

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



TESIS DOCTORAL

Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de
antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y
vacunas anti-garrapata

VERÓNICA DÍAZ MARTÍN

Salamanca, 2014

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

Dña. Verónica Díaz Martín ha disfrutado de una ayuda JAE Predoc concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto AGL2010-18164 y por la Junta de Castilla y León a través del proyecto CSI062A11-2.

El doctor D. RAÚL MANZANO ROMÁN, Investigador Contratado del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), y los doctores D. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ y Dña. ANA OLEAGA PÉREZ, Investigadores Científicos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y vacunas anti-garrapata**”, presentada por Dña. VERÓNICA DÍAZ MARTÍN, Licenciada en Biología y Bioquímica, ha sido desarrollada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) bajo nuestra dirección y cumple las condiciones para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos legales, firman y sellan el correspondiente certificado en Salamanca a 16 de Mayo de 2014.

Fdo. Dr. Raúl Manzano Román Fdo. Dr. Ricardo Pérez Sánchez Fdo. Dra. Ana Oleaga Pérez

El doctor D. PEDRO FERNÁNDEZ SOTO, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que Dña. VERÓNICA DÍAZ MARTÍN, ha realizado el trabajo titulado **“Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y vacunas anti-garrapata”**, bajo la dirección de los doctores D. RAÚL MANZANO ROMÁN, D. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ y Dña. ANA OLEAGA PÉREZ, y estima como tutor que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste, a los efectos legales, firma y sella el correspondiente certificado en Salamanca a 16 de Mayo de 2014.

Fdo. Dr. Pedro Fernández Soto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para agradecer la ayuda y el apoyo de todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a que este trabajo haya llegado hasta aquí:

En primer lugar, quiero agradecer a mis tres directores la confianza depositada en mí y su gran ayuda en la elaboración de esta memoria. Al Dr. Ricardo Pérez, que confió en mí y me permitió formar parte de su equipo. Gracias por el esfuerzo y dedicación mostrados durante la realización de todos y cada uno de los ensayos, y en la redacción final de esta memoria. Al Dr. Raúl Manzano, su enorme interés, su ayuda y apoyo en todo el trabajo de laboratorio. Y a la Dra. Ana Oleaga, su colaboración, sus consejos y ánimos, sobre todo en estos últimos meses.

A la Dra. Mar Siles, su interés y colaboración en todo lo que he podido necesitar.

Al Dr. Pedro Fernández Soto, el “responsable” de que me iniciara en la investigación hace ya 8 años. Gracias por tu trabajo como tutor de esta Tesis.

Al Dr. Manuel Fuentes, por abrirnos las puertas de su laboratorio en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca y supervisar todo el trabajo relacionado con los microarrays de proteínas.

A todos los que habéis compartido conmigo tantos momentos, y no sólo de trabajo, en el laboratorio: María, Rocío, Juan, Jose, Edu, Ana, Olga... gracias por acogerme tan bien cuando llegué al IRNA, gracias por vuestra ayuda en el trabajo diario del laboratorio y con los animales, gracias por escuchar mis “penas” y sobre todo, gracias por hacer tan agradables las horas de trabajo. Estos cinco años no habrían sido lo mismo sin vosotros!

A todos los que “hacemos instituto” dentro y, sobre todo, fuera del IRNA, gracias por tan buenos momentos en el café, las cañas, cenas, fiestas, cumpleaños, excursiones, viajes... empezasteis siendo compañeros de café y os habéis convertido en amigos. Espero que sigamos “haciendo instituto” durante mucho tiempo.

A todos mis amigos, en especial a María, Sara, Raquel y Ana, por estar a mi lado desde los cinco años. Gracias por ser mis amigas.

A mi familia, por su interés y preocupación por que este proyecto fuera un éxito. Gracias sobre todo a vosotros, mamá, papá, abuela, David y Elena, por vuestro apoyo, comprensión, cariño... Os quiero!

Gracias a todos.

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos.

ANOVA: Análisis de la varianza de una vía.

BAB: “Biogenic amine binding”.

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”.

BSA: Albúmina de suero bovino.

cDNA: DNA complementario.

CFUs: Unidades formadoras de colonias.

CMMs: Membranas microsomales pancreáticas caninas.

DAB: Diaminobenzidina.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DO: Densidad óptica.

dsRNA: RNA de doble cadena.

DTT: Ditioneitol.

emPAI: Índice de abundancia proteica modificado exponencialmente.

FCA: Adyuvante completo de Freund.

FIA: Adyuvante incompleto de Freund.

GFP: Proteína fluorescente verde.

GGB: Gamma globulina bovina.

GO: “Gene Ontology”.

GPI: Glicosil fosfatidil inositol.

GST: Glutation-S-transferasa.

IP: Inmunoprecipitación.

IPTG: β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo.

IS: Índice serológico.

IVTT: Transcripción/Traducción *in vitro*.

LB: Medio Luria-Bertani.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a sistema de espectrometría de masas en tándem.

mA: Miliamperios.

MALDI-TOF/TOF: Espectrometría de masas en tándem mediante ionización-disociación por láser en matriz- tiempo de vuelo.

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad de clase II.

mRNA poliA+: RNA mensajero poliadenilado.

NAPPA: "Nucleic Acid Programmable Protein Arrays".

NCBI: "Centre for Biotechnology Information GeneBank".

nm: Nanómetros.

OPD: Orto-fenilendiamina.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pfam: "Protein families database".

pi: Punto isoeléctrico.

