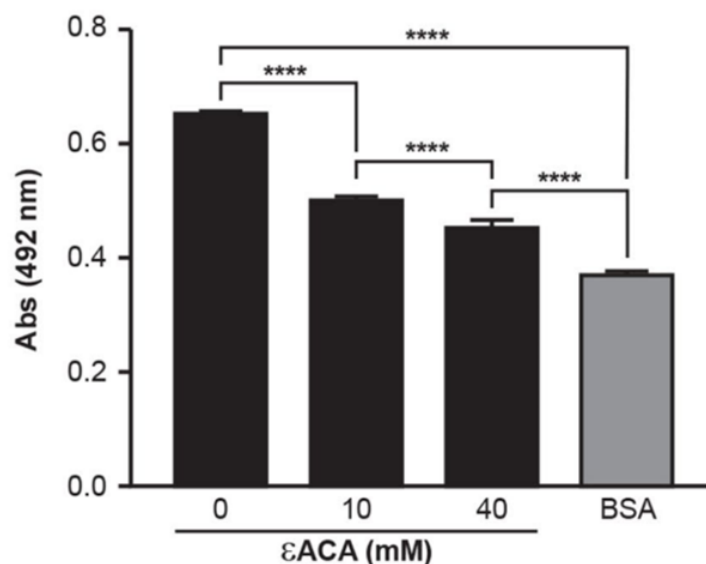


Figura 15. Estudio de la interacción *rBmVDAC*/HPIg a [16 µg]. En color negro se muestra la interacción *rBmVDAC*/HPIg a diferentes concentraciones de ϵ ACA (0, 10 y 40) y en color gris se muestra la interacción entre BSA/HPIg empleado como un control negativo. Los asteriscos negros arriba de las barras muestran la significancia estadística ($p < 0.0001$), la prueba estadística se realizó en el software GraphPad Prism V6.01.

3. Análisis del incremento de la activación de la plasmina (tPA + *rBmVDAC*).

En una placa de 96 pozos se realizó una curva dependiente del tiempo, en la cual se graficaron las absorbancias obtenidas a diferentes minutos de la interacción *rBmVDAC*/HPIg representada con un círculo como se muestra en la (Figura 16), al paso del tiempo la interacción entre las proteínas aumentó en comparación con la activación del plasminógeno por sí mismo representado con un rombo, en ambos casos se observó un aumento en la activación del plasminógeno, sin embargo, se potencializó en presencia de *rBmVDAC*; como controles negativos se incubó *rBmVDAC* sin plasminógeno más tPA (triángulo) y *rBmVDAC*/HPIg sin el activador (triángulo invertido), en ambos casos no se detectó actividad. Los resultados no mostraron una distribución normal, por lo tanto, se empleó una prueba Kruskal-Wallis, la cual reveló que la presencia de *rBmVDAC* aumenta la cantidad de plasmina de forma significativa a partir de los 10 minutos de interacción, con respecto a los controles.

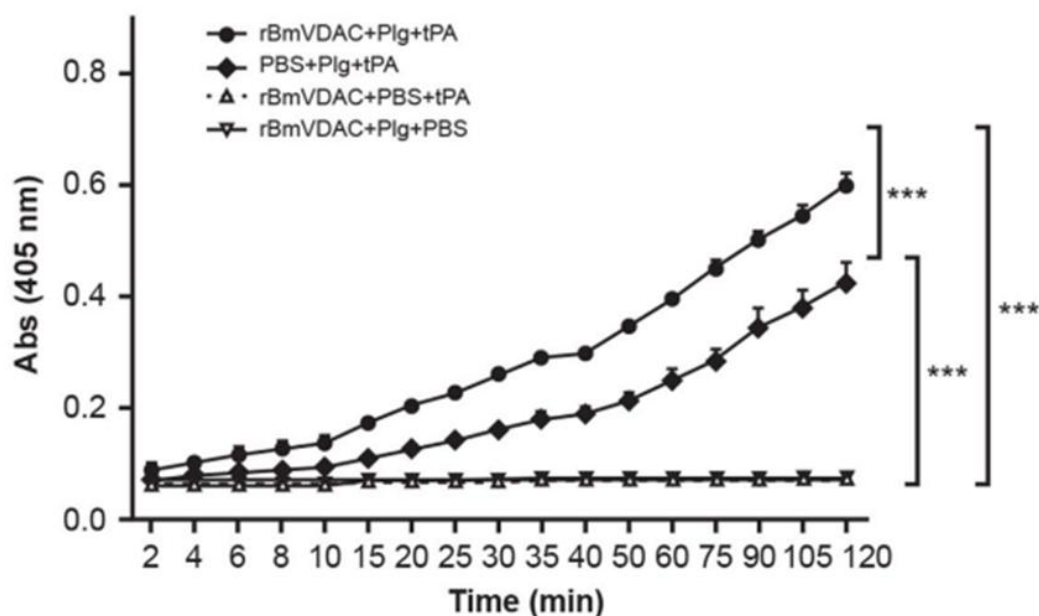


Figura 16. Ensayo de activación del plasminógeno. El HPlg se incubó con rBmVDAC (círculos) o PBS (rombos) antes de la adición de tPA. La activación del plasminógeno fue medida en base a la OD a 405 nm por interacción del sustrato tosyl-glycyl-polylysine-4-nitranidile-acetate. Las condiciones sin plasminógeno (triángulo) o sin tPA (triángulo invertido) fueron utilizadas como controles negativos. Cada condición fue realizada por triplicado y el experimento general fue duplicado para verificar la reproducibilidad de este. Los asteriscos negros mostrados del lado derecho muestran la significancia estadística ($p < 0.001$), la prueba estadística se realizó en el software GraphPad Prism V6.01.

Debido a que la importación del plasminógeno bovino está prohibida en México, se realizaron los experimentos anteriores con plasminógeno humano, sin embargo, para demostrar la interacción entre rBmVDAC y el plasminógeno bovino específicamente con el dominio kringle 5, primero se realizó un alineamiento entre el BoPlg (número de acceso: NP_776376.1) y el HPlg (número de acceso: NP_000292) con ayuda de blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostrado en la (Figura 17), se determinó un porcentaje de identidad del 78%. Posteriormente se realizó el alineamiento entre los dominios kringle 5 y kringle 4-5 de ambos plasminógenos, en donde el porcentaje de identidad fue de 80% y 79%, respectivamente (Figura 18), se decidió usar k4 fusionado con k5, debido a que k5 es una proteína muy pequeña y podría tener problemas de

plegamiento. En ambos alineamientos se utilizó Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) y con BoxShade (<https://junli.netlify.app/apps/boxshade/>) se realizó el esquema de colores dependiendo del cambio de aminoácido, el color negro indica que no hay cambios, el gris muestra un cambio de un aminoácido por otro parecido y en blanco se observa el cambio por un aminoácido de características completamente distintas.

Bovine plasminogen	MLPASPKMEHKAVVLLLLLFLKSGIGDILDDYVNTQGASILSLSRKNLAGRSVELCAAKC	60
Human plasminogen	-----MEHKQVVLVLLLLLFLKSGIGDILDDYVNTQGASILSVTKKOLGAGSIECAAKC	53
Bovine plasminogen	EEETDFVCRAFOYHSKEQQCVMAENSKMPVFERMRDVILMEKRIYILLECKTGNGQTYRG	120
Human plasminogen	EEETDFVCRAFOYHSKEQQCVMAENRKSIIIRMRDVILEKKVYLSECKTGNGKNYRG	113
Bovine plasminogen	TTAETKSGITCQKWSATSPHVPKFSPEKIFLAGLEENYCRNPDNDENGPCWYTTDPDKRY	180
Human plasminogen	TMSKTKNGITCQKWSSTSPHRRPFSPTHFSEGLEENYCRNPDNDENGPCWYTTDPDKRY	173
Bovine plasminogen	DYCDIFECETKCMHCSGENYEGKINKTMSGRDCQAWDSQSPHAGYIPSKFPPNKLKMY	240
Human plasminogen	DYCDILECEETKCMHCSGENYDGKISKMTMSGLEDCQAWDSQSPHAGYIPSKFPPNKLKMY	233
Bovine plasminogen	CRNPDGEPWPWCFTTDPKRWEECDIPRCTTPPPSSGPKYQCLKGTGKNYGGTVAVTESG	300
Human plasminogen	CRNPDRELWPWCFTTDPKRWELCDIPRCTTPPPSSGPKYQCLKGTGKNYGGTVAVTVSG	293
Bovine plasminogen	HTCQRWSEDTPHKHNRTPENFPCKNLLENYCRNPNGEKAPWCYTTNSQVRWEYCHIPSCE	360
Human plasminogen	HTCQHWSAQTPHKNRTPENFPCKNLLENYCRNPNGEKAPWCYTTNSQVRWEYCHIPSCE	353
Bovine plasminogen	SSPSTERMDVPVPPECTPVPQDCYHGNGQSYRGTSSTITIGKQCQSWSSMTPHRHOKTP	420
Human plasminogen	SSPSTERMDVPVPPECTPVPQDCYHGNGQSYRGTSSTITIGKQCQSWSSMTPHRHOKTP	413
Bovine plasminogen	ENYPNAGLTIMNYCRNPDADKSPWCITTDPRVRWEICNLKKCSSTPEQVFAAF---QAAGV	477
Human plasminogen	ENYPNAGLTIMNYCRNPDADKSPWCITTDPRVRWEICNLKKCSSTPEQVFAAFPPVVLLEPV	473
Bovine plasminogen	ENPEEADCMIGTGKSYRGKATTVVGVPQCEWAAQEPHCHSIPTPETNFGSLEENYCRN	537
Human plasminogen	ETPSEEDCMFGNGKGYRGKATTVVGTPQCEWAAQEPHCHSIPTPETNFRAGLEENYCRN	533
Bovine plasminogen	PDGDVNGPWCYTINPRKPIIDYCDVPQCE--SFDCGKPKVEPKKCSGRVGGCVSKPHSWP	596
Human plasminogen	PDGDVGGPWCYTINPRKPIIDYCDVPQCE--SFDCGKPKVEPKKCSGRVGGCVSKPHSWP	593
Bovine plasminogen	WQVSLRR-SSRHFCGGTLISPKVLTAAHCLDNLALSFKYKVLGAHNEKVRQESVOEIP	655
Human plasminogen	WQVSLRRREFGMHFCGGTLISPEVLTAAHCLDKSPRFSYKVLGAHNVNLEPHVQEIIE	653
Bovine plasminogen	VSRLREPSQADIALKLKSRPAITKEVIPACLPSPENYVADRTCEYITGWGETQGTFGC	715
Human plasminogen	VSRLRELPARKDIALKLKSSPAITDKVIPACLPSPENYVADRTCEYITGWGETQGTFGC	713
Bovine plasminogen	GLLKEAHLFVIENKVCNRRNEILDGRVKFTLCAGHLIGGTDSCQGDSSGGPLVCFEKDKYI	775
Human plasminogen	GLLKEAQLFVIENKVCNRRNEILDGRVQSTLCAGHLIGGTDSCQGDSSGGPLVCFEKDKYI	773
Bovine plasminogen	LQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVRVSPYVPIETMRNN	812
Human plasminogen	LQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVRVSRVPIETMRNN	810

Figura 17. Alineamiento de plasminógeno bovino y plasminógeno humano. El plasminógeno bovino es de 812 aa y el plasminógeno humano es de 810 aa. Los residuos de aminoácidos en color negro son idénticos entre ambas proteínas, los que se observan en color gris indican un cambio de aminoácido de propiedades similares y los que se encuentran en color blanco indican un cambio de aminoácido

completamente distinto. Realizado con ClustalW, los residuos se colorearon con la herramienta BoxShade.



