

# Caracterización de acuaporinas de garrapata como posibles antígenos protectores frente a vectores artrópodos

Trabajo Fin de Máster presentado por:

**Marinela Contreras Rojo**

Trabajo dirigido por:

**Dr. José de la Fuente García**

**Dr. Juan A. Moreno-Cid Mora**



**Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada  
en Recursos Cinegéticos, Curso 2012-2013**

## Indice

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1. <i>Problema infestación e infección por garrapata</i> .....	3
1.2. <i>Sistemas de control inmunológico</i> .....	3
1.3. <i>Acuaporina</i> .....	4
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	7
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	8
2.1 <i>Medios</i> .....	8
2.3 <i>Acuaporina de Ixodes</i> .....	9
2.4 <i>Clonaje y expresión en Escherichia coli</i> .....	10
2.4.1 <i>Clonaje en el vector de expresión pET101/D-TOPO</i> .....	10
2.5 <i>Transformación de la cepa One Shot TOP10 de E. coli</i> .....	12
2.5.1 <i>Expresión de las proteínas recombinantes</i> .....	12
2.5.2 <i>Recuperación y purificación de las proteínas recombinantes</i> .....	13
2.6 <i>Análisis de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE Gel y Western Blot</i> .....	14
2.7 <i>Cuantificación de proteínas</i> .....	14
2.8 <i>Producción de anticuerpos policlonales en ratón</i> .....	15
2.9 <i>Purificación de anticuerpos</i> .....	15
2.10 <i>Prueba de exclusión de la viabilidad celular con azul tripán</i> .....	16
<b>3. Resultados</b> .....	17
3.1 <i>Alineamientos secuencias acuaporinas</i> .....	17
3.2 <i>Acuaporina de la especie Ixodes</i> .....	18
3.3 <i>Clonaje y expresión de acuaporinas del género Ixodes</i> .....	20
3.4 <i>Producción de anticuerpos en ratón</i> .....	21
3.5 <i>Estudio in vitro de viabilidad celular</i> .....	22
4.1 <i>Alineamientos secuencias acuaporinas</i> .....	24
4.2 <i>Expresión de acuaporina recombinante de Ixodes</i> .....	24
4.3 <i>Producción de anticuerpos</i> .....	25
4.4 <i>Efecto de anticuerpos en células de Ixodes</i> .....	25
<b>5. Conclusiones</b> .....	26

## **RESUMEN**

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados que actúan como vectores de enfermedades transmitidas al hombre y los animales. El control inmunológico mediante vacunas se está utilizando como alternativa al uso de acaricidas. Las únicas vacunas comerciales frente a garrapatas hasta la fecha son Gavac<sup>®</sup> y TickGARD<sup>®</sup>. Las garrapatas se someten a un elevado estrés osmoregulatorio ya que toman hasta 100 veces su peso corporal en sangre; por tanto, los canales de agua o acuaporinas, que participan en este transporte de agua podrían ser buenos objetivos para el desarrollo de vacunas utilizando como diana proteínas de función biológica importante y altamente conservadas. Para ello, se alinearon las secuencias que codificaban para acuaporinas de diferentes especies de garrapata y definieron las regiones homólogas y expuestas en membrana mediante herramientas bioinformáticas. Se seleccionaron las secuencias de las acuaporinas de las garrapatas *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus* (rAQPSIxs y rAQPSIxr) que se amplificaron y posteriormente se expresaron en *E. coli*. Se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de anticuerpos frente acuaporina sobre células de garrapata del género *Ixodes*. Los resultados preliminares obtenidos en el ensayo *in vitro* mostraron un efecto significativo de anticuerpos frente acuaporina de *Ixodes* sobre células de la especie *I. scapularis*. En este estudio se presenta una aproximación del efecto protector de AQPS sobre de artrópodos. Para determinar si las AQPS son o no buenos candidatos a antígenos protectores frente garrapatas se sugieren más estudios, como ensayos *in vivo* para evaluar el efecto de la acuaporina recombinante sobre garrapatas.

**PALABRAS CLAVE:** Vacuna, acuaporina, antígeno, garrapata.

## **1. Introducción**

### **1.1. Problema infestación e infección por garrapata**

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de hospedadores vertebrados. En muchas regiones del mundo las garrapatas son los vectores más importantes de enfermedades transmitidas al hombre y los animales (Pagel Van Zee et al., 2007; Jongejan and Uilenberg, 2004; de la Fuente et al., 2008).

El método de control de garrapatas más extendido es el uso de químicos mediante la aplicación de acaricidas (Graf et al., 2004). Sin embargo, el uso de acaricidas tiene como inconvenientes altos costes, generación de residuos y desarrollo de quimiorresistencia en el ácaro (Graf et al., 2004).

Como estrategias de control alternativas al uso de químicos se ha establecido el manejo hospedadores con resistencia natural a garrapatas, señuelos impregnados con feromonas para atraer y matar a las garrapatas, agentes de control biológico y como alternativa en auge el control inmunológico mediante vacunas (de la Fuente and Kocan 2006; Sonenshine et al., 2006; Willadsen, 2006).

### **1.2. Sistemas de control inmunológico**

A principios de 1990, fueron desarrolladas y comercializadas vacunas inductoras de protección inmunológica contra infestaciones de garrapatas en hospedadores vertebrados. Las únicas vacunas comerciales frente a garrapatas hasta la fecha, Gavac<sup>®</sup> y TickGARD<sup>®</sup>, están basadas en el antígeno intestinal Bm86 recombinante de la especie de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Willadsen et al., 1989; Rand et al., 1989; Rodríguez et al., 2004; de la Fuente and Kocan, 2003; de la Fuente et al., 2007).

Los ensayos de vacunación han demostrado la capacidad protectora frente a las infestaciones por garrapatas por reducción en el número de hembras repletas, peso, y capacidad reproductiva, logrando una protección progresiva en el control de consecutivas generaciones. Los ensayos de campo han demostrado que el control inmunológico de garrapatas por vacunación tiene las ventajas de económico, ambientalmente amigable y no desarrolla de garrapatas resistentes como la aplicación repetida acaricidas (de la Fuente et al., 1998, 2007; de la Fuente and Kocan, 2003).

Además, la vacunación puede prevenir o reducir la transmisión de patógenos mediante la reducción de las poblaciones de garrapatas y su capacidad como vector (de la Fuente et al., 1998, 2007; Rodríguez Valle et al., 2004; Merino et al., 2013).

Sin embargo, las vacunas basadas en Bm86 en su mayoría solo tienen efecto de control frente a garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus)*, con poca o ninguna eficacia frente a otras especies de garrapatas (de la Fuente and Kocan, 2006; Fragoso et al., 1998; García-García et al., 1999, 2000; de la Fuente et al., 1999, 2000a, 2000b; de Vos et al., 2001; Sossai et al., 2005; Canales et al., 2009). Debido a esta limitante, es necesario la identificación y el desarrollo de nuevos antígenos protectores frente a un amplio rango de especies (de la Fuente and Kocan, 2003, 2006; Sonenshine et al., 2006; Willadsen, 2006).

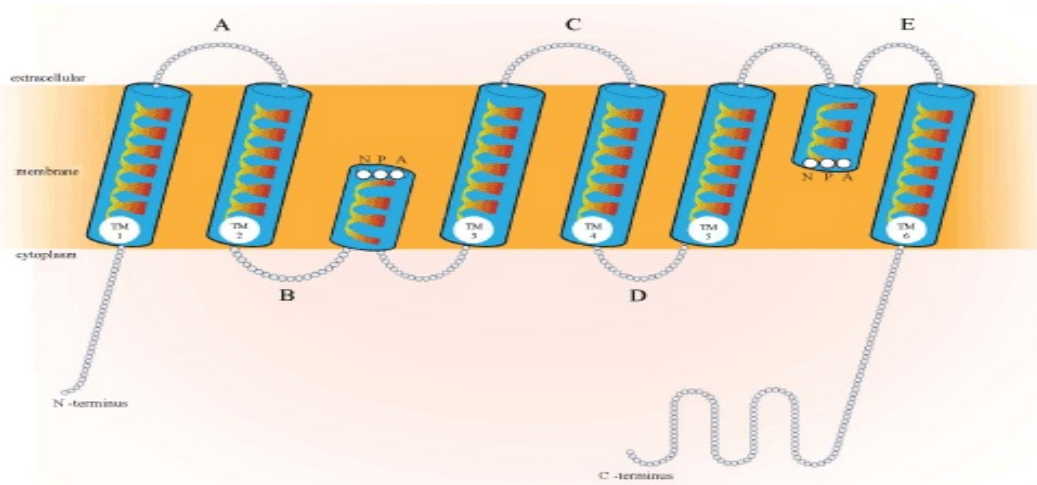
Se ha postulado que antígenos altamente conservados y con una función biológica importante son determinantes para desarrollar inmunógenos potencialmente protectores (López et al., 2007).