PM: Peso molecular.

PPA: Peste porcina africana.

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

RACE: "Rapid amplification of cDNA ends".

RNAi: RNA interferente.

ROC: "Receiver Operator Characteristic".

RT-PCR: "Reverse transcription-polimerase chain reaction".

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SGE: Extracto proteico de glándulas salivales.

SMART: "Simple Modular Architecture Research Tool".

TBE: Tris-Borato-EDTA.

TBS: Tampón Tris-salino.

TBST: TBS con Tween20 al 0,1%.

TCA: Ácido tricloroacético.

TFA: Ácido tricfluoroacético.

TFE: Trifluoroetanol.

tPA: Activador tisular del plasminógeno.

TPBS: PBS con Tween-20 al 0,05%.

TSA: "Tyramide Signal Amplification".

TXA₂: Tromboxano A₂.

uPA: Urokinasa.

εACA: ácido ε-aminocaproico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1. PARTICULARIDADES BIOLÓGICAS DE LAS GARRAPATAS.....	9
1.1. Fijación y toma de sangre.	10
1.2. Glándulas salivales.	12
2. RESPUESTAS DEFENSIVAS DEL HOSPEDADOR DURANTE LA ALIMENTACIÓN DE LAS GARRAPATAS.....	12
2.1. Respuesta hemostática.	12
2.2. Respuesta inmunitaria innata (inflamación).	16
2.3. Respuesta inmunitaria específica.....	16
3. FUNCIONES DE LA SALIVA DURANTE LA ALIMENTACIÓN: INTERÉS Y APLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS SALIVALES.	19
4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SALIVA: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL SIALOMA.	20
5. ANTIHEMOSTÁTICOS, ANTIINFLAMATORIOS E INMUNOMODULADORES DE LA SALIVA DE LAS GARRAPATAS.....	24
5.1. Moléculas reguladoras de la hemostasia.	24
5.1.1. Antiagregantes.....	24
5.1.2. Vasodilatadores.	26
5.1.3. Anticoagulantes.	26
5.1.4. Agentes profibrinolíticos.	28
5.2. Agentes antiinflamatorios e inhibidores del complemento.	29
5.3. Inmunomoduladores.....	30
6. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LOS PARASITISMOS POR GARRAPATAS.	33
6.1. Diagnóstico serológico del parasitismo por ixódidos.....	33
6.2. Diagnóstico serológico del parasitismo por argásidos.....	34
7. DESARROLLO DE VACUNAS ANTI-ORNITHODOROS.	37
7.1. Ensayos con antígenos ocultos.	38
7.2. Ensayos con antígenos salivales.....	39
7.3. Definición del antígeno ideal para el desarrollo de vacunas anti-garrapata.	41
7.4. Nuevas estrategias para la identificación de antígenos protectores.....	42

MATERIAL Y MÉTODOS	45
PARÁSITOS, HOSPEDADORES Y MÉTODOS GENERALES.....	47
I. PARÁSITOS.....	47
II. HOSPEDADORES.....	47
III. MATERIAL PARASITARIO	47
GLÁNDULAS SALIVALES.	47
SALIVA.....	49
IV. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS E INMUNOENZIMÁTICAS.....	50
SDS-PAGE.....	50
TINCIÓN DE LOS GELES.....	51
WESTERN BLOT.....	51
OBJETIVO 1. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TSGP1 DE <i>O. MOUBATA</i> , PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y ANÁLISIS DE SU UTILIDAD COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.....	53
1.1. Obtención de la secuencia codificante completa de cDNA de TSGP1	53
1.1.1. 3'-RACE	53
1.1.2. 5'-RACE	55
1.1.3. RT-PCR	55
1.2. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la TSGP1.....	56
1.3. Expresión y purificación de TSGP1 recombinante truncada (rtOmTSGP1).....	57
1.3.1. Clonaje del cDNA tOmTSGP1 en el vector de expresión pQE-30	58
1.3.2. Transformación de células <i>E. coli</i> M15 competentes con pQE-30- tOmTSGP1.....	60
1.3.3. Expresión de la proteína recombinante.	61
1.4. Utilidad de la rtOmTSGP1 como herramienta diagnóstica.	61
1.4.1. Sueros analizados	61
1.4.2. Protocolo ELISA.....	62
1.4.3. Análisis estadístico.....	62
OBJETIVO 2. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE <i>O. MOUBATA</i>	65
2.1. Análisis proteómico “off-gel”	65
2.1.1. Digestión con tripsina	65
2.1.2. LC-MS/MS	65
2.1.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas	66