Figura 18. Alineamientos de los dominios kringles del plasminógeno bovino y humano. Panel A, se muestra el alineamiento del dominio kringle 5 de ambos plasminógenos y en el panel B se observa el alineamiento entre los dominios kringle 4 y kringle 5 juntos. Ambos alineamientos siguen el código de colores de la figura anterior. Realizados con ClustalW, los residuos conservados se colorearon con la herramienta BoxShade.

Posteriormente se procedió al diseño de los genes sintéticos que codifican para los dominios kringle 5 y kringle 4-5, los cuales se mandaron a sintetizar con la empresa Gene Universal, Inc. El plásmido *pcoldII* fue utilizado como plásmido vector, por lo tanto, a las secuencias se les agregaron enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, las cuales no cortan en medio de la secuencia, pero sí en el vector para liberar el inserto.

Las secuencias de los dominios kringle 5 y kringle 4-5 tienen un tamaño de 255 pb y 558 pb respectivamente, tomando en cuenta los nucleótidos de las enzimas de restricción en ambas construcciones.

4. Clonación y expresión de *kringle 4-5* y *kringle 5* del plasminógeno bovino en *pColdII*.

Debido a que al probar las construcciones que había mandado la compañía, se liberaba un segundo inserto, se procedió a purificar la banda de interés a partir de un gel de agarosa, y a preparar el vector p*ColdII* vacío para proceder a la ligación. En un gel de agarosa al 1% se corrieron los elementos que se ocuparon en la ligación (Figura 19), en el carril 2 se muestra a p*ColdII* vacío desfosforilado y linearizado correspondiente a 4,392 pb y las construcciones de *k4-5* (558 pb) y *k5* (255 pb) purificadas de un gel anterior mostradas en los carriles 3 y 4, respectivamente, sin contaminantes ni insertos extras liberados.

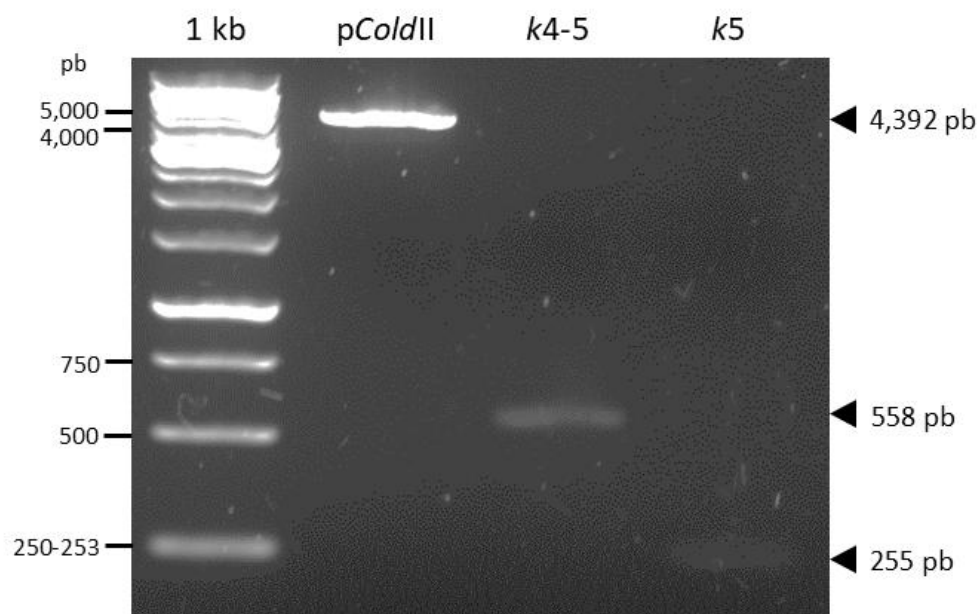


Figura 19. Vector e insertos purificados. Se muestra el marcador de talla de 1 kb (Promega), carril p*ColdII*: se encuentra el vector vacío linearizado y desfosforilado, en el carril *k4-5* y *k5*, respectivamente, se muestran los insertos purificados desde un gel de agarosa. Las flechas de la derecha muestran la talla en pares de base (pb) de cada muestra.

Posteriormente se analizaron las clonas que crecieron en la transformación de la ligación, por lo que se realizaron minipreps de 10 clonas distintas de la construcción de *k5* (Figura 20 panel A) y 10 clonas de la construcción *k4-5* (Figura 21 panel A).

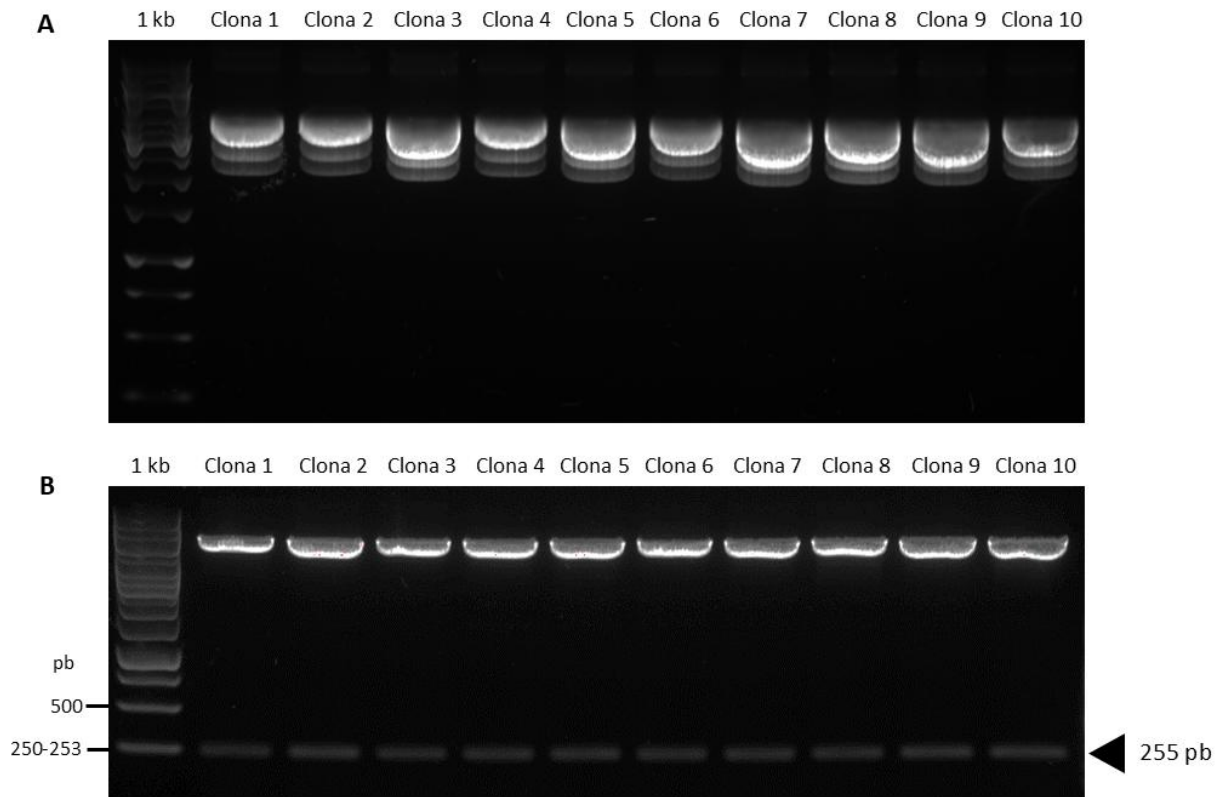


Figura 20. Análisis de las clonas resultantes de la transformación de la ligación con pColdII/Kringle 5. Panel A, verificación de los plásmidos extraídos por minipreps y en el panel B se muestra la restricción del DNA plasmídico con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, los números de los carriles en los geles del panel A y B corresponden a la forma en que se enumeraron cada una de las clonas picadas. El marcador de talla utilizado fue de 1 kb (Promega).

Subsecuentemente se realizó una restricción enzimática con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I a los minipreps de cada construcción, en la (Figura 20 panel B) se liberó un inserto de 255 pb correspondiente a *k5* de las 10 clonas analizadas y en la (Figura 21 panel B) se observó un inserto de 558 pb correspondiente a *k4-5* en las 10 clonas analizadas, por lo que se obtuvo un 100% de eficiencia de transformación de la ligación.