### **1.3. Acuaporina**

Las acuaporinas (AQPs) son proteínas integrales de membrana, que pertenecen a la familia de proteínas MIP (major intrinsic proteins), forman canales que median el movimiento pasivo de agua y pequeños solutos a través de membranas. Están ampliamente distribuidas, se producen en la mayoría de seres vivos (Engel and Stahlberg, 2002; Verkman, 2011). Las proteínas MIP se han clasificado tradicionalmente en dos categorías generales basadas en selectividad de sustrato: las acuaporinas, que son selectivamente permeables al agua, y las acuagliceroporinas (GLPs), que son permeables al agua y solutos múltiples tales como glicerol y urea. Algunas MIP también pueden transportar amoníaco, aniones y, posiblemente, dióxido de carbono (King et al., 2004 and Rojek et al., 2008).

Estas proteínas formadoras de canales transmembrana son ubicuas y altamente conservadas a lo largo de todos los taxones (vertebrados, invertebrados, plantas, hongos y bacterias). Los canales se caracterizan por una estructura homotetramérica; cada monómero (28 kDa, aproximadamente) contiene seis hélices transmembrana con cinco bucles de conexión (A-E). Los bucles B y D y los N- y C-terminales son citoplasmáticos como se muestra en la figura 1. Los bucles hidrofóbicos B (citoplasmático) y E (extracelular) se pliegan desde direcciones opuestas y forman un poro situado a

profundidad media en la bicapa lipídica. La simetría invertida de los motivos conservados (NPA) en los bucles B y E crea un canal (20Å de largo, aproximadamente.) y un poro acuoso (~ 2.8Å de diámetro, aproximadamente) del tamaño de una molécula de agua. Este poro en la bicapa lipídica, permite el paso bidireccional de agua y pequeñas moléculas neutras. En el caso de canales específicos de agua, ni protones ni moléculas cargadas pasarán a través del poro debido a una zona filtrante de aminoácido cargado cerca de la región del poro (Reizer et al., 1993). Las mitades terminales amino y carboxilo de la proteína están relacionadas en la secuencia, con una homología del 20% de aminoácidos (Wistow et al., 1991).



**Fig. 1.** Un modelo de topología de membrana esquemática de una subunidad típica acuaporina. El modelo representa los seis dominios transmembrana (TM) 1-6, los cinco bucles intracelulares y extracelulares AE, los motivos conservados NPA sobre los bucles B y E a mitad de camino en la bicapa lipídica de la membrana, y las C-y N-terminales citoplasmáticas.

Los miembros de esta familia de proteínas no sólo están involucradas en el transporte de agua y solutos neutros pequeños, también están implicados en un número de procesos fisiológicos no relacionados y funciones tales como el metabolismo de lípidos, la migración celular, la adhesión celular, la biología epidérmica y la transducción de señal neural (Verkman, 2005).

Los artrópodos se caracterizan por adaptarse a condiciones ambientales extremas, como bajas temperaturas y desecación (Campbell et al., 2008; Spring et al., 2009). Las acuaporinas específicas del agua juegan un papel fundamental en este tipo de adaptaciones. Estos canales transmembrana, que son en gran medida importantes para la

homeostasis del agua y la crioprotección, se detectan en órganos y tejidos como el tracto digestivo , los túbulos de Malpighi y también en las glándulas salivales.

Las garrapatas se someten a una elevada tensión osmoregulatoria ya que toman hasta 100 veces su peso corporal en sangre, devolviendo aproximadamente el 75% del agua ingerida y los iones a través de la saliva al huésped. Por tanto, los canales de agua o acuaporinas, que participan en este transporte de agua en masa podrían ser buenos objetivos para el desarrollo de vacunas basada en proteínas de función biológica importante (Sauer and Hair, 1972 ; Kaufman and Phillips, 1973).

En este trabajo, se ha seleccionado la acuaporina como proteína candidata a antígeno protector frente garrapatas, basándonos en su alta conservación entre diferentes especies y con una función biológica importante en el artrópodo.

## **Hipótesis y objetivos**

### ***HIPÓTESIS.***

Utilizando una acuaporina de garrapata como antígeno, es posible el desarrollo de una vacuna para control inmunológico, basada en una proteína altamente conservada y con función biológica importante.

### ***OBJETIVOS.***

Los objetivos de este estudio serán:

- Identificar AQPS de garrapatas, alinear las secuencias y definir las regiones homólogas y expuestas en membrana entre las diferentes especies mediante herramientas bioinformáticas.
- Expresar y producir las AQPS seleccionadas a partir de material genético del género *Ixodes*, utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión de proteínas heterólogas.
- Evaluar el efecto de anticuerpos frente AQPS en ensayo *in vitro* con células de garrapata.



## 2. *Materiales y métodos*

### 2.1 *Medios*

Las composiciones de los medios y soluciones empleados fueron las siguientes:

- Medio de cultivo para propagación y crecimiento de *E. coli* (**LB-Amp**): LB Broth:  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y ampicilina:  $0,05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Placas LB-Agar-Amp-XGal-IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)  $0.1\text{M}$ , 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal):  $0.05\text{M}$  y ampicilina  $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Solución Tampón Fosfato (**PBS**):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ :  $0.31\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaHPO}_4$ :  $6.72\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{NaCl}$ :  $5.78\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.3
- Tampón de transferencia electroforética: Metanol: 20% v/v, Trizma- Base:  $3.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y Glicina:  $14.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Solución Tampón Tris (**TBS**): Trizma- Base  $12.11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{NaCl}$ :  $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.5
- Tampón de unión /lisis para purificación proteínas en condiciones desnaturalizantes:  
urea: 7 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.1 M; Tris·Cl: 0.01 M; pH 8.0
- Tampón de lavado para purificación proteínas en condiciones desnaturalizantes:  
Urea 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M; Tris·Cl 0.01 M; pH 6.3
- Tampón de elución para purificación proteínas en condiciones desnaturalizantes:  
Urea 8 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M; Tris·Cl 0.01 M; pH 4.5
- Tampón de unión A para purificación anticuerpos : Glicina/ $\text{NaOH}$  1.5 M,  $\text{NaCl}$  3 M, pH 9.0
- Tampón de elución B2 para purificación anticuerpos : Glicina/ $\text{HCl}$  0.2 M, pH 2.5
- Tampón de neutralización C para purificación anticuerpos: Tris/ $\text{HCl}$  1 M, pH 9.0

## **2.2 Análisis de secuencias de acuaporina de garrapata.**

Se realizó una búsqueda en la base de datos del Centro Nacional de Información Sobre Biotecnología, (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para obtener las secuencias codificantes de acuaporina de garrapata.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal W con secuencias de acuaporinas de distintas especies de garrapatas: *Amblyomma maculatum* (gi|346473599|gb|AEO36644.1) ; *Amblyomma variegatum* (gi|325303036|tpg|DAA34147.1) ; *Ixodes ricinus* (gi|240247710|emb|CAX48964.1); *Dermacentor variabilis* (gi|114153752| gb|ABI53034.1); *Rhipicephalus sanguineus* (gi|219932449|emb |CAR66115.1); *Rhipicephalus pulchellus* (gi|427789931|gb|JAA60417.1) ; *Ixodes scapularis* (gi|215495159|gb|EEC04800.1|;gi|215510626|gb|EEC20079.1|;gi|215506338|gb|EEC15832.1|;gi|215495157|gb|EEC04798.1|;gi|241778866|ref|XP\_002399794.1| ; gi|241674945|ref|XP\_002400655.1|; gi|241176311|ref|XP\_002399532.1| ; gi|241176307|ref|XP\_002399530.1| ). Una vez alineadas las secuencias se buscaron los dominios conservados entre las secuencias y se generó un árbol filogenético entre las proteínas. Para identificar la región expuesta y secuencia funcional se analizó la estructura utilizando el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001).