2.2. Análisis proteómico clásico.	67
2.2.1. SDS-PAGE	67
2.2.2. Digestión con tripsina y LC-MS/MS.	67
2.2.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas	67
2.4. Confirmación de resultados del análisis proteómico mediante western blot.	68
OBJETIVO 3. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENOLASA SALIVAL DE <i>O. MOUBATA</i>.	71
3.1. Obtención de la secuencia codificante completa de cDNA de enolasa.	71
3.2. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la enolasa.....	71
3.3. Expresión y purificación de la proteína recombinante (rOmEno).	72
3.4. Análisis funcional de la enolasa.....	72
3.4.1. Ensayos de unión a plasminógeno.	72
3.4.2. Ensayos de activación de plasminógeno	73
3.4.3. Ensayos de unión a P-selectina.....	74
3.4.4. Silenciamiento del gen de enolasa por RNA interferente y análisis fenotípico.....	76
3.5. Evaluación de la capacidad protectora de la rOmEno en ensayos de vacunación de animales.	78
OBJETIVO 4. PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>O. MOUBATA</i>.	79
4.1. Construcción de la genoteca de expresión.	79
4.1.1. Construcción de la genoteca de entrada, titulación y análisis de calidad.	81
4.1.2. Construcción de la genoteca de expresión, titulación y análisis de calidad.	81
4.2. Construcción de microarrays de proteínas mediante la tecnología Nucleic Acid-Programmable Protein Array (NAPPA) y evaluación de su calidad y reproducibilidad.....	82
4.2.1. Purificación y cuantificación de los clones seleccionados.....	82
4.2.2. Preparación de las muestras de DNA.	83
4.2.3. Funcionalización de los portaobjetos de vidrio.....	83
4.2.4. Impresión de los arrays.	83
4.2.5. Análisis de la calidad de la impresión.	83
4.2.6. Expresión in situ de las proteínas recombinantes.....	84
4.2.7. Control de la expresión de proteínas.	84

4.3. Análisis de los microarrays con sondas específicas.....	85
4.3.1. Análisis con el suero anti-Om44.	85
4.3.2. Análisis para la identificación de ligandos de P-selectina.	86
4.3.3. Secuenciación, identificación de los clones positivos y análisis bioinformático de las proteínas identificadas.	86
4.4. Confirmación de resultados del análisis de los microarrays.	87
4.4.1. Confirmación del reconocimiento de determinadas proteínas por el suero anti-Om44.	87
4.4.2. Confirmación del reconocimiento de la PLA2 por la quimera P-selectina/IgG humana.....	87
OBJETIVO 5. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PROTECTORA EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.	91
5.1. Clonaje, expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	91
5.1.1. Obtención de la secuencia codificante completa de la HSP90.....	91
5.1.2. Amplificación de las secuencias de cDNA codificante.....	91
5.1.3. Clonaje en vectores de expresión.....	93
5.1.4. Transformación de células competentes.	94
5.1.5. Expresión y purificación de las proteínas clonadas en pQE-30: PLA2, 7DB, RP-60S, actina, apirasa y HSP90.....	94
5.1.6. Expresión y purificación de la proteína clonada en pGEX-4T-1: mougrina-GST.	94
5.2. Ensayos de vacunación.....	95
5.4. Análisis estadístico.	97
RESULTADOS.....	99
OBJETIVO 1. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TSGP1 DE <i>O. MOUBATA</i>, PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y ANÁLISIS DE SU UTILIDAD COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.....	101
1.1. Secuencia de cDNA codificante y aminoacídica de TSGP1 de <i>O. moubata</i>	101
1.2. Análisis filogenético y estructural de la OmTSGP1.	102
1.3. Expresión y purificación de la proteína OmTSGP1 recombinante truncada, sin péptido señal, en el vector pQE-30.....	106
1.4. Utilidad de la rtOmTSGP1 como herramienta diagnóstica.	107
OBJETIVO 2. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE <i>O. MOUBATA</i>.	109

2.1. Obtención de saliva: reproducibilidad y composición de las muestras.	109
2.2. Ecuilibración de la saliva.	110
2.3. Análisis proteómico “off-gel”	110
2.3.1. Número de proteínas identificadas mediante LC-MS/MS en la saliva nativa y equilibrada de ambos sexos.	110
2.3.2. Descripción y clasificación de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de <i>O. moubata</i>	111
2.3.3. Abundancia relativa de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de <i>O. moubata</i>	124
2.4. Análisis proteómico in-gel. Separación de las proteínas mediante SDS-PAGE 1D, identificación por LC-MS/MS y cuantificación relativa de las proteínas identificadas.	125
2.5. Detección de actina y enolasa en la saliva de <i>O. moubata</i> mediante western blot.	127
OBJETIVO 3. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENOLASA SALIVAL DE <i>O. MOUBATA</i>.	129
3.1. Secuencia codificante (cDNA) y aminoacídica de la enolasa de <i>O. moubata</i>	129
3.2. Análisis filogenético de la proteína OmEnolasa.	130
3.3. Expresión y purificación de rOmEno.	133
3.4. Análisis funcional de la enolasa.	133
3.4.1. Unión a plasminógeno.	133
3.4.2. Activación del plasminógeno y generación de plasmina.	135
3.4.3. Unión de enolasa de <i>O. moubata</i> a P-selectina.	136
3.4.4. Silenciamiento del gen de la enolasa mediante RNA interferente: niveles de mRNA de enolasa y fenotipo observado.	138
3.5. Capacidad protectora de la enolasa recombinante (rOmEno) frente a <i>O. moubata</i>	139
OBJETIVO 4. PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE <i>O. MOUBATA</i>.	141
4.1. Calidad y representatividad de las genotecas de entrada y de expresión.	141
4.2. Control de calidad y reproducibilidad de la impresión del DNA.	143
4.3. Control de calidad de la expresión de proteínas.	145
4.4. Análisis de los microarrays con sondas específicas.	145
4.4.1. Ensayo con el suero anti-Om44.	145