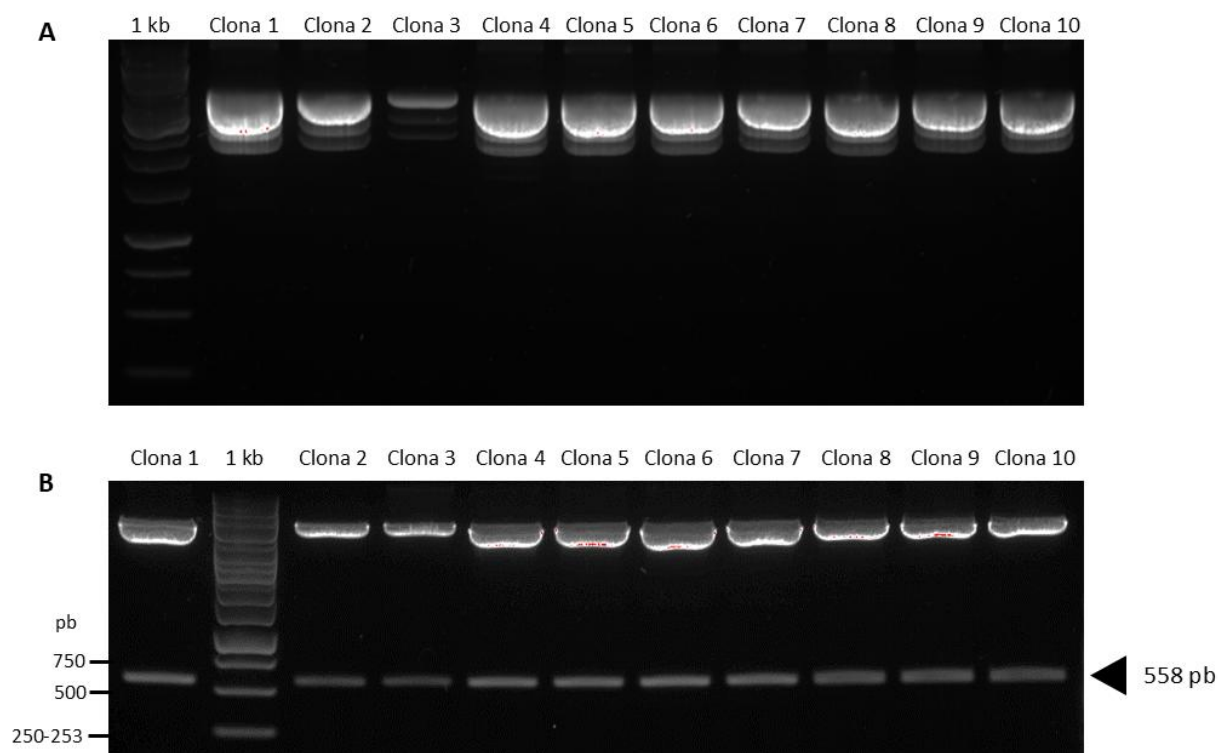


Figura 21. Análisis de las clonas resultantes de la transformación de la ligación con pColdII/Kringle 4-5. Panel A, verificación de los plásmidos extraídos por minipreps y en el panel B se muestra la restricción del DNA plasmídico con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, los números de los carriles en los geles del panel A y B corresponden a la forma en que se enumeraron cada una de las clonas picadas. El marcador de talla utilizado fue de 1 kb (Promega).

Posteriormente se realizó la inducción de los péptidos correspondientes a los dominios k5 y k4-5 del plasminógeno bovino, a partir de una cepa de *E.coli* BL21 (Figura 22), para verificar la integridad de ambas proteínas se analizó en un SDS-PAGE al 15% en donde se observó una banda enriquecida correspondiente a la proteína inducida en el carril 3 (I) a la altura de 12 kDa, la cual indica una sobreexpresión de k5 con respecto al no inducido (NI) en el carril 2, y se observó una segunda banda enriquecida en el carril 5 (I) a la altura de 25 kDa, la cual indica una sobreexpresión de k4-5 con respecto al carril 4 (NI).

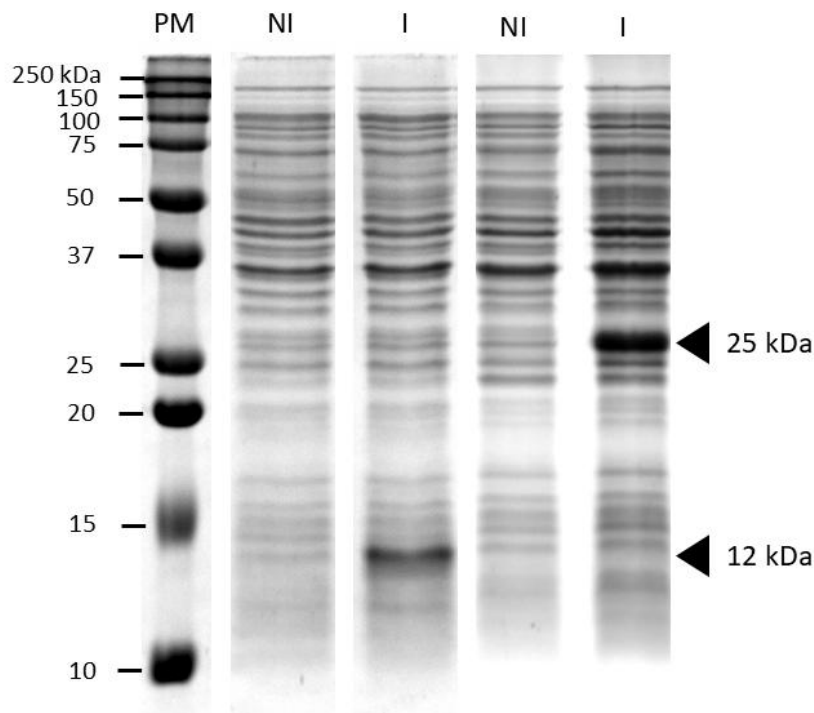


Figura 22. Inducción de las proteínas k5 y k4-5. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular Dual Color (PM), en el segundo carril se muestra a k5 no inducida (NI), en el tercer carril se observa a k5 inducida (I) con 1mM de IPTG, en el carril 4 se muestra a k4-5 no inducida (NI) y en el último carril se encuentra k4-5 inducida (I) con 1mM de IPTG. La flecha de la derecha señala a k5 y k4-5 con un peso de 12 kDa y de 25 kDa, respectivamente.

También se realizó la prueba de solubilidad a ambas proteínas (Figura 23), en un SDS-PAGE al 15% se corrieron nuevamente las inducciones y las fases solubles e insolubles de cada proteína, en el cual se observaron bandas sobreexpresadas en el carril 4 fase insoluble (f. ins) del k4-5 y en el carril 8 fase insoluble (f. ins) del k5, las cuales no se observan en la fase soluble (f. sol) de ambas proteínas, por lo que se empleó el protocolo “On Column Refolding” del FPLC para la purificación de las proteínas debido a que se encontraron inducidas en la fase insoluble.

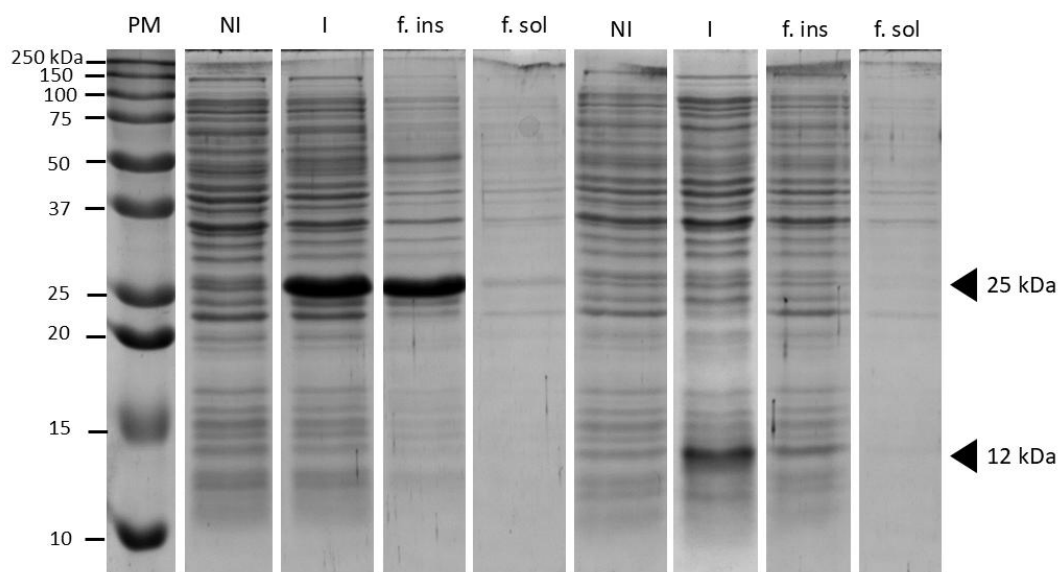


Figura 23. Prueba de solubilidad de las proteínas k5 y k4-5. Carril 1: se encuentra el marcador de peso molecular dual color (PM), carril 2: k4-5 no inducido (NI), carril 3: k4-5 inducido (I), carril 4: fase insoluble de k4-5 (f. ins), carril 5: fase soluble de k4-5 (f. sol), carril 6: k5 no inducido (NI), carril 7: k5 inducido (I), carril 8: fase insoluble de k5 (f. ins), carril 9: fase soluble de k5 (f. sol). Las flechas de la derecha señalan a k5 y k4-5 con un peso de 12 y 25 kDa, respectivamente.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad para ambas proteínas. En la (Figura 24 panel A) se muestra el cromatograma de k5 en el cual se observó un pico que siguió creciendo entre las fracciones 6 y 7, lo cual indica la presencia de la proteína k5 a partir de esa fracción y en el panel B se muestra el cromatograma de k4-5, de igual manera se observó un pico que siguió creciendo entre las fracciones 6 y 7 señalando la presencia de la proteína k4-5 a partir de esa fracción.

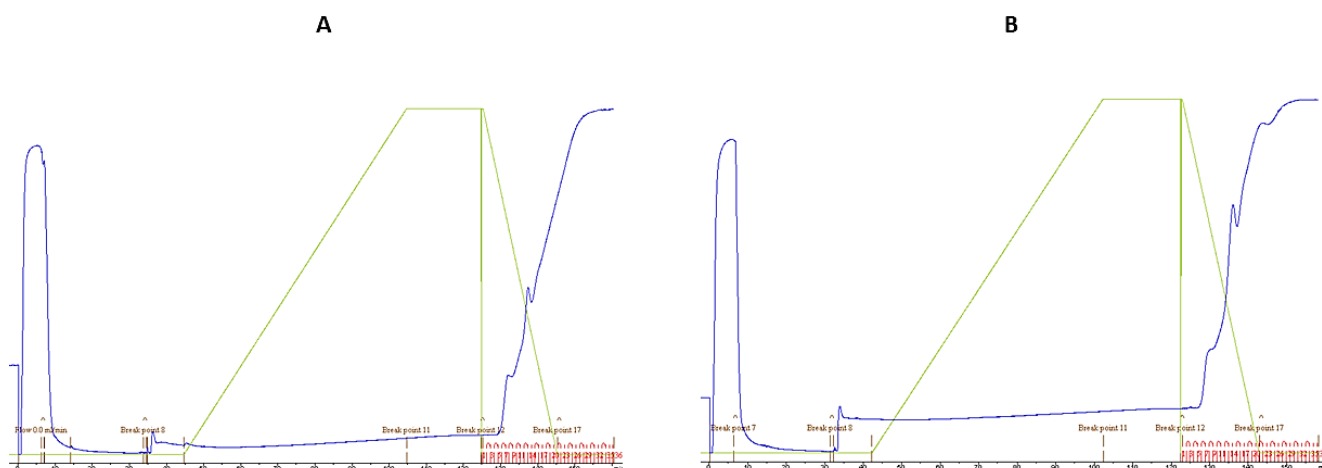


Figura 24. Cromatograma de las proteínas k5 y k4-5 purificadas por cromatografía de afinidad con el protocolo “On Column Refolding”. Panel A. Proteína k5 y el panel B proteína k4-5. En color azul se muestra la medición de luz UV a 290 nm, la construcción del gradiente se muestra en verde y en rojo se muestran las fracciones eluidas de ambas proteínas.