## **2.3 Acuaporina de Ixodes.**

La secuencia que codifica acuaporina de garrapata del género *Ixodes* se amplificó utilizando como material de partida ARN de las especies *Ixodes scapularis* (número de acceso Gen-Bank: XM\_002399490.1) e *I. ricinus* (número de acceso Gen-Bank: FN178519.1). Se extrajo ARN de tejidos homogeneizados de las garrapatas *I. scapularis* e *I. ricinus*, por separado, utilizando el kit comercial TRI Reagent® (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de este ARN se sintetizó ADN copia (ADNc) utilizando el kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA.*). Cada reacción se hizo en un volumen de 20 µl (4µl de tampón de reacción 5x ,1 µl de transcriptasa reversa iScript ,1

μl de RNA molde y 14 μl de agua libre de nucleasas) en un termociclador Veritti Applied Biosystem™. Las condiciones de la reacción se indican en la tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones reacción de síntesis de ADNc.

Tiempo (mins)	Temperatura (°C)
5	25
30	42
5	85
∞	4

## 2.4 Clonaje y expresión en *Escherichia coli*.

### 2.4.1 Clonaje en el vector de expresión pET101/D-TOPO.

Se diseñaron los cebadores específicos a partir de las secuencias que codifican las proteínas rAQPSIxs y rAQPSIxR para amplificar por PCR la secuencia de interés completa y posterior clonaje en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Tabla 1). Para la PCR se utilizó el Sistema GoTaq® (PROMEGA™) y como material genético molde se utilizó el ADNc. Cada reacción se hizo en un volumen de 50 μl (MgSO<sub>4</sub> 1.5 mM, tampón de reacción 5X, dNTPs 0.2 mM, 10 pmol de cada cebador, 1 μL de ADN y 1 U/μl de polimerasa GoTaq, Promega) en un termociclador Veritti Applied Biosystem™. Las condiciones de la PCR fueron:

- 1) 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos.
- 2) 35 ciclos:
  - a. Desnaturalización del ADN molde: 95 °C durante 30 segundos
  - b. Unión de los cebadores al ADN molde: T<sup>a</sup> *annealing* específica a cada secuencia durante 60 segundos.
  - c. Extensión de la nueva secuencia de ADN: 72°C durante 60 segundos.
- 3) 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos: extensión final.
- 4) 4°C: tiempo ilimitado.

**Tabla 2.** Diseño de los cebadores específicos y condiciones de la PCR para la amplificación de las secuencias de interés y posterior clonación en pET101/D-TOPO.

<b>Proteína</b>	<b>Secuencias de cebadores sentido/antisentido complementario</b>	<b>T<sup>a</sup> annealing (°C)</b>	<b>Talla esperada (bp)</b>
<b>rAQPSIxs</b>	<i>Sentido:</i> 5'-CACCATGCAGCTTTTCGGCAACACC-3' <i>Antisentido:</i> 5'-ACAGACGTGGTTGACGGGTAT-3'	60°C	801
<b>rAQPSIx r</b>	<i>Sentido:</i> 5'-CACCATGCAGCTTTTCGGCAACACAG-3' <i>Antisentido:</i> 5'-GGGTATGGCTCCTGTGTACCC-3'	54°C	798

Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit GenClean III (*MP Biomedicals*, Solon, Ohio).

Las secuencias producto de PCR purificadas se clonaron en el vector de expresión pET101/D-TOPO (*Invitrogen Life Technologies*). Se incubó cada fragmento de ADN en la mezcla de reacción de clonación: 1 µl solución salina, vector pET101/D-TOPO a una relación molar 2:1 con respecto al producto de PCR y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 6 µl, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

## **2.5 Transformación de la cepa One Shot TOP10 de *E. coli*.**

El producto de reacción de clonación se utilizó para transformar por choque térmico cepas quimiocompetentes One Shot TOP10<sup>®</sup> de *E. coli*.

Se inocularon placas LB agar con 150  $\mu$ L de transformantes y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se hizo un análisis de transformantes positivos seleccionando 5 colonias de cada cepa, resuspendidas por separado en 12  $\mu$ l de agua estéril. El análisis se hizo mediante PCR con 10  $\mu$ l de la resuspensión como ADN molde hasta un volumen de reacción de 25  $\mu$ l de la mezcla por el Sistema *GoTaq*<sup>®</sup> (*Promega*<sup>™</sup>), con los 2  $\mu$ l restantes se inoculó una placa dividida en celdas, una por transformante, como stock de cada clon seleccionado. Los clones amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Las colonias positivas se inocularon en 3 ml de medio LB-Amp y se crecieron a 37°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital termostataado *Thermoshake* (*Gerhardt Laboshake*) durante un periodo de 12 a 14 horas. El ADN plasmídico se recuperó y purificó del cultivo utilizando el sistema *GenJet*<sup>™</sup> *Plasmid Miniprep* (*Fermentas, Rockford, IL, USA*).

### **2.5.1 Expresión de las proteínas recombinantes.**

Para la expresión de las proteínas heterólogas se transformaron por choque térmico las cepas quimiocompetentes BL21 Star<sup>™</sup>(DE3) de *E. coli* con 15ng del ADN plasmídico. Las reacciones de transformación completas se inocularon en 10 ml de medio LB-Amp y glucosa 1% w/v y se crecieron a 37°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital termostataado *Thermoshake* (*Gerhardt Laboshake*) durante un periodo de 12 a 14 horas.

Para propagar las células transformadas, se inocularon 2ml del medio de cultivo en 50 ml de medio LB-Amp con un agitación de 200 rpm y 37°C, hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> = 0.8 para inducir la expresión por adición de IPTG hasta una concentración final de 0.1M, después el cultivo se mantuvo creciendo durante cuatro horas.

### ***2.5.2 Recuperación y purificación de las proteínas recombinantes.***

Para separar la fracción de células el medio de cultivo se centrifugó a  $3500 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

La fracción celular se sometió a ruptura mecánica por sonicación en condiciones desnaturalizantes para recuperar las proteínas. Para ello, la fracción celular se resuspendió en tampón de lisis en una relación de 0.2mg de células por 1ml de solución, y se sometió a ultrasonidos utilizando un sonicador Sonopuls Bandelin (Bandelin Electronic, Berlin, Alemania), con ciclos de 10 minutos, una frecuencia de 20 kHz, una potencia de 70 kW e inmerso en hielo. El lisado celular se recuperó por centrifugación a  $21000 \times g$  y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

Las proteínas recombinantes se purificaron del lisado celular mediante cromatografía por afinidad a Niquel. Se utilizaron columnas con relleno de Ni-NTA Qiagen®(Qiagen, CA, USA) para la purificación de proteínas con capacidad de unión a ligandos específicos por presentar colas de Histidina.

Las etapas de purificación por afinidad a Ni-NTA empleando columnas de Qiagen® fue:

- 1) Se equilibraron las columnas con 600  $\mu\text{l}$  de tampón de unión (7M Urea pH 8.0). Se centrifugaron durante 2 minutos a 800 rpm.
- 2) Se cargaron 600  $\mu\text{l}$  de lisado. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1600 rpm a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Se realizó un lavado con 600  $\mu\text{l}$  del tampón de lavado( 8M Urea, pH 6.3). Se centrifugaron durante 2 minutos a 2900 rpm. Los lavados se hicieron por duplicado.
- 4) Las fracciones retenidas en la columna se eluyeron dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de elución (8M Urea, pH 4.5) y centrifugando durante 2 minutos a 1600 rpm.

Los eluatos se dializaron contra 20 volúmenes de PBS pH 7.4 durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , para reducir la alta concentración de sales de la solución tampón en condiciones desnaturalizantes y neutralizar el pH ácido de las condiciones de elución.

## **2.6 Análisis de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE Gel y Western Blot.**

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 12 % *PAGEgel*<sup>TM</sup> (*PAGEgel Inc., San Diego, CA, E.U.*) en condiciones desnaturizantes. Las bandas se visualizaron empleando tinción con *Coomassie Brilliant Blue R250*. Las muestras se trataron con DTT como agente reductor (*PAGE-gel Inc.*), se calentaron durante 5 minutos en un baño a 100°C antes de ser cargadas en el gel, y separarse por electroforesis durante aproximadamente 55 minutos a corriente constante de 180 V y una intensidad de 90 mA.

Las proteínas resueltas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *PROTRAN BA85 (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania)* en una unidad de transferencia semi-seca *Minie-Genie Electrobloetter (Idea Scientific, Corvallis, OR, USA)*, siguiendo las instrucciones del fabricante para luego ser analizadas por *Western Blot*. Las membranas se bloquearon con una solución de leche desnatada al 5% (p/v) durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces en solución tampón TBS y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos purificados de ratones inmunizados. Las membranas se lavaron tres veces con solución tampón TBS y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) diluido 1:1000 en TBS. Se trataron las membranas con 10 lavados de un minuto cada uno y se revelaron con TMB (*Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase – Promega, Madison, WI, USA*).