4.4.2. Ensayo con la quimera recombinante P-selectina/IgG humana.	147
4.5. Confirmación de los resultados del análisis de los microarrays.....	148
4.5.1. Proteínas reconocidas por el suero anti-Om44.....	148
4.5.2. Reconocimiento de la fosfolipasa A2 por la quimera P-selectina/IgG humana.....	148
OBJETIVO 5. PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PROTECTORA EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.....	153
5.1. Secuencias de cDNA codificante y de aminoácidos de las proteínas seleccionadas.	153
5.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.	157
5.2.1. Expresión y purificación de las proteínas clonadas en pQE-30: PLA2, 7DB, RP-60S, actina, apirasa y HSP90.....	157
5.2.2. Expresión y purificación de mougrina-GST.....	159
5.3. Ensayos de vacunación. Valor protector frente a <i>O. moubata</i>	159
5.3.1. Título y especificidad de los sueros hiperinmunes.....	159
5.3.2. Acción de la respuesta inmunitaria inducida por las proteínas recombinantes sobre los parásitos.....	161
DISCUSIÓN.....	165
CONCLUSIONES.....	185
BIBLIOGRAFÍA.....	189
ANEXO. PUBLICACIONES Y PATENTE.....	209

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las garrapatas son parásitos hematófagos de importancia médica y veterinaria por los daños directos que producen al hospedador y por ser vectores de una gran variedad de patógenos (virus, bacterias, protozoos y helmintos) causantes de enfermedades que afectan al ganado, a los animales de compañía y silvestres y a las personas (Jongejan y Uilenberg, 2004; de la Fuente et al., 2008).

La especie *Ornithodoros moubata* es un argásido africano ampliamente distribuido por los países del este, centro y sur de este continente y la isla de Madagascar (Hoogstraal, 1956; Roger et al., 2001; Vial, 2009). En esas zonas se encuentra tanto en el medio natural, asociado a facoqueros y otros animales habitantes de madrigueras, como en el medio sinantrópico, en el que su presencia es muy común en las viviendas humanas y en las dependencias de los animales domésticos, particularmente las de los cerdos. Según Cutler (2010), en algunos distritos de Tanzania el 60-80 % de las viviendas humanas están colonizadas por *O. moubata*.

En relación con las personas, *O. moubata* es un ectoparásito importante no sólo por las molestias que causan sus picaduras sino también, y sobre todo, por ser vector de la Fiebre recurrente humana causada por *Borrelia duttoni*, una enfermedad endémica en amplias zonas de África oriental, que en algunos lugares afecta al 6,4 % de la población y provoca tasas de mortalidad perinatal del 436 por 1.000 (Cutler, 2006,2010; Cutler et al., 2009).

Desde el punto de vista veterinario, *O. moubata* también es un ectoparásito importante por ser el principal reservorio y vector del virus de la Peste porcina africana (PPA), una enfermedad hemorrágica de curso agudo, con tasas de mortalidad de hasta el 100 % (Rennie et al., 2001), que limita la producción porcina y provoca enormes pérdidas económicas en los países afectados (Costard et al., 2009; Sánchez-Vizcaíno et al., 2012).

Lógicamente, la eliminación de *O. moubata* del medio sinantrópico facilitaría el control y prevención de estas enfermedades. Aunque este objetivo parece en principio factible, para alcanzarlo es necesario disponer de un conocimiento preciso de los lugares en los que *O. moubata* está presente, así como de métodos eficaces para eliminar la garrapata de dichos lugares.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se persiguieron dos grandes objetivos generales: por una parte, el desarrollo de una herramienta para el diagnóstico serológico de los parasitismos por *O. moubata* aplicable en la identificación de los lugares colonizados por esta garrapata y, por otra, la identificación de antígenos salivales protectores para el desarrollo de vacunas frente a *O. moubata* como método de control. Estos objetivos han sido abordados del modo siguiente.

En relación con la identificación de los lugares infestados con *O. moubata*, este conocimiento podría obtenerse mediante la búsqueda directa del parásito en el terreno. Sin embargo, dada la naturaleza endófila de *O. moubata*, el examen directo es inviable a gran escala ya que requeriría la exploración exhaustiva de los innumerables lugares en los que la garrapata podría estar refugiada antes de poder considerar el área muestreada libre del parásito (Oleaga et al., 1990; Pérez-Sánchez et al., 2010a). En su lugar, los métodos serológicos

-basados en la detección de anticuerpos anti-garrapata en los hospedadores que viven en el área estudiada- ofrecen una alternativa viable, rápida y eficaz a la búsqueda directa y sólo requieren disponer de un antígeno suficientemente sensible y específico.

Estos métodos serológicos se aplicaron con éxito en España para la localización de las explotaciones porcinas infestadas con *Ornithodoros erraticus*, que es el vector ibérico del virus de la PPA (Pérez-Sánchez et al., 1992, 1994; Oleaga-Pérez et al., 1994). Tomando como modelo el antígeno utilizado entonces para la detección de anticuerpos anti-*O. erraticus*, que consistió en un extracto proteico de sus glándulas salivales (SGE), nuestro equipo desarrolló un antígeno similar para *O. moubata* (Baranda et al., 1997, 2000), el cual ha sido utilizado en estudios de campo en Madagascar (Ravaomanana et al., 2011). Estos estudios han mostrado que el SGE de *O. moubata* es un antígeno válido, pero también que su uso no está exento de inconvenientes, como son lo laborioso de su obtención, la dificultad de su estandarización y su composición compleja y poco conocida, que puede plantear dudas acerca de su especificidad, haciendo más conveniente el uso de un antígeno individual, de especificidad probada, obtenido en forma recombinante (Pérez-Sánchez et al., 2010a).