Las fracciones obtenidas se analizaron a través de un SDS-PAGE al 15% como se muestra en la (Figura 25), en el panel A se muestran las fracciones 12-17 de la purificación de k5 en las cuales se observó una banda a la altura de 12 kDa y en el panel B se muestran las fracciones 15-23 de la purificación de k4-5 en las cuales se mostró una banda a la altura de 25 kDa, sin embargo, en ambos geles se observaron bandas extras de posible contaminación.

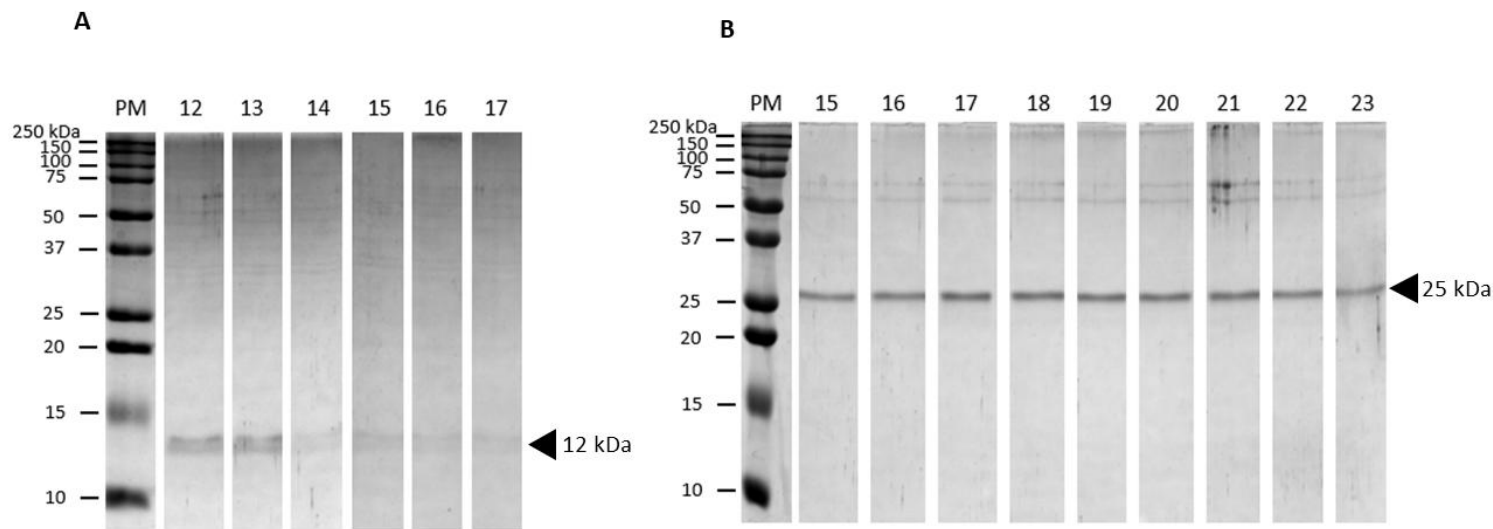


Figura 25. Fracciones de las proteínas k5 y k4-5 purificadas en FPLC. En el panel A, se muestran las fracciones de k5 purificadas, en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Dual color (PM), del carril 2-7 se muestran las fracciones 12-17 respectivamente. En el panel B, se observan las fracciones de k4-5 purificadas, en el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (PM) y del carril 2- 10 se muestran las fracciones 15-23, respectivamente. La flecha de la derecha indica el peso molecular de 12 kDa y 25 kDa en cada una de las fracciones.

Las fracciones en las que se observaron la presencia de ambas proteínas fueron dializadas en un filtro de ultracentrífuga Amicón® respectivamente, se realizó el recambio de buffer y se eliminaron contaminantes de la purificación (Figura 26), en el carril 2 se observó una sola banda libre de contaminantes y más concentrada correspondiente a k4-5 (25 kDa) producto de juntar las fracciones 12, 13, 14 y 15. En el carril 3 se observó una banda definida libre de contaminantes la cual indica la presencia de k5 (12 kDa) producto de juntar las fracciones 15, 16, 17 y 18. A pesar de que se juntaron la misma cantidad de fracciones, se observó que k5 se concentró menos con respecto a k4-5.

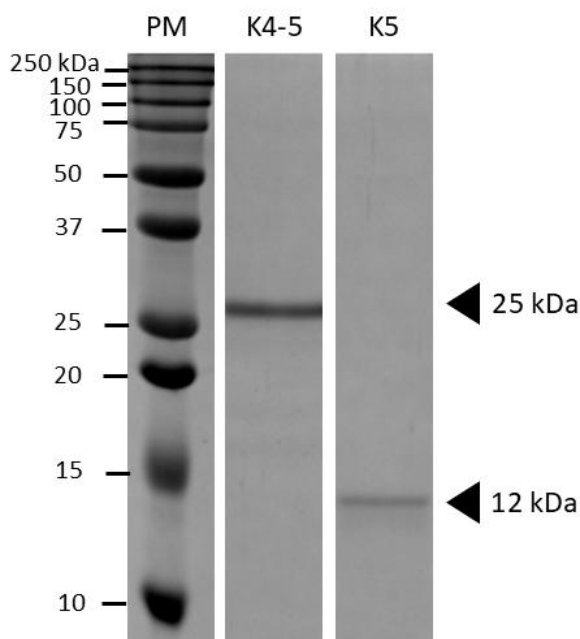


Figura 26. Fracciones dializadas y concentradas de las proteínas k5 y k4-5. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular Dual Color (PM), en el segundo carril se

observa a k4-5 y en el último carril se encuentra k5. Las flechas de la derecha muestran el peso de 25 y 12 kDa, respectivamente.

Análisis cuantitativo de la interacción dosis dependiente *rBmVDAC*/k5 y k4-5 e inhibición con ϵ ACA.

Para analizar la interacción entre *rBmVDAC* y ambas proteínas kringles se fijó en una placa de 96 pozos una misma concentración de k5 y k4-5, respectivamente y se añadió *rBmVDAC* a diferentes concentraciones, en presencia o ausencia del análogo de la lisina (ϵ ACA) a [40mM] como inhibidor de la interacción entre las proteínas (Figura 27), en el panel A se muestran los resultados de k4-5 a una escala mayor de absorbancia con respecto al panel B en donde se observan los resultados de k5. En ambos gráficos la interacción con *rBmVDAC* está representada en color negro, donde se muestra que a mayor concentración de *rBmVDAC*, aumentó la interacción con los kringles; en color azul se muestra la interacción *rBmVDAC*/kringle/ ϵ ACA y mostró una disminución de la interacción en ambos casos, BSA fue empleado como control representado en color rosa. La disminución de la escala de absorbancias en k5 puede indicar que no tiene buena estabilidad debido a su tamaño y al plegamiento de la proteína, por lo que al juntar k4-5 se obtuvieron mejores resultados, sin embargo, ambas proteínas siguen el mismo patrón de comportamiento.

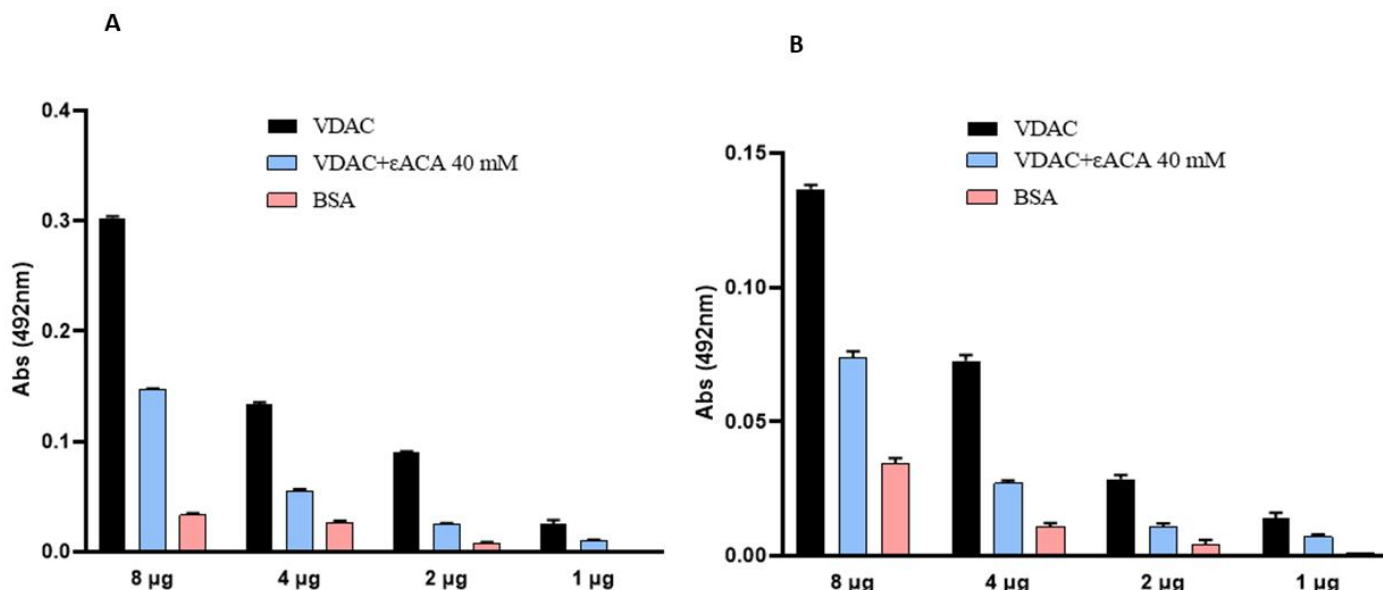


Figura 27. Curva dosis dependiente de la interacción entre rBmVDAC/k5 y k4-5. En el panel A se muestra el gráfico de interacción entre rBmVDAC/k4-5 en el cual la escala llega hasta 0.4 y en el panel B se muestra el gráfico de interacción entre rBmVDAC/k5 en el cual la escala llega hasta 0.15. En ambos gráficos el color negro muestra la interacción entre rBmVDAC/k-5 y k4-5 sin ϵ ACA, en azul se observa la interacción rBmVDAC/k-5 y k4-5 con ϵ ACA [40mM], y como control BSA/k-5 y k4-5 mostrado con color rosa. El experimento se realizó por duplicado para verificar la reproducibilidad de este y cada experimento tenía 3 réplicas.