## **2.7 Cuantificación de proteínas.**

La concentración de proteínas totales de todas las fracciones del estudio se determinaron por el método del Ácido Bicinconínico (BCA), *Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL)* utilizando suero de albúmina (BSA) como estándar. La determinación de proteína específica se determinó por análisis de la imagen del gel teñido por *Coomassie Brilliante Blue R250* mediante densitometría.

## ***2.8 Producción de anticuerpos policlonales en ratón.***

Se formularon vacunas con el antígeno rAQPSIxr como emulsión agua en aceite, utilizando Montanide ISA V-50 como adyuvante mineral en una proporción 50/50% v/v.

Dos grupos de 5 ratones CD-1 cada uno, de fueron inmunizados vía intraperitoneal con tres dosis (semanas 0, 3 y 5) de 25µg/dosis de rAQPSIxr y solución salina como grupo control, respectivamente. Se incluyó un tercer grupo de 5 ratones sin inmunizar para obtener suero pre inmune. Una semana después de la última inmunización, en la semana 6, se extrajo sangre, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, se desechó el coágulo resultante y se recuperó un promedio de 500 µl de suero por ratón. Los sueros se almacenaron a 4°C.

## ***2.9 Purificación de anticuerpos.***

Se realizó una purificación por afinidad de los anticuerpos IgGs anti-AQPs por cromatografía de Proteína A, para ellos se utilizó el Kit Montage® Antibody Purification Kit con medio PROSEP-A® ( Millipore, Billerica, MA, USA) .

Los sueros diluidos en tampón de unión A (1:1 v/v) se centrifugaron a 100 x g durante 20 min en una columna con medio PROSEP-A previamente equilibrado con el mismo tampón . Se recogió el filtrado y se lavó la columna dos veces con el mismo tampón de unión centrifugando 2 minutos a 500 x g. Los anticuerpos se eluyeron centrifugando 5 minutos a 500 x g con 10ml de tampón de elución B2, la solución resultante se neutralizó con 1.3 ml con tampón C.

Los eluatos se dializaron contra 100 volúmenes de PBS pH 7.4 para eliminar el exceso de Azida sódica y se cuantificaron por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) .



## 2.10 Prueba de exclusión de la viabilidad celular con azul tripán

Para el ensayo se utilizaron dos líneas celulares: La línea celular de *I. ricinus* derivada de embriones de garrapata IRE/CTVM20 (Bell-Sakyi et al., 2007) que se mantuvo en una mezcla 1:1 de medio L-15 (Leibovitz) y medio L-15B (Munderloh and Kurtti, 1989) suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, 10% tryptose phosphate broth (TPB, Sigma–Aldrich), 0.05% lipoproteína bovina (MP Biomedicals) y 1% Glutamax (Life Technologies) (L-15/L-15B). La línea celular de *I. scapularis* derivada de embriones de garrapata ISE6 (Kurtti et al., 1996) se mantuvo también a 31°C pero en medio L-15B300 (Munderloh et al., 1999) suplementado con 5% FCS, 10% TPB, 0.1% lipoproteína bovina y 1% Glutamax (Life Technologies). Las células se cultivaron a una densidad aproximada de 10<sup>6</sup> células en un volumen de 1 ml en placas de 24 pocillos a 31°C. La solución de células se incubó con los anticuerpos en una relación al 10% v/v durante 24 horas. Los tratamientos se aplicaron como se indica en la tabla 3.

**Tabla 3.** Diseño estudio *in vitro* con células del genero *Ixodes* frente anticuerpos anti-AQPS. El grupo VAC son células tratadas con anticuerpos de ratones inmunizados con rAQPSIx; el grupo PLACEBO se trató con anticuerpos de ratones inmunizados con solución salina; y el grupo NT son células sin tratar. Se hicieron tres réplicas de cada tratamiento en las dos líneas celulares.

<i>I. scapularis</i>			<i>I. ricinus</i>		
VAC1	PLACEBO1	NT 1	VAC1	PLACEBO1	NT 1
VAC2	PLACEBO2	NT 2	VAC2	PLACEBO2	NT 2
VAC3	PLACEBO3	NT 3	VAC3	PLACEBO3	NT 3

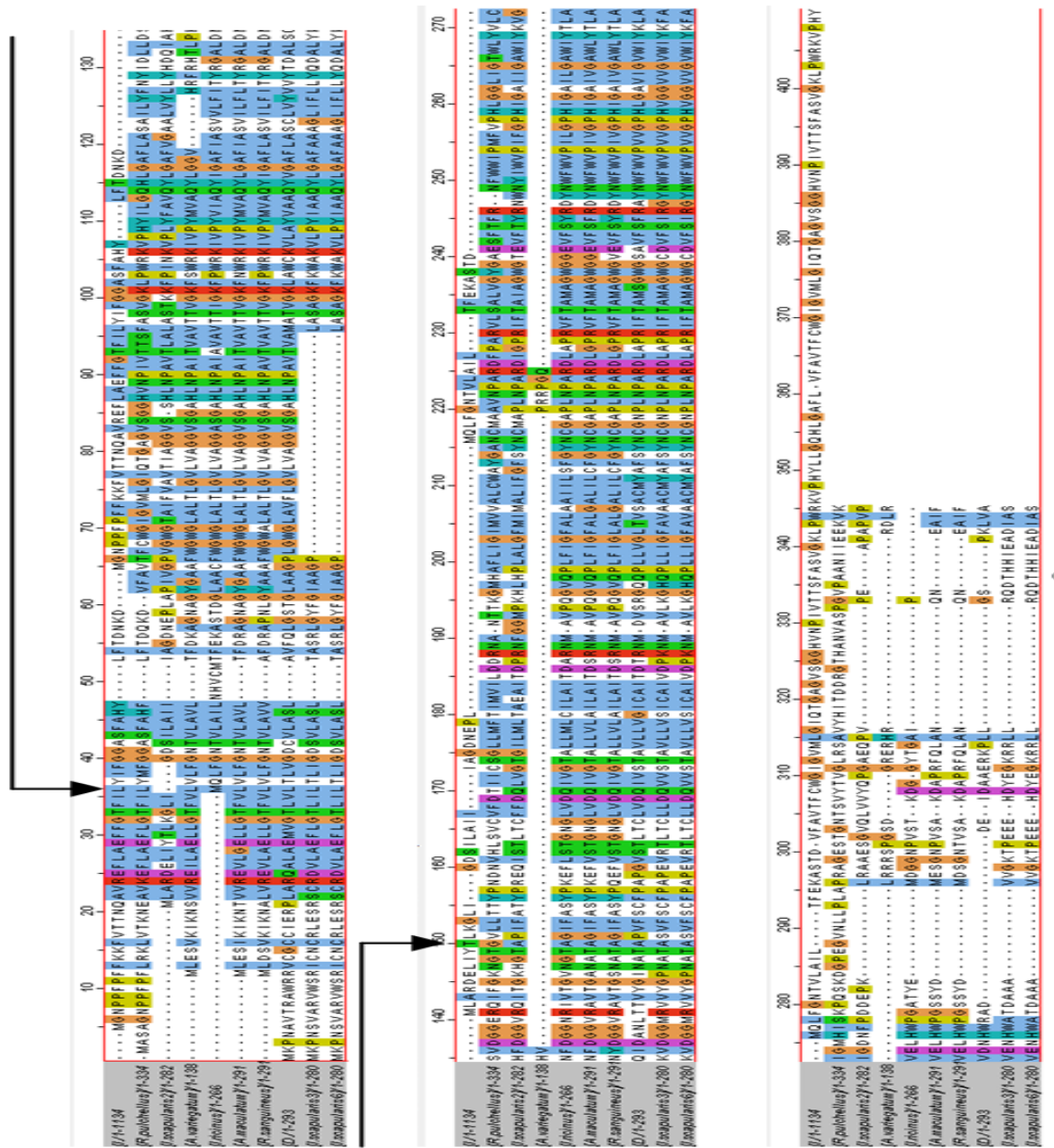
Para determinar el número de células viables se mezcló una suspensión de células en PBS con azul de tripán al 0.4% en una proporción 1:1 y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. La viabilidad celular se determinó visualmente en microscopio evaluando si las células tomaban o excluían el colorante. Se calculó el porcentaje de células viables en cámara de recuento celular Neubauer utilizando la siguiente expresión:

$$\text{células viables(\%)} = \frac{\text{número total de células viables por ml de alícuota}}{\text{número total de células por ml de alícuota}} \times 10$$