En este sentido, estudios previos mostraron que el antígeno denominado Om20A1 es el más específico y abundante de los presentes en el SGE y la saliva de *O. moubata* (Baranda et al., 2000), siendo posteriormente identificado como un ortólogo de la proteína TSGP1 (Tick salivary Gland Protein 1), que es una lipocalina presente en la saliva de *Ornithodoros savignyi* (Mans et al., 2001, 2003; Oleaga et al., 2007). En consecuencia, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue el clonaje, caracterización y producción en forma recombinante de la TSGP1 de *O. moubata*, así como la evaluación de su especificidad y sensibilidad en la detección de anticuerpos anti-*O. moubata* con vistas a su validación como herramienta diagnóstica.

En relación con los métodos para el control de las poblaciones de garrapatas, éstos se han basado tradicionalmente en el empleo de acaricidas químicos, pero el uso de estos productos presenta diversos inconvenientes, como la dificultad de su aplicación de forma efectiva en el interior de las viviendas humanas y de los corrales de los animales, la selección de cepas resistentes, la toxicidad, y la contaminación ambiental y de los productos animales (Oleaga-Pérez et al., 1990; George et al., 2004; Manzano-Román et al., 2006; Guerrero et al., 2012).

A la vista de estos inconvenientes, nuestro grupo inició el desarrollo de una vacuna anti-*O. moubata* como método alternativo de control, probando dos tipos de extractos antigénicos, los salivales (SGE) y los ocultos de tubo digestivo (Astigarraga et al., 1995; García Varas, 2004). El uso de antígenos de tubo digestivo parecía la vía más adecuada al ser este tipo de antígenos los utilizados en las dos únicas vacunas anti-garrapata comercializadas hasta la fecha, TickGARD[®] y GAVAC[®], ambas dirigidas frente a la especie *Rhipicephalus microplus* (de la Fuente et al., 2007; Willadsen, 2008; Guerrero et al., 2012). Por su parte, la posibilidad de obtener una respuesta protectora con los antígenos salivales (los contenidos en el SGE) parecía, en principio, improbable ya que este extracto posee una composición similar a la de la saliva (Baranda et al., 1997) y ésta, en condiciones naturales, induce respuestas inmunitarias

que carecen de valor protector. No obstante, probamos el SGE pensando que su administración con adyuvantes, en concreto con los de Freund, podría forzar el reconocimiento de los componentes antihemostáticos de la saliva, cuya neutralización debería traducirse en una inhibición de la alimentación (Maritz-Olivier et al., 2007).

En contra de lo esperable, los antígenos ocultos de tubo digestivo indujeron respuestas protectoras más débiles de lo previsto teniendo en cuenta la alta protección obtenida con ellos frente a ixódidos (Guerrero et al., 2012) y al argásido *O. erraticus* (Manzano-Román et al., 2006, 2007). Por el contrario, el SGE indujo una respuesta que provocó una reducción en la cantidad de sangre ingerida, y subsiguiente caída en la fecundidad de las hembras, de hasta un 60-70 %. En trabajos posteriores se aisló y caracterizó parcialmente al antígeno responsable de esa respuesta: una proteína salival de 44 kDa, a la que denominamos Om44, que actúa como ligando de la P-selectina del hospedador, lo cual, previsiblemente, impide la unión de P-selectina a su ligando natural, el PSGL-1, y, en consecuencia, bloquea los mecanismos hemostáticos desencadenados por esta interacción (García Varas, 2004; García-Varas et al., 2010). Estos hallazgos revelaban un nuevo mecanismo antihemostático en garrapatas y asignaban a la Om44 un gran valor como antígeno vacunal, pues su neutralización con anticuerpos bloqueaba significativamente la alimentación de *O. moubata*.

Con objeto de averiguar su identidad, el antígeno Om44 se analizó por espectrometría de masas y secuenciación *de novo* obteniendo resultados poco concluyentes, que por una parte indicaban que Om44 no es un ortólogo de PSLG-1 (García-Varas et al., 2010) y por otra sugerían como identidad la de una isoforma de enolasa (Pérez-Sánchez et al., 2010b). Dado que la enolasa, además de una enzima glucolítica de localización citoplasmática, es también una proteína multifuncional que puede secretarse al medio extracelular donde desempeña funciones profibrinolíticas reguladoras de la hemostasia (Pancholi, 2001; de la Torre-Escudero et al., 2010; Avilán et al., 2011) y dado que la enolasa fue inequívocamente identificada en un análisis proteómico de la saliva de *O. moubata* (ver sección de resultados), resultaba necesario averiguar cuál podría ser su función en este fluido y si dicha función se relacionaba con una hipotética actividad antihemostática como ligando de P-selectina. Con ese fin también incluimos como objetivo en la presente tesis doctoral el clonaje molecular de la enolasa de *O. moubata*, su producción en forma recombinante y su análisis funcional.

Adicionalmente, los hallazgos en relación con la Om44 confirmaban el principio expresado por otros autores de que la saliva de las garrapatas, por su contenido en proteínas antihemostáticas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, puede ser una fuente de antígenos potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas anti-garrapata capaces de bloquear la alimentación y la transmisión de patógenos (Maritz-Olivier et al., 2007; Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Wikel, 2013). Como en el caso de *O. moubata* la composición de su saliva se desconoce casi por completo, consideramos necesario llevar a cabo un análisis proteómico de la misma para facilitar la identificación de las moléculas responsables de la neutralización de los mecanismos defensivos del hospedador e incluimos dicho análisis como objetivo en nuestra tesis doctoral.