Para realizar el análisis estadístico se decidió elegir la concentración de [8 μ g] de cada proteína con sus respectivos controles, al ser pocos datos y que no tienen una distribución normal, se empleó una prueba de Kruskal-Wallis (Figura 28). En el panel A se representa la interacción rBmVDAC/k4-5 y en el panel B la interacción rBmVDAC/k5 con barras negras, en las cuales se observa que al aumentar la concentración de ϵ ACA, disminuye la interacción entre rBmVDAC/k5 y k4-5, y en color gris se muestra a BSA/kringles, la significancia es de ($p < 0.01$) entre todas las barras.

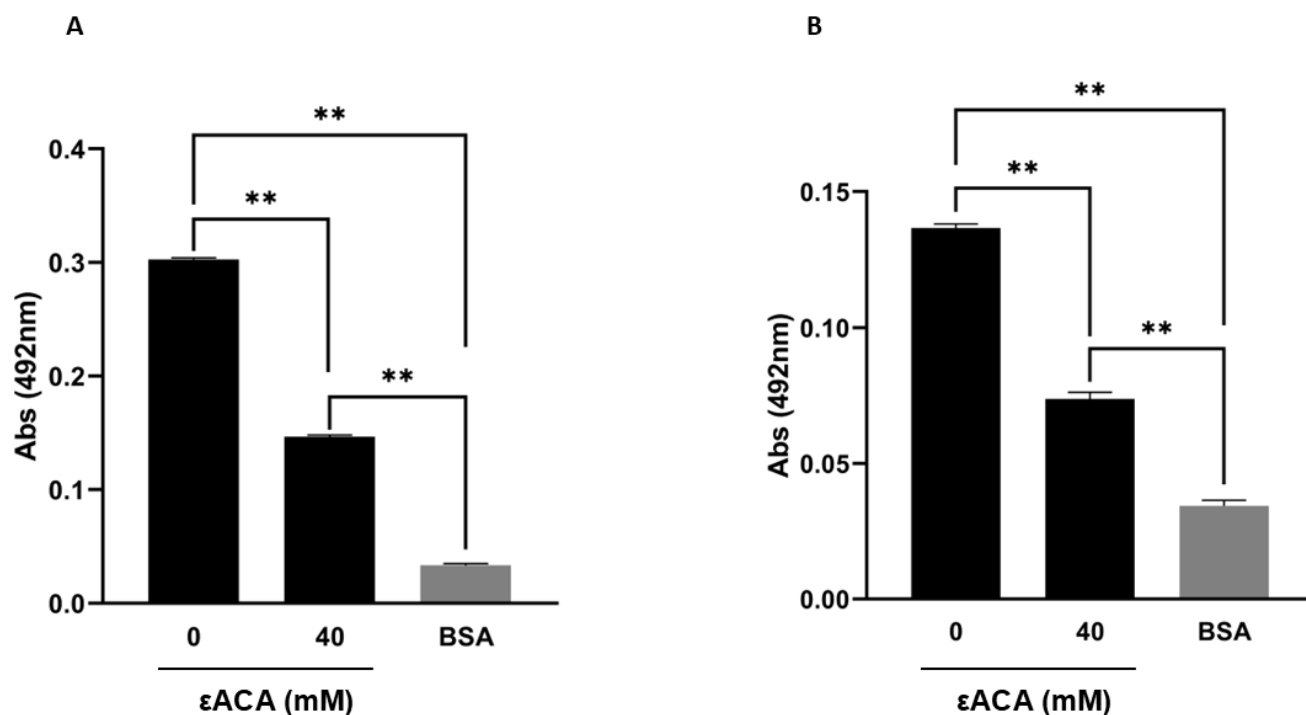


Figura 28. Estudio de la interacción *rBm*VDAC/k5 y k4-5 a [8 μ g]. En el panel A se muestra el gráfico de interacción entre *rBm*VDAC/kringle 4-5 y en el panel B se muestra el gráfico de interacción entre *rBm*VDAC/k5 ambos a partir de la mayor concentración de la curva anterior [8 μ g]. En color negro se muestra la interacción *rBm*VDAC/k5 y k4-5 a diferentes concentraciones de ϵ ACA (0 y 40) y en color gris se muestra la interacción entre BSA/k5 y k4-5 empleada como un control negativo. Los asteriscos negros arriba de las barras muestran la significancia estadística ($p < 0.01$), la prueba estadística se realizó en el software GraphPad Prism V6.01.

Finalmente se realizó una curva a diferentes concentraciones de ϵ ACA [10, 20 y 40 mM] (verde, morado y azul, respectivamente) con la concentración más alta de *rBm*VDAC [8 μ g] (Figura 29) para complementar los experimentos anteriores, debido a que por falta de proteína no se pudieron realizar todas las concentraciones de *rBm*VDAC a todas las concentraciones de ϵ ACA. El patrón continuó de la misma manera, a mayor concentración de ϵ ACA disminuyó la interacción entre ambas proteínas, no hubo diferencia significativa entre ϵ ACA [10 mM] y ϵ ACA [20 mM], entre todos los demás grupos sí hubo diferencia significativa ($p < 0.01$) en ambas proteínas, para el análisis estadístico se empleó una prueba de Kruskal-Wallis. BSA se empleó como control de la interacción mostrado en color rosa.

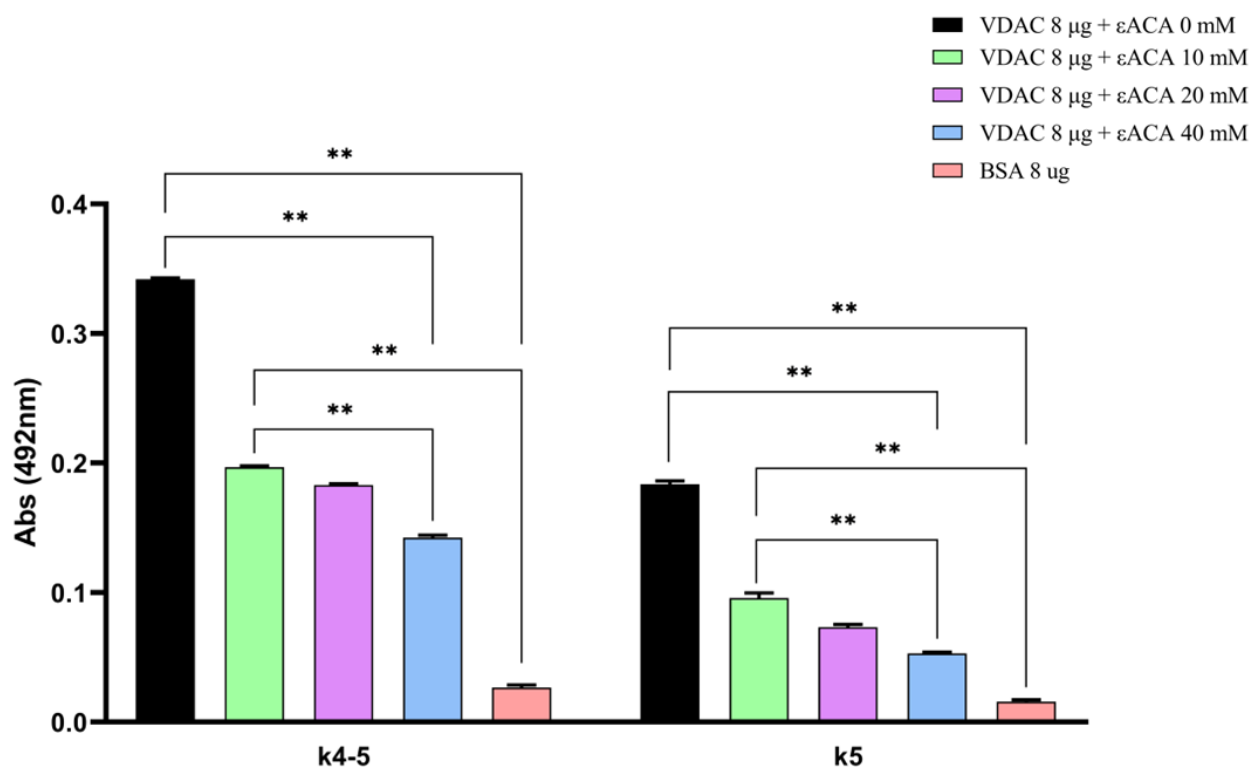


Figura 29. Curva de inhibición de la interacción *rBmVDAC*/k4-5 y k5. En ambos casos se utilizó *rBmVDAC* a [8 μg] a diferentes concentraciones de εACA [0, 10, 20 y 40 mM] (negro, verde, morado y azul, respectivamente), adicionalmente como control negativo se interaccionó BSA/ k5 y k4-5 mostrados con color rosa. El experimento se realizó por duplicado para verificar la reproducibilidad de este y cada experimento tenía 3 réplicas. Los asteriscos negros arriba de las barras muestran la significancia estadística ($p < 0.01$), la prueba estadística se realizó en el software GraphPad Prism V6.01.

X. DISCUSIÓN

VDAC es una proteína mitocondrial con diversas funciones, entre ellas destaca su actividad como un canal aniónico dependiente de voltaje, y el papel que desempeña en los procesos de apoptosis y de regulación metabólica (Colombini, 1989). Por otra parte, VDAC-1 ha sido localizada en la membrana plasmática de varios tipos celulares (De Pinto, Messina, *et al.*, 2010b), donde se ha demostrado que interactúa con el plasminógeno humano (Ghosh *et al.*, 2011).

En *R. microplus*, *BmVDAC* fue identificada inicialmente en el intestino de la garrapata donde se relocaliza durante la infección por *B. bigemina*. Por otra parte, la proteína recombinante *rBmVDAC* fue evaluada como vacuna anti-garrapata en bovinos, mostrando resultados favorables, con una eficacia del 84% contra la infestación de *R. microplus* (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020) en los bovinos inmunizados. Una de las características que debe tener la proteína para ser considerada un buen candidato vacunal, es que sea conservada entre diferentes géneros y especies del organismo en cuestión. La proteína *BmVDAC* se encuentra conservada en diferentes géneros de garrapatas, incluyendo garrapatas de importancia en la transmisión de patógenos en humanos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012), por lo que *BmVDAC* podría ser probada en un futuro como vacuna contra garrapatas de importancia en la salud humana y animal, de ahí la necesidad de profundizar en el estudio de esta proteína y sus posibles funciones.