### 3. Resultados

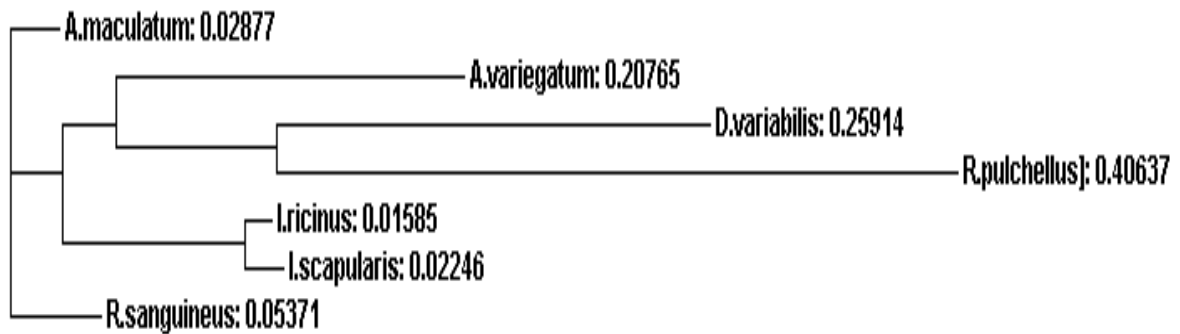
#### 3.1 Alineamientos secuencias acuaporinas

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las acuaporinas de diferentes especies de garrapata de la figura 2 muestra los dominios homólogos.



**Fig. 2.** Alineación de secuencias de proteínas acuaporinas de diferentes especies de garrapata. Las secuencias de proteínas se muestran en el código de aminoácidos de letra única. Los aminoácidos idénticos se muestran con el mismo color. Las flechas indican la región de mayor extensión con más similitud entre las especies.

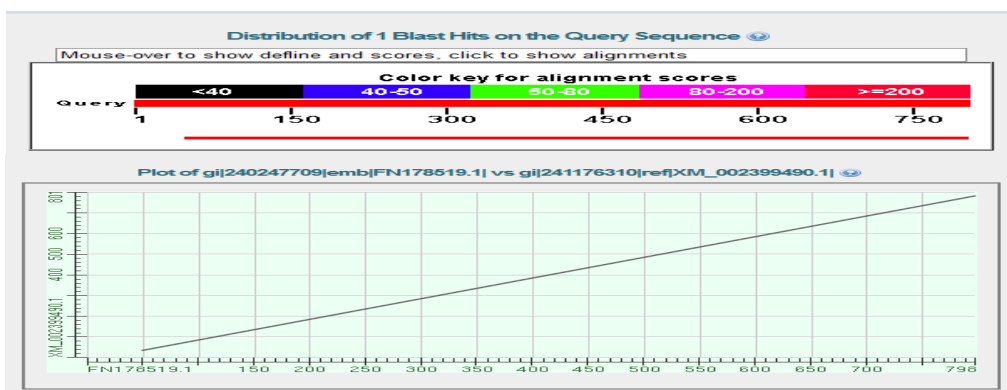
La figura 3 muestra el resultado del árbol filogenético con las secuencias de aminoácidos y la relación evolutiva entre las acuaporinas de las diferentes especies de garrapata utilizando el algoritmo neighbor-joining .



**Fig. 3.** Relación filogenética y evolutiva de las secuencias de acuaporina de diferentes especies de garrapata. Los números indican las distancias evolutivas (diferencias entre secuencias) entre especies.

### 3.2 Acuaporina de la especie *Ixodes*

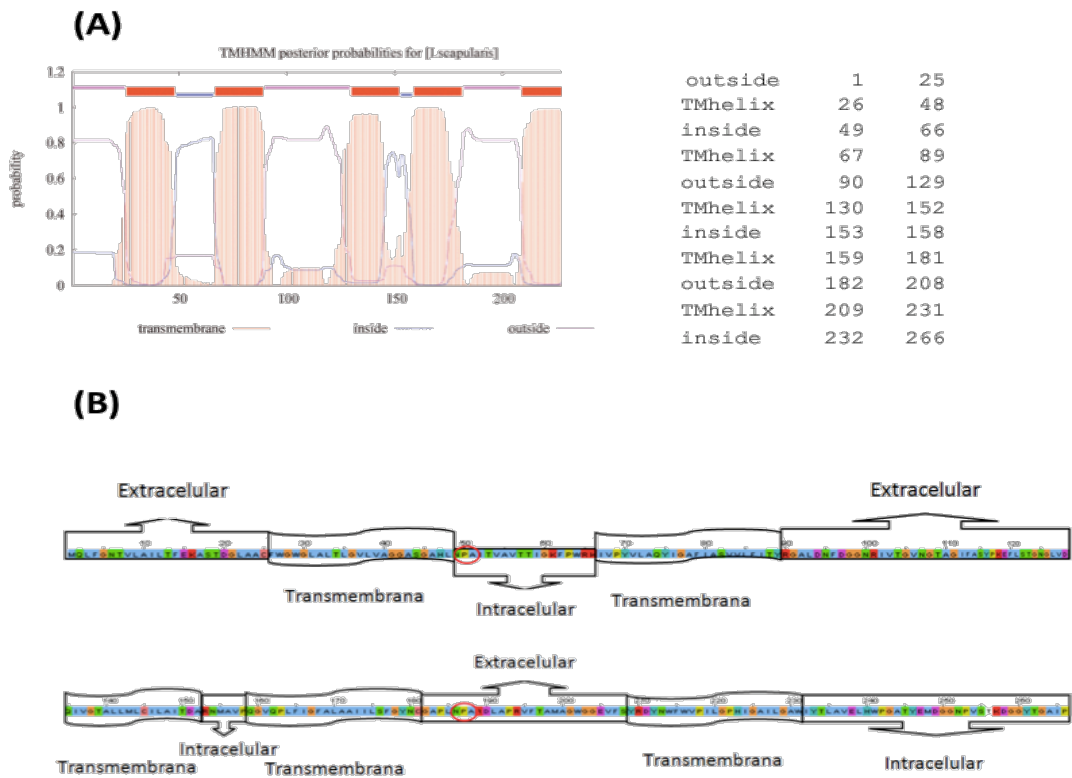
El alineamiento específico de las secuencias de las especies de garrapata *I. scapularis* e *I. ricinus* obtenidas en la base de datos del Centro Nacional de Información Sobre Biotecnología, (National Center for Biotechnology Information, NCBI) del género *Ixodes* dio una homología del 98% como muestra la figura 4.



**Fig .4.** Alineamiento secuencias codificantes de acuaporina de las especies *I. scapularis* y *I. ricinus*. La puntuación de cada alineación se indica mediante uno de los cinco colores diferentes, que divide las puntuaciones en cinco grupos. Múltiples alineamientos en la misma secuencia están conectados por una línea de trazos. La gráfica muestra las regiones de similitud en base a los resultados de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La secuencia de *I. ricinus* se representa en el eje X y la secuencia de *I.*

*scapularis* se representa en el eje Y. Los números representan las bases / residuos de cada una . Las alineaciones se muestran en el gráfico como líneas.

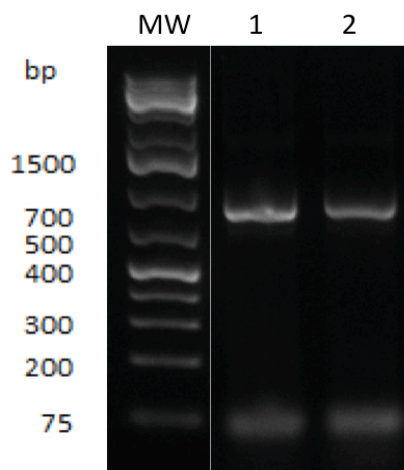
El análisis para identificar la región expuesta y secuencia funcional mostró la topología de la secuencia de aminoácidos en la estructura de la proteína como se muestra en la figura 5.



**Fig. 5.** Estructura de la acuaporina de *I.scapularis*. A) Topología de la proteína utilizando el servidor TMHMM . Los valores indican los aminoácidos que forman parte de cada región en la estructura de la proteína en la membrana celular. B) Esquema de los dominios proteicos. Se señala en rojo los tripletes funcionales asparagina-prolina-alanina (NPA).