Por último, y puesto que los anteriores análisis no nos habían permitido identificar con certeza a la proteína Om44, decidimos abordar esta cuestión utilizando un nuevo planteamiento experimental, el cual dio lugar a los dos últimos objetivos de nuestro trabajo. Este planteamiento consistió en: (i) la producción de microarrays de proteínas a partir de una genoteca de expresión de cDNA de las glándulas salivales de *O. moubata* mediante tecnología NAPPA (Nucleic Acid Programmable Protein Arrays) y (ii) el análisis de los microarrays para la detección de ligandos de P-selectina, utilizando como sondas la propia P-selectina y un suero hiperinmune frente a Om44 obtenido en trabajos previos.

De este modo, esperábamos poder identificar a la Om44 y a otras posibles proteínas salivales unidoras de P-selectina, las cuales, tras ser producidas en forma recombinante, podrían ser analizadas en pruebas de inmunización de animales para evaluar su valor protector y, en ese caso, utilizadas en la definición de nuevos antígenos vacunales.

En resumen, los objetivos concretos del presente trabajo fueron los siguientes:

1. El clonaje y caracterización molecular de la TSGP1 de *O. moubata*, su obtención en forma recombinante y su validación como herramienta diagnóstica.
2. El análisis proteómico de la saliva de *O. moubata*.
3. El clonaje y caracterización molecular de la enolasa de *O. moubata*, su obtención en forma recombinante y su análisis funcional para verificar o descartar su hipotética actividad profibrinolítica y/o antagonista de P-selectina.
4. La construcción y análisis de microarrays de proteínas salivales de *O. moubata* para la identificación de ligandos de P-selectina ortólogos de Om44.
5. La producción y purificación de las proteínas recombinantes identificadas en el objetivo anterior, la evaluación de su capacidad protectora y la definición, en su caso, de nuevos antígenos vacunales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A fin contextualizar nuestro estudio, en este capítulo comentamos algunos aspectos básicos de la biología de las garrapatas, de su alimentación hematófaga y de las respuestas defensivas que dicha alimentación desencadena en el hospedador.

Para neutralizar dichas respuestas defensivas, las garrapatas han dotado a su saliva con moléculas que regulan las relaciones garrapata-hospedador-patógeno, permitiendo su alimentación y facilitando la infección del hospedador por los patógenos que transmiten. El interés y potencial utilidad de dichas moléculas ha impulsado desde hace años el estudio de la saliva de las garrapatas, permitiendo la identificación y caracterización funcional de un buen número de sus componentes. Dichos estudios y las moléculas caracterizadas en ellos son revisados en la parte central de este capítulo.

Por último, se revisan los trabajos dedicados al desarrollo de test de diagnóstico serológico de los parasitismos por garrapatas y al desarrollo de vacunas frente a argásidos, prestando especial atención a las vacunas basadas en antígenos salivales.

1. PARTICULARIDADES BIOLÓGICAS DE LAS GARRAPATAS.

Las garrapatas, ácaros cosmopolitas pertenecientes al Orden Parasitiformes y Suborden Ixodida, son ectoparásitos temporales y hematófagos obligados de vertebrados terrestres, incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Las especies conocidas están en torno a 907 (Barker y Murrell, 2008) y se clasifican en dos grandes familias, Argasidae e Ixodidae, entre las cuales existen significativas diferencias morfológicas y biológicas.

En su ciclo vital, las garrapatas pasan por las fases de huevo, larva, ninfa (en ixódidos), o varios estadios ninfales consecutivos (en argásidos), y adulto de uno u otro sexo. Salvo excepciones, las larvas y las ninfas necesariamente han de realizar una toma de sangre para mudar a la fase evolutiva siguiente y los adultos necesariamente han de tomar sangre para reproducirse.

Los argásidos son en general especies endófilas; en la naturaleza se refugian en el interior de las madrigueras de sus hospedadores y en el medio sinantrópico colonizan el interior de las viviendas humanas y las dependencias de los animales domésticos. Su alimentación es rápida (tardan menos de una hora) y una vez alimentadas mudan y se reproducen en el interior de sus refugios. Normalmente ingieren cantidades de sangre equivalentes a unas 10 veces su peso en ayunas; los adultos de ambos sexos pueden repetir la alimentación y realizar 8 - 10 ciclos trofónicos antes de morir, en cada uno de los cuales las hembras depositan entre 100 y 200 huevos (Vial, 2009).

Por su parte, los ixódidos son generalmente exófilos y permanecen en el suelo o en la vegetación, a la espera de encontrar un hospedador adecuado para alimentarse. Tras acceder al hospedador, se alimentan durante varios días e ingieren cantidades de sangre superiores a 100 veces su peso, excepto los machos que apenas toman sangre. Una vez alimentadas, vuelven al suelo para realizar la muda o la puesta de huevos. Las hembras de los ixódidos se

alimentan sólo una vez, depositan varios miles de huevos y mueren tras la oviposición (Sonenshine et al., 2002).

1.1. Fijación y toma de sangre.

Las garrapatas son telmófagos; para alimentarse perforan la piel del hospedador con el extremo distal dentado de los quelíceros a la vez que introducen el hipostoma, el cual actúa como elemento de anclaje. En los argásidos e ixódidos Prostriata (*Ixodes* spp.) el hipostoma y los quelíceros quedan en contacto directo con los tejidos del hospedador, mientras que en los ixódidos Metastriata sus glándulas salivales segregan el cemento, un líquido blanquecino constituido mayoritariamente por lipoproteínas, que se endurece alrededor de las piezas bucales formando un tubo cónico que actúa como elemento adicional de anclaje y aísla las piezas bucales de los tejidos del hospedador (Cuadro 1).