En estudios preliminares de inmunoprecipitación, se evidenció que *BmVDAC* interacciona con el plasminógeno bovino (Hernández-Aparicio, 2020). El plasminógeno es un zimógeno que forma parte del sistema fibrinolítico y puede ser activado a plasmina; en algunos patógenos como bacterias y protozoarios esta activación del plasminógeno ayuda al parásito a cruzar barreras e hidrolizar proteínas del complemento e inmunoglobulinas (Lähteenmäki, Kuusela and Korho, 2001).

Nuestros resultados muestran la interacción específica de *BmVDAC* con el HPIg y además que la presencia de *BmVDAC* incrementa significativamente la activación del

plasminógeno en presencia de tPA, lo que sugiere que *BmVDAC* podría tener una función relevante durante la alimentación de *R. microplus* y de la infección con *B. bigemina* en las garrapatas. La sangre debe mantenerse en forma líquida durante la fase de alimentación tanto en el tracto digestivo como en la boca de la garrapata. En la literatura existen reportes de proteínas de saliva de la garrapata con actividad antitrombótica que se han propuesto como candidatos vacunales (Jablonka *et al.*, 2015) que ayudan a prevenir la formación de coágulos durante la alimentación; entre ellos la enolasa que tiene un factor antitrombótico y activa al plasminógeno dando como resultado la lisis de los coágulos de fibrina (Xu, Cheng and Yang, 2016).

La boophilina es una de las pocas proteínas reportadas con funciones similares en los intestinos de *R. microplus*, esta proteína es un inhibidor de proteasas de tipo Kunitz-2 (Berger *et al.*, 2024) y es importante en mantener el microambiente del intestino de la garrapata en cuanto a la homeostasis y una baja inflamación en el área de alimentación, interfiriendo con la formación de coágulos y ayudando a la digestión de la sangre, lo que confiere a las garrapatas, ventajas adaptativas en el metabolismo y de supervivencia permitiendo el desarrollo de los huevos (Assumpção *et al.*, 2016).

En humanos se ha reportado que la interacción de VDAC-1 y el HPlg, ocurre específicamente con la región del dominio kringle 5 del plasminógeno (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2003). Este es un dominio conservado entre especies y presenta un 80% de identidad con el dominio k5 del plasminógeno bovino, por lo que, ante la imposibilidad de realizar todos los ensayos con BoPlg, debido a problemas con su comercialización, nos propusimos clonar y expresar el dominio k5 y los dominios k4-5 fusionados con la finalidad de brindarle una mayor oportunidad de plegamiento al péptido. Los resultados mostraron que la unión de *BmVDAC* con el dominio k5 es específica y depende de los residuos de lisina, sin embargo, es importante resaltar que los valores obtenidos cuando se usó el péptido recombinante k4-5 fueron mayores, lo que corrobora que los dominios juntos posiblemente se pliegan de forma más satisfactoria.

Los estudios de docking molecular entre VDAC-1 y el dominio k5 del HPIg, mostraron que los residuos de lys12, thr19, ser57, thr188, arg139, asn214, ser240 y lys274 estaban implicados en la interacción (Liang and Bian, 2016). Los resultados del docking molecular entre *BmVDAC* y el dominio k5 del HPIg sugieren que la interacción es espontánea con una ΔG de -220.241 kcal/moles y que cinco residuos de aminoácidos en el carboxilo terminal de *BmVDAC* están implicados en la interacción a través de puentes de hidrógeno con el dominio k5 del plasminógeno, estos son la ser239, la gln241, la asn266, la gly270 y la lys273, destacando la lisina 273 la cual se encuentra conservada en la proteína VDAC de diferentes especies de garrapatas y que posiblemente está implicada en la unión con el dominio k5 del plasminógeno (Castañeda *et al.*, 2025). Para corroborar la importancia de este residuo en la interacción, se utilizó ϵ ACA el cual es un análogo de la lisina y tiene como función ser un competidor que inhibe la interacción entre *BmVDAC* y del plasminógeno, nuestros resultados demostraron que la interacción es dosis dependiente y que el uso de ϵ ACA, disminuye la interacción entre ambas proteínas, por lo que indica que la interacción es dependiente de lisina; este resultado se puede comparar con el efecto inhibitorio que tiene ϵ ACA en la interacción de la enolasa de *B. bigemina* con el plasminógeno, la cual también disminuye significativamente en presencia del análogo de la lisina (Luna *et al.*, 2025).

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que *BmVDAC* podría desempeñar una función similar a las proteínas reportadas que tienen relevancia en el proceso de alimentación y digestión de *R. microplus*. Por otra parte, conocemos que existe un aumento en la abundancia de *BmVDAC* en el intestino medio de las garrapatas infectadas con *B. bigemina* (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015), por lo que podríamos sugerir de que la activación del plasminógeno por *BmVDAC* facilita la alimentación y digestión de *R. microplus* y a la vez, la invasión y propagación del parásito en el intestino medio, como se ha descrito, para *Borrelia burgdorferi* en garrapatas donde se ha demostrado que la activación del sistema plasminógeno del vector facilita la invasión de las células de la garrapata por parte del parásito (Coleman *et al.*, 1997).

XI. CONCLUSIONES

- *rBmVDAC* se une con el plasminógeno humano e incrementa su activación.
- La interacción entre *rBmVDAC* y HPlg es específica y promueve la conversión del plasminógeno a plasmina activa.
- El HPlg y el BoPlg se encuentran conservados al igual que los dominios k5 de cada proteína.
- La unión de *rBmVDAC* al dominio k5 del plasminógeno bovino es específica.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, J. *et al.* (1986) "Resistencia de garrapatas en México," in A.H. Cavazzani and Z. García (eds.) *Seminario Internacional de Parasitología Animal, Memorias*. Cuernava, Morelos, pp. 282-306.
2. Alonso, Miguel and Fernández, A. (2022) *Rhipicephalus microplus: biología, control y resistencia*. Edited by R. Riaño. Yucatán: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical.
3. Alonso, M and Fernández, A. (2022) *Rhipicephalus microplus: biología, control y resistencia*. Yucatán.
4. Álvarez, J. and Cantó, G. (1991) *Diagnóstico de la babesiosis bovina*. Edited by FMVZ-UNAM. Quiróz: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre.
5. Andersen, J.F. *et al.* (2003) "Inhibition of Hemostasis by a High Affinity Biogenic Amine-binding Protein from the Saliva of a Blood-feeding Insect," *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), pp. 4611-4617. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M211438200>.
6. Antunes, S. *et al.* (2012) "Functional genomics studies of Rhipicephalus (Boophilus) annulatus ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, Babesia bigemina," *International Journal for Parasitology*, 42(2), pp. 187-195. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.12.003>.
7. Assumpção, T.C. *et al.* (2016) "In Vitro Mode of Action and Anti-thrombotic Activity of Boophilin, a Multifunctional Kunitz Protease Inhibitor from the Midgut of a Tick Vector of Babesiosis, Rhipicephalus microplus," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), p. e0004298. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004298>.
8. Avilán, L. *et al.* (2011) "Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites—Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target," *Enzyme Research*, 2011, pp. 1-14. Available at: <https://doi.org/10.4061/2011/932549>.
9. Baker, M.A. *et al.* (2004) "VDAC1 Is a Transplasma Membrane NADH-Ferricyanide Reductase," *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), pp. 4811-4819. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M311020200>.
10. Bal, M.S. *et al.* (2016) "Diagnosis and management of bovine babesiosis outbreaks in cattle in Punjab state.," *Veterinary world*, 9(12), pp. 1370-1374. Available at: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1370-1374>.

11. Barker, S.C. and Murrell, A. (2004) "Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names," *Parasitology*, 129(S1), pp. S15-S36. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182004005207>.
12. Barrero, R.A. *et al.* (2017) "Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome," *International Journal for Parasitology*, 47(9), pp. 569-583. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.007>.
13. Bayrhuber, M. *et al.* (2008) "Structure of the human voltage-dependent anion channel," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), pp. 15370-15375. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>.
14. Bellgard, M.I. *et al.* (2012) "CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*," *International Journal for Parasitology*, 42(2), pp. 161-169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.11.006>.
15. Benavides, E. *et al.* (2012) "Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos.," *Revista Ciencia Animal*, 5, pp. 31-49.
16. Benavides, M.V. and Sacco, A.M.S. (2007) "Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection," *Veterinary Parasitology*, 150(1-2), pp. 54-64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.022>.
17. Berger, M. *et al.* (2024) "An *Ixodes persulcatus* Inhibitor of Plasmin and Thrombin Hinders Keratinocyte Migration, Blood Coagulation, and Endothelial Permeability," *Journal of Investigative Dermatology*, 144(5), pp. 1112-1123.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.10.026>.
18. Betancour, J. (2019) "Control integrado de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (garrapata común del ganado) con base en la vacuna Go Tick en fincas lecheras de diferentes regiones de Colombia," *Acovez*, pp. 48-48.
19. Blachly-Dyson, E. *et al.* (1993) "Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel.," *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), pp. 1835-1841. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53930-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53930-2).
20. Bock, R. *et al.* (2004) "Babesiosis of cattle," *Parasitol*, 129, pp. 247-269.
21. Brodsky, S. *et al.* (2001) "Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(4), pp. H1784-H1792. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1784>.