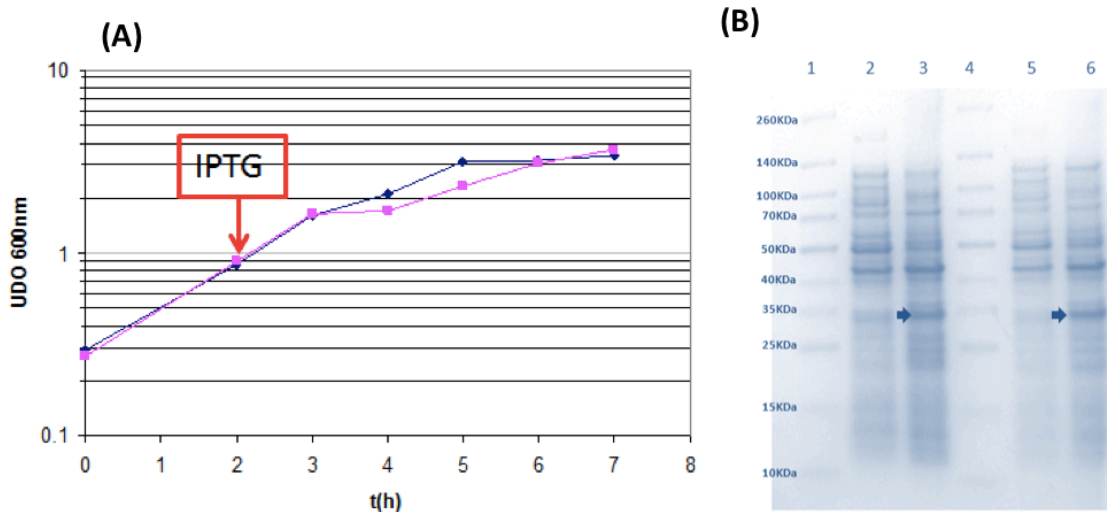
### 3.3 Clonaje y expresión de acuaporinas del género *Ixodes*.

Se amplificaron las secuencias de ADN que codifican las proteínas rAQPSIxs y rAQPSIxr con los cebadores específicos para la clonación en el vector pET101/D-TOPO. La electroforesis en gel de agarosa confirmó la talla esperada de las secuencias (Fig.6).



**Fig. 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las secuencias de acuaporinas del género *Ixodes* amplificadas por PCR. **(MW):** marcador de peso molecular (*O'GeneRuler 1kb, Thermo Scientific*). **(1)** rAQPSIxs, con una talla esperada de 801 bp y **(2)** rAQPSIxr, con una talla esperada de 798 pb.

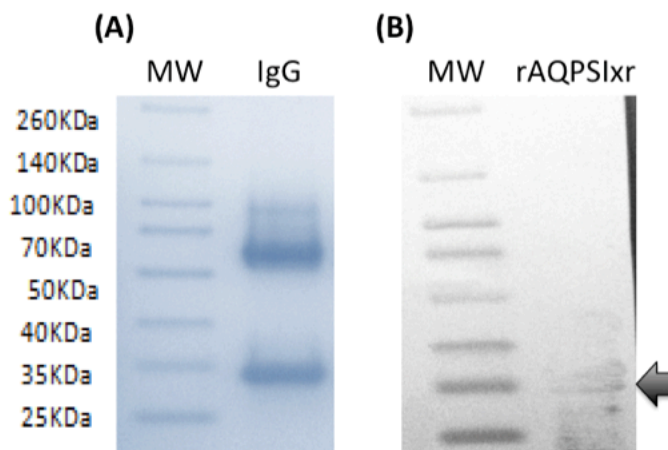
Los resultados de la etapa de expresión se muestran en la figura 7. La determinación de la curva de crecimiento celular y el punto de inducción con IPTG a las 2 horas de crecimiento dio una  $U.D.O_{.600nm} = 0.9$  similares para las cepas resultantes de *E. coli* para la expresión de rAQPSIxs y rAQPSIxr (Fig. 7B). La expresión de las proteínas recombinantes en el medio de cultivo se comprobó mediante análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras tomadas del cultivo en el momento pre-inducción y final (Fig.7B). En cada pocillo del gel se cargaron 10  $\mu$ g de proteína total dando como resultado el punto de expresión de las acuaporinas de *I. scapularis* e *I. ricinus* a la altura aproximada de 30 KDa.



**Fig.7 .** Resultado expresión de AQPS recombinantes en *E. coli*. **(A)** Curva de crecimiento de *E. coli* . La línea azul se corresponde a la expresión de rAQPSIx y la línea morada a la de rAQPSIxR. **(B)** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes de las proteínas rAQPSIx y rAQPSIxR expresadas en *E.coli*. **(1) y (4):** marcador de peso molecular (*Thermo Scientific*). **(2) y (5):** control negativo (etapa pre-inducción) de la expresión de rAQPSIx y de rAQPSIxR, respectivamente, **(3) y (6):** fracción tiempo final de expresión de rAQPSIx y rAQPSIxR, respectivamente. Las flechas señalan las bandas de las acuaporinas sobre expresadas alrededor a los 30 KDa.

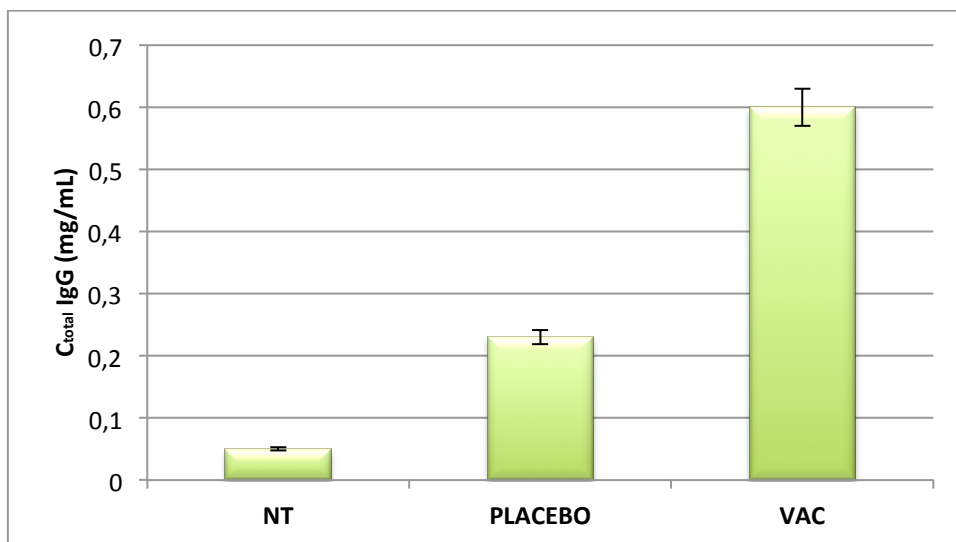
### 3.4 Producción de anticuerpos en ratón.

Se obtuvieron 0.5 ml de suero de cada ratón inmunizado. Estos sueros se purificaron y se utilizaron para el estudio *in vitro* de viabilidad celular y como herramienta de detección de las proteínas estudiadas mediante *Western Blot* (Fig.8 ).



**Fig.8.** Caracterización por tinción e inmunoblot de los sueros de ratón inmunizados. **(A)** Resultado de la purificación de anticuerpos en gel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes de las cadenas pesadas y ligeras de IgGs purificadas de ratones inmunizados con rAQPSIxr. **(B)** Análisis por *Western Blot* con sueros de ratón vacunados con el antígeno rAQPSIxr.

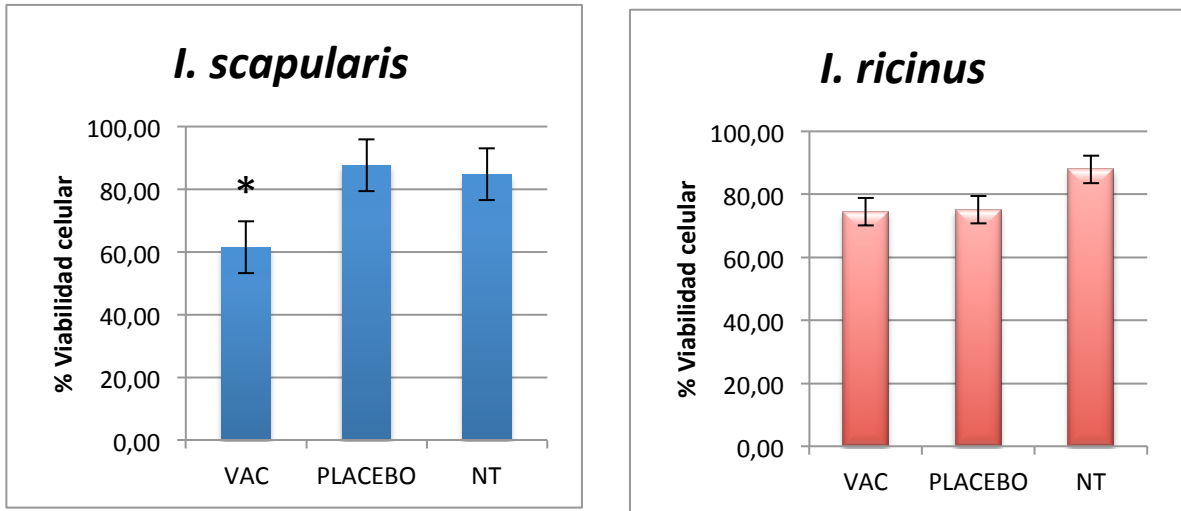
Los cálculos realizados a partir de los datos obtenidos de la cuantificación dieron los valores mostrados en la figura 9.