Durante la perforación de la piel, los quelíceros y el hipostoma desgarran los capilares de la dermis provocando una hemorragia y formando un pequeño absceso o cavidad de alimentación en el extremo de los apéndices bucales, desde el cual las garrapatas comienzan a succionar la sangre y los exudados tisulares que fluyen hacia dicha cavidad (Kemp et al., 1982; Encinas-Grandes et al., 1999).

Para poder ingerir toda la sangre que necesitan, las garrapatas deben neutralizar las repuestas defensivas del hospedador y, como veremos más adelante, con ese fin han desarrollado una saliva de composición compleja, repleta de moléculas farmacológicamente activas que es inoculada al hospedador durante la alimentación. Estas moléculas, junto con la propia respuesta defensiva del hospedador, participan en la formación de la lesión de alimentación. Las garrapatas inoculan la saliva y succionan la sangre a través del mismo canal, de manera que realizan ambas funciones alternativamente durante todo el tiempo que tardan en completar la toma de sangre (Bowman et al., 2008; Francischetti et al., 2009).

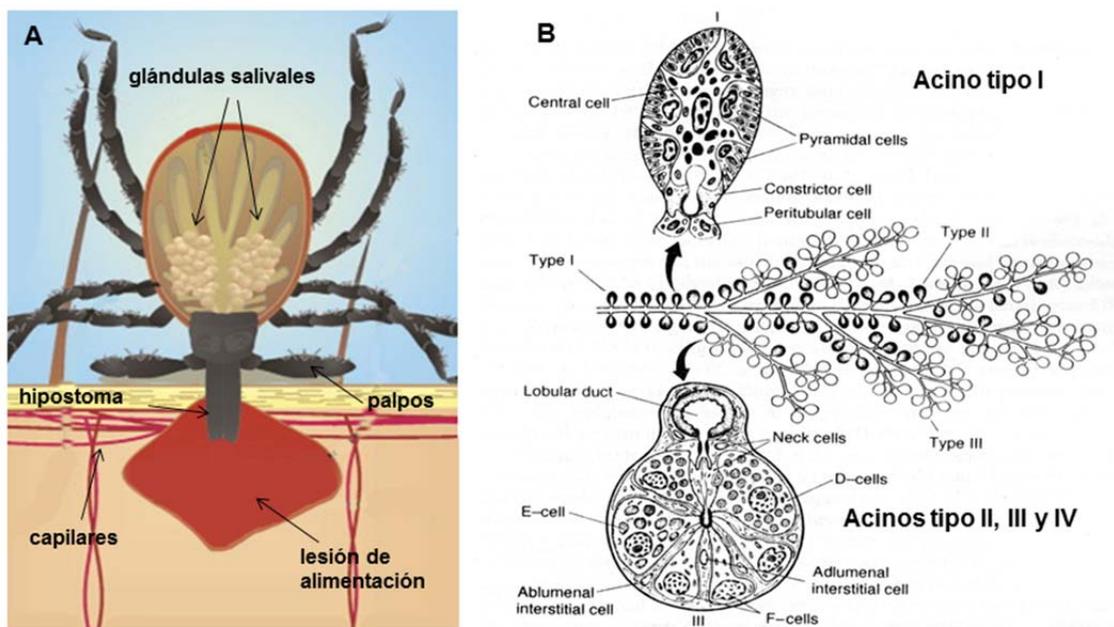
1.2. Glándulas salivales.

La saliva es producida por las glándulas salivales, que en garrapatas son complejos órganos multifuncionales encargados no sólo de la síntesis y secreción del cemento y la propia saliva, sino también de la regulación del balance hídrico y salino (osmoregulación). Para ello, las glándulas salivales absorben humedad ambiental cuando la garrapata está alejada del hospedador y eliminan el exceso de agua e iones resultantes de la concentración de la sangre durante el proceso de alimentación, incorporándolos a la saliva y reinoculándolos así al hospedador (Bowman et al., 2008).

Las glándulas salivales están localizadas a ambos lados en la mitad anterior del cuerpo y son de tipo acinar o racemoso. Cada glándula consta de un canal o conducto salival, extensamente ramificado, alrededor del cual se disponen las células secretoras formando acinos. Existen cuatro tipos de acinos, cada uno de los cuales está constituido por tipos celulares distintos, segrega componentes distintos y realiza funciones diferentes (Cuadro 1).

Los acinos de tipo I son de tipo agranular, pues sus células carecen de gránulos de secreción, y su función es producir una saliva rica en sales higroscópicas que se extiende por las piezas bucales cuando la garrapata no está en el hospedador. Estas sales absorben humedad ambiental y posteriormente son ingurgitadas, lo que permite a la garrapata obtener el agua necesaria.

Los acinos tipo II, III y IV son de tipo granular, ya que están constituidos por células secretoras con abundantes gránulos de secreción cuyo contenido es vertido a la saliva durante el proceso de alimentación. En los ixódidos, parte de las moléculas secretadas a la saliva se encuentran sintetizados y almacenados en esos gránulos, mientras que el resto de los componentes salivales son sintetizados *de novo* a lo largo de la alimentación. En los argásidos, al ser hematófagos de alimentación rápida, todos los componentes de su saliva se encuentran ya sintetizados, almacenados en los gránulos y listos para ser secretados cuando los parásitos acceden a sus hospedadores. En cuanto a las funciones de estos acinos granulares, los de tipo II son los encargados de sintetizar a las moléculas salivales con actividad farmacológica y, en consecuencia, están presentes tanto en argásidos como en ixódidos. Los de tipo III son los encargados de segregar el cemento y, por tanto, sólo los poseen los ixódidos. En cuanto a los de tipo IV, sólo están presentes en los machos de los ixódidos y su función es segregar una saliva lubricante, rica en glicoproteínas, que no participa en la alimentación, sino que sirve para facilitar la transferencia del espermátforo a la hembra durante la cópula (Kemp et al., 1982; Bowman et al., 2008).