22. Brown, S.J. and Askenase, P.W. (1985) "Rejection of ticks from guinea pigs by anti-hapten-antibody-mediated degranulation of basophils at cutaneous basophil hypersensitivity sites: role of mediators other than histamine.," *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 134(2), pp. 1160–5.
23. Cao, B. *et al.* (2025) "Ticks jump in a warmer world: Global distribution shifts of main pathogenic ticks are associated with future climate change," *Journal of Environmental Management*, 374, p. 124129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2025.124129>.
24. Castañeda, E. *et al.* (2025) "The VDAC Protein of *Rhipicephalus microplus* (BmVDAC) Binds To and Enhances the Activation of Plasminogen," *Acta Parasitologica*, 70(6). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11686-025-01135-7>.
25. Castellino, F.J. and McCance, S.G. (2007) "The Kringle Domains of Human Plasminogen," in, pp. 46–65. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470515457.ch4>.
26. Celkan, T. (2017) "Plasminogen deficiency," *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 43(1), pp. 132–138. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11239-016-1416-6>.
27. Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K.A. (2005) "Molecular mechanisms of fibrinolysis," *British Journal of Haematology*, 129(3), pp. 307–321. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>.
28. Chapin, J.C. and Hajjar, K.A. (2015) "Fibrinolysis and the control of blood coagulation.," *Blood reviews*, 29(1), pp. 17–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>.
29. Chauvin, A. *et al.* (2009) "Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission," *Veterinary Research*, 40(2), p. 37. Available at: <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>.
30. Christen, M.T. *et al.* (2010) "Human Plasminogen Kringle 3: Solution Structure, Functional Insights, Phylogenetic Landscape," *Biochemistry*, 49(33), pp. 7131–7150. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi100687f>.
31. Clinglobal (2023) *Rhipicephalus microplus* isolate: CVSA2018 Genome sequencing and assembly, Research and Development.
32. Coate, R. *et al.* (2023) "Testing Efficacy of a Conserved Polypeptide from the Bm86 Protein against *Rhipicephalus microplus* in the Mexican Tropics," *Vaccines*, 11(7), p. 1267. Available at: <https://doi.org/10.3390/vaccines11071267>.
33. Coleman, J.L. *et al.* (1997) "Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for Enhancement of Spirochetemia in Mice," *Cell*, 89(7), pp. 1111–1119. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80298-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80298-6).

34. Colombini, M. (1989) "Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC," *The Journal of Membrane Biology*, 111(2), pp. 103–111. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01871775>.
35. Corona, I. (2021) *Caracterización proteómica de la proteína VDAC de Rhipicephalus microplus durante la infección con Babesia Bigemina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
36. Dellas, C. and Loskutoff, D.J. (2005) "Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease," *Thrombosis and Haemostasis*, 93(04), pp. 631–640. Available at: <https://doi.org/10.1160/TH05-01-0033>.
37. Dermietzel, R. *et al.* (1994) "Cloning and in situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma membranes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), pp. 499–503. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.499>.
38. Dominguez, D., Torres, F. and Rosario, R. (2016) "Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México / Economic evaluation of tick (*Rhipicephalus microplus*) control in Mexico," *CIBA Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, 5(9), pp. 43–52.
39. Duboscq, C. (2017) "El sistema plasminógeno plasmina," *Servicio de Hematología y Hemoterapia*, 21, pp. 48–55.
40. Ferland, C. *et al.* (2004) "IL-16 Activates Plasminogen-Plasmin System and Promotes Human Eosinophil Migration into Extracellular Matrix via CCR3-Chemokine-Mediated Signaling and by Modulating CD4 Eosinophil Expression," *The Journal of Immunology*, 173(7), pp. 4417–4424. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4417>.
41. Ferreira, C. *et al.* (2002) "Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin," *Experimental Parasitology*, 101(1), pp. 25–34. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(02\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00032-2).
42. Figuera, L. *et al.* (2013) "Plasminogen binding proteins in secreted membrane vesicles of *Leishmania mexicana*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, 187(1), pp. 14–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.11.002>.
43. Fogaça, A. *et al.* (2004) "Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile," *Developmental & Comparative Immunology*, 28(3), pp. 191–200. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.08.001>.

44. Francischetti, I.M.B. *et al.* (2008) "An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), pp. 1-21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.009>.
45. Friedman, G.C. and Seeds, N.W. (1994) "Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system," *Developmental Brain Research*, 81(1), pp. 41-49. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90066-3).
46. Gasque, R. (2008) *Capítulo 4. Enfermedades de los bovinos*. Primera. Edited by U. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Enciclopedia Bovina.
47. Ghosh, A.K. *et al.* (2011) "*Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), pp. 17153-17158. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1103657108>.
48. Gonzalez-Gronow, M. *et al.* (2003) "The Voltage-dependent Anion Channel Is a Receptor for Plasminogen Kringle 5 on Human Endothelial Cells," *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), pp. 27312-27318. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M303172200>.
49. Gough, J.M. and Kemp, D.H. (1993) "Localization of a Low Abundance Membrane Protein (Bm86) on the Gut Cells of the Cattle Tick *Boophilus microplus* by Immunogold Labeling," *The Journal of Parasitology*, 79(6), p. 900. Available at: <https://doi.org/10.2307/3283728>.
50. Guerra, J. (2016) *Repensando la ganadería*. México, D.F.
51. Hernández-Aparicio, J.A. (2020) *Identificación de las proteínas que interaccionan con la proteína BmVDAC durante la infección de Rhipicephalus microplus con Babesia bigemina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
52. Hiller, S. *et al.* (2008) "Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles," *Science*, 321(5893), pp. 1206-1210. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1161302>.
53. Hiller, S. *et al.* (2010) "The 3D structures of VDAC represent a native conformation," *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), pp. 514-521. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.005>.
54. Hoylaerts, M. *et al.* (1982) "Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin," *The Journal of biological chemistry*, 257(6), pp. 2912-9.

55. Ismail, A.A., Shaker, B.T. and Bajou, K. (2021) "The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis," *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), p. 337. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23010337>.
56. J. Mosqueda *et al.* (2012) "Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis," *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), pp. 1504-1518. Available at: <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>.
57. Jablonka, W. *et al.* (2015) "Identification and Mechanistic Analysis of a Novel Tick-Derived Inhibitor of Thrombin," *PLOS ONE*, 10(8). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133991>.
58. Jia, N. *et al.* (2020) "Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities," *Cell*, 182(5), pp. 1328-1340.e13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>.
59. Jongejan, F. and Uilenberg, G. (2004) "The global importance of ticks," *Parasitology*, 129(S1), pp. S3-S14. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>.
60. Kotsyfakis, M. *et al.* (2015) "Deep Sequencing Analysis of the Ixodes ricinus Haemocyte," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), p. e0003754. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003754>.
61. Kuttler, K. (1988) *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. 1st ed. Edited by M. Ristic and J. Keire. United States of America: New York Academic Press.
62. De la Fuente, J. *et al.* (2007) "A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle," *Animal Health Research Reviews*, 8(1), pp. 23-28. Available at: <https://doi.org/10.1017/S1466252307001193>.
63. De la Fuente, J., Estrada-Peña, A. and Venzal, J. (2008) "Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals," *Front Biosci*, 13, pp. 6938-6946.
64. Lähdenmäki, K., Kuusela, P. and Korhonen, T.K. (2001) "Bacterial plasminogen activators and receptors," *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5), pp. 531-552. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00590.x>.
65. LAPISA (no date) *Bovimmune ixovac. la vacuna contra la garrapata.*, LAPISA.
66. Levine, N. (1971) "Taxonomy of the piroplasms," *Trans. Amer. Mic. Soc*, 90, pp. 2-33.
67. Liang, Y. and Bian, L. (2016) "Voltage-Dependent Anion Channel-1, a Possible Ligand of Plasminogen Kringle 5," *PLOS ONE*, 11(10), p. e0164834. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164834>.

68. Luna, A. (2019) *Identificación y caracterización molecular del gen de la enolasa de Babesia bigemina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
69. Luna, A. *et al.* (2025) "Babesia bigemina enolase binds to plasminogen and contains conserved B-cell epitopes that induce neutralizing antibodies in cattle," *Veterinary Parasitology*, 337, p. 110503. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2025.110503>.
70. Mahoney, D.F., Wright, I.G. and Mirre, G.B. (1973) "Bovine babesiasis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection," *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 67(2), pp. 197-203. Available at: <https://doi.org/10.1080/00034983.1973.11686877>.
71. Mallick, K. *et al.* (1987) "Report on the occurrence of haemoprotozoan infections in rural livestock.," *Ind J Parasitol*, 11, pp. 25-26.
72. Mazure, N.M. (2017) "VDAC in cancer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), pp. 665-673. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2017.03.002>.
73. Merino, O. *et al.* (2013) "Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection," *Vaccine*, 31(49), pp. 5889-5896. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.037>.
74. Messina, A. *et al.* (2012) "VDAC isoforms in mammals," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), pp. 1466-1476. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>.
75. Miller, R. *et al.* (2008) "Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* Acari: Ixodidae) collected in Mexico.," *J. Med. Entomol* , 45(5), pp. 905-911.
76. Montes-Farah, J. *et al.* (2020) "Coinfección de babesiosis y ehrlichiosis: un caso en Cartagena de indias, Colombia.," *Revista Ciencias Biomédicas*, 3(2), pp. 339-345.
77. Moon, J. *et al.* (1999) "Presence of a voltage-dependent anion channel 1 in the rat postsynaptic density fraction," *Molecular Neuroscience*, 10(3), pp. 443-447.
78. Mosnier, L.O. (2006) "Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities," *Frontiers in Bioscience*, 11(1), p. 2381. Available at: <https://doi.org/10.2741/1977>.
79. Mosqueda, J. *et al.* (2004) "Babesia bigemina sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus*

- ticks," *International Journal for Parasitology*, 34(11), pp. 1229–1236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.003>.
80. Naghdi, S. and Hajnóczy, G. (2016) "VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), pp. 2503–2514. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.020>.
 81. Nijhof, A.M. *et al.* (2010) "Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks," *International Journal for Parasitology*, 40(14), pp. 1587–1597. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.003>.
 82. Ning, L. *et al.* (2007) "[Immuno-proteomic screening of human pancreatic cancer associated membrane antigens for early diagnosis].," *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 45(1), pp. 34–8.
 83. NJ Health (2022) *Enfermedades causadas por garrapatas*, Communicable Disease Service.
 84. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2021) *Bovine Babesiosis*.
 85. Ortega-Sánchez, R. *et al.* (2020) "Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle," *Vaccine*, 38(19), pp. 3618–3625. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.040>.
 86. Pal, U. *et al.* (2004) "TROSPA, an *Ixodes scapularis* Receptor for *Borrelia burgdorferi*," *Cell*, 119(4), pp. 457–468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.027>.
 87. Parola, P. and Raoult, D. (2001) "Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat," *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), pp. 897–928. Available at: <https://doi.org/10.1086/319347>.
 88. Pastorino, J.G. and Hoek, J.B. (2008) "Regulation of hexokinase binding to VDAC," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), pp. 171–182. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9148-8>.
 89. Petrih, R. (2010). *Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina*. Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor. Universidad de Buenos Aires.
 90. De Pinto, V., Guarino, F., *et al.* (2010) "Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3?," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6–7), pp. 1268–1275. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.031>.