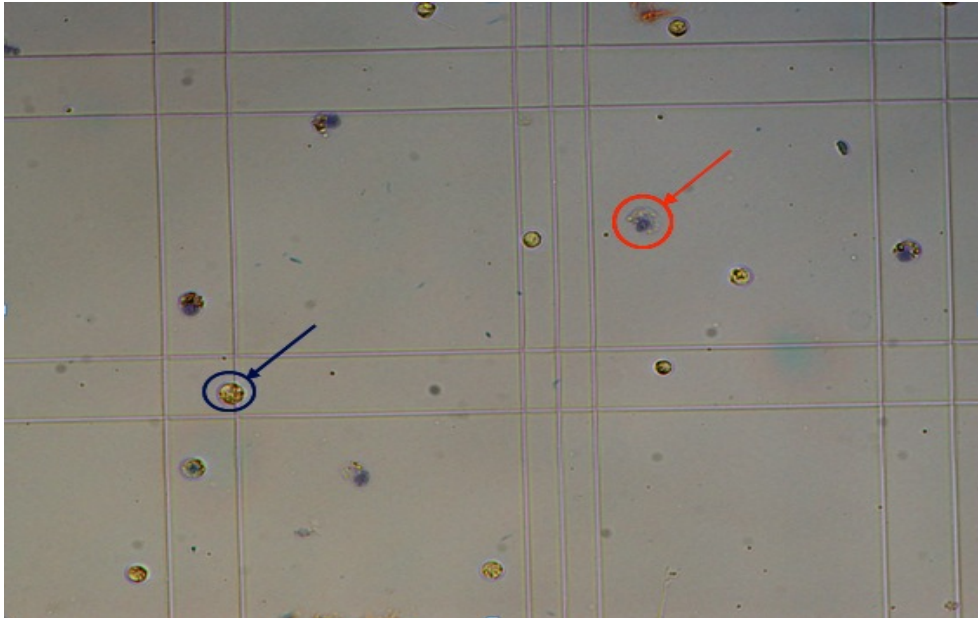
**Fig. 9.** Los valores muestran la concentración (mg/ml) de anticuerpos purificados a partir de los sueros de los ratones inmunizados con solución salina (Placebo), inmunizados con rAQPSIxr (Ixodes) y ratones sin inmunizar (Control).

### **3.5 Estudio *in vitro* de viabilidad celular.**

En el ensayo *in vitro* para determinar la viabilidad celular con azul tripán se calcularon los porcentajes de viabilidad de cada grupo celular tratado como se muestra en la figura 10. Las células vivas excluyen el colorante azul de tripán, mientras que las células muertas no lo hacen. Las células vivas mostraron un citoplasma claro, mientras que las células muertas tenían un citoplasma azul (Fig. 11).



**Fig 10.** Porcentajes de viabilidad de cada grupo celular tratado. VAC : células tratadas con anticuerpos de ratones inmunizados con rAQPSI<sub>1x</sub>r; PLACEBO: células tratadas con anticuerpos de ratones inmunizados con solución salina; y NT : células que no recibieron tratamiento. Los valores de viabilidad de los grupos vacunados se compararon estadísticamente frente los grupos control utilizando un test Chi-Cuadrado (\*p<0.005).



**Fig. 11.** Células de *I. scapularis* teñidas con azul tripán para medir la viabilidad celular en cámara de Neubauer . La flecha azul señala una célula viva y la flecha roja señala una célula muerta.



## **4. Discusión**

### **4.1 Alineamientos secuencias acuaporinas**

La comparación de las secuencias de una misma proteína en diferentes especies resulta de gran interés desde el punto de vista funcional y filogenético. El árbol filogenético indica lo evolutivamente alejadas que están las especies estudiadas (Fig. 3), dando como resultado un valor relativamente alto entre las distancias de las diferentes especies, pero buena proximidad entre mismo género, como en el caso de *Ixodes*. A pesar de este resultado, el alineamiento de las secuencias de AQPS de las diferentes especies de garrapatas dio como resultado una región homóloga desde el aminoácido 36 al 150 (Fig. 2). Este resultado permitiría diseñar una proteína basada en esta secuencia como antígeno quimérico que puede ser utilizado para generar protección frente a varias especies de garrapatas, utilizando una vacuna basada en una sub-unidad peptídica conservada y homóloga entre varias especies y con función específica importante. El análisis ha permitido localizar la secuencia funcional en el mecanismo de transporte de agua a través de la célula, estos aminoácidos funcionales pueden encontrarse en diferentes posiciones para el mismo tipo de proteína en diferentes especies (Campbell et al., 2008), pueden ser aminoácidos invariantes o conservados y son fundamentales para la función y estructura de la proteína y la afectación de este aminoácido puede ser letal para el organismo. Los aminoácidos funcionales de la acuaporina son el triplete NPA (Fig. 5B), el alineamiento y estudio del perfil transmembrana ha dado como resultado que este triplete está presente en la región homóloga entre las diferentes especies. Este argumento refuerza la idea de diseñar un antígeno quimérico protector frente a una gran variedad de especies utilizando una vacuna basada en una región conservada y homóloga de AQPS de garrapata utilizando como diana el mecanismo en el transporte de agua.

### **4.2 Expresión de acuaporina recombinante de *Ixodes***

Las secuencias de las proteínas rAQPSIx<sub>s</sub> y rAQPSIx<sub>r</sub> presentan una alta homología, localizando en puntos análogos las fracciones de secuencia funcional (Fig. 4). Se alcanzaron rendimientos similares en la expresión de ambas proteínas en *E. coli*

como muestra la figura 7, las dos proteínas recombinantes, rAQPSIxs y rAQPSIxr se obtuvieron con niveles de expresión a una talla aproximada de 30KDa. Se decidió desarrollar el estudio *in vitro* con células de Ixodes con anticuerpos producidos frente a AQPS recombinante de *I. ricinus*, teniendo en cuenta como criterios de selección la homología del 98% obtenida entre ambas secuencias, y la alta prevalencia y el impacto como vector de la especie *I. ricinus* en Europa (Anderson, 1991; Scharlemann et al., 2008). Debido a los cambios en las condiciones ecológicas y climáticas y al incremento de la disponibilidad de hospedadores en el continente se ha favorecido la dispersión de *I. ricinus* (Santos-Silva et al., 2011).

#### ***4.3 Producción de anticuerpos***

Se confirmó por *Western Blot* que los anticuerpos purificados de ratones inmunizados reconocían la proteína recombinante rAQPSIxr expresada en *E. coli* (Fig. 7B). El rendimiento de anticuerpos totales de los sueros de ratones inmunizados fue significativamente mayor cuando se comparó frente a los grupos tratados con solución salina y frente al grupo control. Este resultado demostró la capacidad inmunogénica de la AQPS recombinante de Ixodes y la viabilidad de utilizar la proteína como antígeno en vacunas basadas en sub-unidades proteicas.

#### ***4.4 Efecto de anticuerpos en células de Ixodes***

Se realizó un ensayo *in vitro* como una aproximación al efecto de anticuerpos frente a acuaporinas de garrapatas del género Ixodes, se obtuvo una reducción significativa del 30% de células de la especie *I. scapularis* cuando se comparó el grupo tratado con suero de ratones inmunizados frente al grupo control tratado con solución salina. No se observó efecto en el grupo de células de la especie *I. ricinus*. La diferencia en la viabilidad de las dos líneas celulares (*I. ricinus* e *I. scapularis*) frente a anticuerpos anti-AQPS puede deberse a que hay diferencias entre ambas líneas celulares en cuanto a morfología y condiciones de cultivo, las células de *I. scapularis* son una población mixta de células (Offerdahl, 2012) con condiciones óptimas de cultivo conocidas, a

diferencia de los cultivos de *I. ricinus* (Dyachenko et al., 2013). A pesar de que fueron tratadas con las mismas soluciones de anticuerpos, cada línea celular estaba en un medio de cultivo distinto que puede haber afectado de forma diferente rendimiento de los anticuerpos. Otro aspecto a tener en cuenta para el diferente efecto obtenido es el origen embrionario de las células, y la posibilidad de ser un estado inmaduro para la expresión de la acuaporina, siendo desconocida la fase de desarrollo donde se expresa la proteína. Estas células no pertenecen a un tejido específico y se sabe que las acuaporinas se expresan en tejidos con un papel en el transporte de agua como en el intestino, estando presentes en las glándulas salivales como tejidos asociados a un elevado flujo de agua (Campbell et al., 2010).