91. De Pinto, V., Messina, A., *et al.* (2010a) "Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane," *FEBS Letters*, 584(9), pp. 1793–1799. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.049>.
92. De Pinto, V., Messina, A., *et al.* (2010b) "Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane," *FEBS Letters*, 584(9), pp. 1793–1799. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.049>.
93. Puchelle, E. *et al.* (1993) "Studies on Human Porin. IX. Immunolocalization of Porin and CFTR Channels in Human Surface Respiratory Epithelium," *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 374(1–6), pp. 297–304. Available at: <https://doi.org/10.1515/bchm3.1993.374.1-6.297>.
94. Rachinsky, A., Guerrero, F.D. and Scoles, G.A. (2007) "Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), pp. 1291–1308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.08.001>.
95. de Rezende, J. *et al.* (2015) "In vitro cultivation and cryopreservation of Babesia bigemina sporokinets in hemocytes of Rhipicephalus microplus," *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), pp. 400–403. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.008>.
96. Rijken, D.C. and Lijnen, H.R. (2009) "New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), pp. 4–13. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x>.
97. Rodrigues, D. *et al.* (2015) *Aplicação de carrapaticida em bovinos*. Nova Odessa.
98. Rodríguez-Hernández, E. *et al.* (2012) "The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of Babesia bigemina sexual stages with Rhipicephalus microplus midgut cells," *Veterinary Parasitology*, 187(3–4), pp. 538–541. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.028>.
99. Rodríguez-Hernández, E. *et al.* (2015) "BmVDAC upregulation in the midgut of Rhipicephalus microplus, during infection with Babesia bigemina," *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), pp. 368–374. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.016>.
100. Rodríguez-Vivas, R., Ojeda, M. and Rosado, J. (2011) "Epidemiología y control de Rhipicephalus (Boophilus) microplus en México," in H. Quiroz *et al.* (eds.) *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Mexico: UNAM, pp. 477–504.

101. Rodríguez-Vivas, R.I. *et al.* (2006) "Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico," *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), pp. 335–342. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>.
102. Rodríguez-Vivas, R.I. *et al.* (2016) "Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico," *Veterinary Parasitology*, 215, pp. 106–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.010>.
103. Rodríguez-Vivas, R.I. *et al.* (2017) "Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review," *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), pp. 61–74. Available at: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>.
104. Rodríguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N. and Bhushan, C. (2018) "Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance," *Parasitology Research*, 117(1), pp. 3–29. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>.
105. Roman, I. *et al.* (2006) "Hunting Interactomes of a Membrane Protein," *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(9), pp. 1667–1680. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.T600009-MCP200>.
106. Rosario-Cruz, R. (2009) "Genetic basis and impact of tick acaricide resistance," *Frontiers in Bioscience*, Volume(14), p. 2657. Available at: <https://doi.org/10.2741/3403>.
107. Rostovtseva, T. and Colombini, M. (1996) "ATP Flux Is Controlled by a Voltage-gated Channel from the Mitochondrial Outer Membrane," *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), pp. 28006–28008. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28006>.
108. Roush, R. (1993) "Occurrence, genetics and management of insecticide resistance," *Parasitol*, 9, pp. 174–179.
109. Saccone, C. *et al.* (2003) "Molecular Clock and Gene Function," *Journal of Molecular Evolution*, 57(S1), pp. S277–S285. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0037-9>.
110. Schaller, J. and Gerber, S.S. (2011) "The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects," *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(5), pp. 785–801. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0566-5>.
111. Schein, S.J., Colombini, M. and Finkelstein, A. (1976) "Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria," *The Journal of Membrane Biology*, 30(1), pp. 99–120. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01869662>.

112. Servicio Nacional de Sanidad, I. y C.A. (SENASICA) (2025) *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp., Dirección de Campañas Zoonositarias.*
113. Shoshan-Barmatz, V. and Gincel, D. (2003) "The Voltage-Dependent Anion Channel: Characterization, Modulation, and Role in Mitochondrial Function in Cell Life and Death," *Cell Biochemistry and Biophysics*, 39(3), pp. 279–292. Available at: <https://doi.org/10.1385/CBB:39:3:279>.
114. da Silva Oliveira, G.L. and de Freitas, R.M. (2015) "Diminazene aceturate – An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics," *Pharmacological Research*, 102, pp. 138–157. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.005>.
115. Sonenshine, D.E. (1991) *Biology of Ticks, volumes 1 & 2*. New York, United States of America: Oxford University Press.
116. Stepanova, V. *et al.* (2016) "Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Promotes Angiogenesis by Attenuating Proline-rich Homeodomain Protein (PRH) Transcription Factor Activity and De-repressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Expression," *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), pp. 15029–15045. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678490>.
117. Varughese, J.T., Buchanan, S.K. and Pitt, A.S. (2021) "The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease," *Cells*, 10(7), p. 1737. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10071737>.
118. Villar, M. *et al.* (2015) "Integrated Metabolomics, Transcriptomics and Proteomics Identifies Metabolic Pathways Affected by Anaplasma phagocytophilum Infection in Tick Cells*," *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(12), pp. 3154–3172. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.051938>.
119. Whyte, C.S. (2023) "All tangled up: interactions of the fibrinolytic and innate immune systems," *Frontiers in Medicine*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1212201>.
120. Xu, X.-L., Cheng, T.-Y. and Yang, H. (2016) "Enolase, a plasminogen receptor isolated from salivary gland transcriptome of the ixodid tick Haemaphysalis flava," *Parasitology Research*, 115(5), pp. 1955–1964. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4938-0>.
121. Zamarron, C., Lijnen, H.R. and Collen, D. (1984) "Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator.," *The Journal of biological chemistry*, 259(4), pp. 2080–3.



The VDAC Protein of *Rhipicephalus microplus* (BmVDAC) Binds To and Enhances the Activation of Plasminogen

Elizabeth J. Castañeda-Ortiz¹ · Mariana Amaro-Ibarra¹ · Marcos Morales-Reyna¹ · Ivan Corona-Guerrero^{1,2} · María E. Álvarez-Sánchez¹ · Juan Mosqueda^{2,3} · Minerva Camacho-Nuez¹

Received: 3 July 2025 / Accepted: 26 August 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2025

Abstract

Purpose *Rhipicephalus microplus* is a bovine ectoparasite that causes economic losses due to direct damage to the host, the cost of treatments, and the transmission of diverse pathogens. We have previously identified the protein VDAC (BmVDAC) from the midgut of *R. microplus*. Furthermore, we demonstrated the efficacy of BmVDAC in a bovine vaccination trial. Additionally, BmVDAC interacts with the sexual stages of *Babesia bigemina*, and its expression increases in ticks during infection with the parasite. Hence, we are interested in studying the function of this protein.

Methods Molecular docking was used to predict that BmVDAC binds to the Kringle 5 (K5) domain of plasminogen, ligand blotting techniques, and inhibition of binding assays with the lysine analog εACA were performed to demonstrate the specificity of the binding.

Results The docking analysis predicted the binding of the BmVDAC to the K5 domain, with a lysine participating in this interaction. The ligand blotting and inhibition assays demonstrated the specificity of the binding of the two proteins. Additionally, the results of a plasminogen activation assay showed that BmVDAC increases plasminogen activation.

Conclusion This is the first report of a VDAC protein from a nonmammalian organism that interacts with and enhances the activation of plasminogen. The results indicate that the binding of the two proteins is specific, and the binding of BmVDAC promotes the conversion of plasminogen into active plasmin.

Keywords *Rhipicephalus microplus* · Mitochondrial porin VDAC · Plasminogen binding

Introduction

Ticks are obligate hematophagous arthropod parasites found in tropical and subtropical regions worldwide [1]. They are the second most common vector after mosquitoes [2], which are major transmitters of pathogens to humans and animals. *Rhipicephalus microplus* infestations significantly threaten the livestock industry worldwide, especially in tropical and subtropical regions [3, 4], distributed in Africa, North America, South America, and Asia [5]. This ectoparasite can harm cattle directly by causing severe infestations and indirectly by transmitting multiple pathogens. Mexico has a suitable climate for the optimal development and completion of this tick's life cycle; for this reason, the livestock industry faces a complex challenge in controlling tick infestations and the pathogens they transmit. Over 24 million cattle are estimated to be at risk of tick infestation in this country, causing economic losses of more than 500 million USD annually in the meat, dairy, leather, and husbandry

Elizabeth J. Castañeda-Ortiz and Mariana Amaro-Ibarra made equal contributions.

✉ Minerva Camacho-Nuez
minerva.camacho.nuez@uacm.edu.mx

¹ Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo Núm. 290, esquina Roberto Gayol, colonia del Valle Sur, Alcaldía Benito Juárez, C.P. 03100 Mexico, Mexico

² Immunology and Vaccines Laboratory, C. A. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños, 76140 Queretaro, Mexico

³ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. de las Ciencias s/n, Col Juriquilla, C.P. 76230 Queretaro, Mexico

Babesia bigemina enolase binds to plasminogen and contains conserved B-cell epitopes that induce neutralizing antibodies in cattle

Luna-Rodríguez Ana Laura ^a✉, Mosqueda Juan ^b✉, Castañeda-Ortiz Elizabeth Jacqueline ^a✉, Amaro-Ibarra Mariana ^a✉, Cárdenas-Flores Alma ^b✉, De La Cruz González Valeria Guadalupe ^b✉, Álvarez-Sánchez María Elizabeth ^a✉, Camacho-Nuez Minerva ^a✉

Show more ▼

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2025.110503>

[Get rights and content](#)

Referred to by [Corrigendum to “*Babesia bigemina* enolase binds to plasminogen and contains conserved B-cell epitopes that induce neutralizing antibodies i...](#)

Veterinary Parasitology, Volume 337, July 2025, Pages 110513

Luna-Rodríguez Ana Laura, Mosqueda Juan, Castañeda-Ortiz Elizabeth Jacqueline, Amaro-Ibarra Mariana, Cárdenas-Flores Alma, De La Cruz González Valeria Guadalupe, Álvarez-Sánchez María Elizabeth, Camacho-Nuez Minerva

 [View PDF](#)

Highlights

- The *B. bigemina* enolase gene is highly conserved in apicomplexan parasites.
- The *BhiEno* gene is expressed in the sexual and asexual phase of the



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



LMVZ
LICENCIATURA EN
MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: Mariana Amaro Ibarra

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

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



Mtra. Kruskaia Karenia Caltzontzin
Fernández
SECRETARIA ACADÉMICA
FCN



Dr. José Guadalupe Gómez Soto
DIRECTOR
FCN



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



UAQ | CRECER EN LA DIVERSIDAD





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



LMVZ
LICENCIATURA EN
MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A: Mariana Amaro Ibarra

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

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

Mtra. Kruskaia Karenia Caltzontzin
Fernández
SECRETARIA ACADÉMICA
FCN

Dr. José Guadalupe Gómez Soto
DIRECTOR
FCN

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



UAQ | CRECER EN LA DIVERSIDAD