Este estudio ha sido una aproximación de utilizar la acuaporina como biomolécula funcional diana en garrapatas. Aunque son resultados preliminares y no con un efecto total deseado, se han obtenido datos interesantes que invitan a seguir con nuevos y mejorados trabajos para saber si realmente la AQPS puede ser un buen candidato para el desarrollo de vacunas protectoras frente artrópodos.

## 5. Conclusiones

- Este estudio permitió caracterizar la acuaporina de garrapata y obtener resultados preliminares para estudiar la viabilidad de utilizar este grupo de proteínas como antígeno protector frente artrópodos.
- Es posible generar respuesta inmune utilizando vacunas basadas en AQPS recombinante de *Ixodes*.
- Existe un efecto significativo de la AQPS recombinante de *Ixodes* frente células de la especie *I. scapularis*.
- Como resultados preliminares del efecto de anticuerpos frente acuaporina sobre células de garrapata, se sugiere realizar más estudios como ensayos *in vivo* para evaluar el efecto del antígeno AQPS recombinante sobre garrapatas.
- Con los datos generados en este estudio, se presenta la posibilidad de identificar una o varias regiones conservadas y homólogas entre secuencias de acuaporina de garrapata y diseñar una proteína quimérica que sea efectiva frente un amplio rango de especies de artrópodos, utilizando la acuaporina como proteína funcional diana.

## REFERENCIAS

- Anderson, J.F. 1991. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases* 77:23-34.
- Bell-Sakyi, L., Zweygarth, E., Blouin, E.F., Gould, E.A., Jongejan, F. 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology* 23:450–7.
- Campbell, E.M., Ball, A., Hoppler, S., Bowman, A.S. 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 178: 935-955.
- Campbell, E.M., Burdin, M., Hoppler, S., Bowman, A.S. 2010. Role of an aquaporin in the sheep tick *Ixodes ricinus*: assessment as a potential control target. *International Journal for Parasitology* 40(1):15-23.
- Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J. 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology* 9:29.
- Dyachenko, V., Geiger, C., Pantchev, N., Majzoub, M., Bell-Sakyi, L., Krupka, I., Straubinger, R.K. 2012. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Veterinary Microbiology* 162(2-4):980-986.
- Engel, A. and Stahlberg, H. 2002. Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions and variable surfaces. *International Review of Cytology* 215: 75–104.
- Fragoso, H., Rad, P.H., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L., de la Fuente, J. 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 16:1990–2.
- de la Fuente, J., Rodríguez, M., Redondo, M., Montero, C., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., de Armas, C.A., Rey, S., Rodríguez, J.L., Artiles, M., García, L. 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac<sup>TM</sup> against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 16:366–373.
- de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Leonart, R. 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac<sup>TM</sup>. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 15:143–8.

- de la Fuente, J., Rodríguez, M., García-García, J.C. 2000a. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens.. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916:617–21.
- de la Fuente, J., García-García, J.C., González, D.M., Izquierdo, G., Ochagavía, M.E. 2000b. Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. *Veterinary Parasitology* 92:209–22.
- de la Fuente and J., Kocan , K.M .2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines* 2:583–593.
- de la Fuente and J., Kocan , K.M. 2006 .Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28:275–283.
- de la Fuente ,J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P. 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* 8:23–28.
- de la Fuente ,J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience* 13:6938–46.
- García-García, J.C., Gonzalez, I.L., González, D.M., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Frago, H., Ortiz, M., Rodríguez, M., de la Fuente, J. 1999. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology* 23:883–95.
- García-García, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boué, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I.L., Valdés, M., Méndez, L., de la Fuente, J. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18:2275–87.
- Graf ,J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini ,G.A., Molento ,M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J. 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129:S427–S442.
- Jongejan ,F. and Uilenberg, G. 2004.The global importance of ticks. *Parasitology* 129:S3–14.

- Kaufman, W.R. and Phillips, J.E. 1973. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. routes of ion and water excretion. *The Journal of Experimental Biology* 58: 523–536.
- King, L.S., Kozono, D., Agre, P. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 687–698.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305(3):567-80.
- Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Andreadis, T.G., Magnarelli, L.A., Mather, T.N. 1996. Tick cell culture isolation of an intracellular prokaryote from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 318–21.
- Lopez, J.E., Palmer, G.H., Brayton, K.A., Dark, M.J., Leach, S.E., Brown, W.C. 2007. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infection and Immunity* 75(5):2333–2342.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J. 2013. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. 31(49):5889-96.
- Munderloh, U.G. and Kurtti, T.J. 1989. Formulation of medium for tick cell culture. *Experimental and Applied Acarology* 7: 219–29.
- Munderloh, U.G., Jauron, S.D., Fingerle, V., Leitritz, L., Hayes, S.F., Hautman, J.M., Nelson, C.M., Huberty, B.W., Kurtti, T.J., Ahlstrand, G.G., Greig, B., Mellencamp, M.A., Goodman, J.L. 1999. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2518–24.
- Offerdahl D.K., Dorward, D.W., Hansen, B.T., Bloom, M.E. 2012. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. *PLoS One* 7(10):e47912.
- Pagel Van Zee, J., Geraci, N. S., Guerrero, F.D., Wikel, S.K., Stuart, J.J., Nene, V.M., Hill, C.A. 2007. Tick genomics: the *Ixodes* genome project and beyond. *International Journal for Parasitology* 37:1297–305.
- Pao, G.M., Wu, L.F., Johnson, K.D., Hofte, H., Chrispeels, M.J., Sweet, G., Sandal, N.N., Saier, M.H. 1991. Evolution of the MIP family of integral membrane-transport proteins. *Molecular Microbiology* 5:33–37.

- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, Jr. I. 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *The Veterinary Journal* 194: 158–165.
- Rand ,K.N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:9657–9661
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H. Jr .1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 235-257.
- Rodríguez Valle, M., Méndez, L., Valdez, M., Redondo, M., Espinosa, C.M., Vargas, M., Cruz, R.L., Barrios, H.P., Seoane, G., Ramírez, E.S., Boué, O., Vigil, J.L., Machado, H., Nordelo, C.B., Piñeiro, M.J. 2004. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Experimental and Applied Acarology* 34:375–382.
- Rojek, A., Praetorius, J., Frokiaer, J., Nielsen, S., Fenton, R.A. 2008. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annual Review of Physiology* 70: 301–327.
- Santos-Silva, M.M., Beati, L., Santos, A.S., De Sousa, R., Nuncio, M.S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., Bacellar, F. 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology* 55(1):85-121.
- Sauer, J.R. and Hair, J.A. 1972. Quantity of blood ingested by lone star tick (Acarina: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 65: 1065.
- Scharlemann, J.P., Johnson, P.J., Smith, A.A., Macdonald, D.W., Randolph, S.E. 2008. Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Medical and Veterinary Entomology* 22(3):238-47.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J. 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology* 22:550–551.
- Sossai, S., Peconick, A.P., Sales-Junior, P.A., Marcelino, F.C., Vargas, M.I., Neves, E.S., Patarroyo, J.H. 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology* 37:199–214.

- Spring, J.H., Robichaux, S.R., Hamlin, J.A. 2009. The role of aquaporins in excretion in insects. *The Journal of Experimental Biology* 212: 358-362.
- Verkman, A.S. 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science* 118: 3225-3232.
- Verkman, A.S. 2011. Aquaporins at a glance. *Journal of Cell Science* 124: 2107-2112.
- de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., Jongejan, F. 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology* 25:245–61.
- Willadsen, P. and Kemp, D.H. 1988. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitology Today* 4: 196–198.
- Willadsen, P., Riding, G.A., McKenna, R.V., Kemp, D.H., Tellam, R.L., Nielsen, J.N., Lahstein, J., Cobon, G.S., Gough, J.M. 1989. Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology* 143:1346–1351.
- Willadsen, P. 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology* 138:161–168.
- Wistow, G.J., Pisano, M.M., Chepelinsky, A.B. 1991. Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 16:170–171.