Cuadro 1. A. Garrapata fijada a la piel del hospedador alimentándose. B. Modelo de glándula salival y de los acinos de tipo I (agranulares) y de tipo II, III y IV (granulares) (Bowman et al., 2008).

2. RESPUESTAS DEFENSIVAS DEL HOSPEDADOR DURANTE LA ALIMENTACIÓN DE LAS GARRAPATAS.

Como acabamos de mencionar, la fijación de las garrapatas a la piel del hospedador causa una lesión vascular, la cual dispara las respuestas defensivas del hospedador, que incluyen la respuesta hemostática, la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunitaria.

La respuesta hemostática es la encargada de detener la hemorragia y comprende varios procesos interconectados como son la vasoconstricción, la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis. La respuesta inflamatoria está destinada a reparar el tejido dañado y constituye también la primera línea de defensa frente a los microorganismos que puedan haber penetrado a través de la lesión. En esta respuesta intervienen varios mecanismos moleculares y celulares del sistema innato de defensa, como el sistema de las cininas (bradicinina), las anafilotoxinas liberadas tras activarse la vía alternativa del complemento, la histamina liberada por los mastocitos, así como los fagocitos polimorfonucleares (neutrófilos). Por su parte, la respuesta inmunitaria específica requiere la activación de los linfocitos T y B y la producción de anticuerpos específicos frente a los inmunógenos salivales, por lo que es el mecanismo defensivo que tarda más tiempo en activarse, de modo que en un primer contacto no afectaría a la garrapata que la dispara, pero puede afectar a otros ejemplares en contactos secundarios.

Todas estas respuestas defensivas han sido revisadas recientemente y con gran detalle por diversos autores (Titus et al., 2006; Maritz-Olivier et al., 2007; Brossard y Wikel, 2008; Francischetti et al., 2009; Ribeiro y Arcà, 2009; Schroeder et al., 2009; Fontaine et al., 2011; Mans, 2011; Chmelar et al., 2012; Kazimírová y Štibrániová, 2013; Štibrániová et al., 2013; Wikel, 2013). Basándonos en dichas revisiones describimos a continuación los principales mecanismos defensivos del hospedador frente a las garrapatas.

2.1. Respuesta hemostática.

Comenzando por **la agregación plaquetaria y la vasoconstricción**, hay que señalar que estos mecanismos son de acción inmediata y bastarían por sí solos para detener la hemorragia en los vasos más pequeños, como los capilares de la dermis, impidiendo la alimentación de la garrapata (Cuadro 2).

En condiciones normales, las plaquetas expresan en su superficie diversas integrinas. Éstas actúan como receptores para el colágeno y otras proteínas insolubles de la matriz extracelular (integrinas $\alpha 2\beta 1$ y GPVI) o como receptores para el fibrinógeno, que es una proteína que está en forma soluble en el plasma (integrina $\alpha 11\beta 3$). En condiciones basales estas integrinas están inactivas y no reconocen a sus ligandos; en consecuencia las plaquetas inactivas no se adhieren entre sí, ni a la pared de los vasos sanguíneos. Junto a estas integrinas, las plaquetas inactivas también expresan constitutivamente receptores para diversas moléculas activadoras (o agonistas) como el ADP, la trombina, el tromboxano A_2

(TXA₂) y la serotonina (5-HT), así como receptores para moléculas inhibitoras (o antagonistas) como la prostaciclina (PGI₂).

Cuando una garrapata perfora la pared de un vaso sanguíneo, las células endoteliales dañadas vierten ADP y ATP al plasma, al tiempo que dejan expuestas a la sangre a las proteínas de la matriz extracelular, como el ya citado colágeno. El ADP activa inmediatamente a las plaquetas, las cuales experimentan numerosos procesos.

Primero, un cambio conformacional en sus integrinas de superficie que les permite unirse a sus ligandos promoviendo la adhesión de las plaquetas activas a la pared del vaso dañado a través del colágeno y a otras plaquetas a través de puentes de fibrinógeno, originándose un agregado plaquetario en el lugar de la lesión.

En segundo lugar, las plaquetas activas expresan P-selectina en su superficie. La P-selectina promueve la adhesión y activación de los neutrófilos a través del receptor de P-selectina en el neutrófilo (la molécula P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1), de modo que éstas células se incorporan al trombo plaquetario contribuyendo a detener la hemorragia. Además, los neutrófilos adheridos y activos, entre otras acciones, emiten micropartículas fuertemente procoagulantes por ser portadoras del factor tisular (Hrachovinova et al., 2003), las cuales se adhieren a las plaquetas activadas mediante la interacción entre P-selectina (en la plaqueta) y PSGL-1 (en la micropartícula). Éste mecanismo contribuye a generar trombina y fibrina exactamente en el lugar de la lesión, evitando una coagulación vascular diseminada y, a la vez, estabilizando el trombo plaquetario (Polgar et al., 2005; Zarbock et al., 2007).

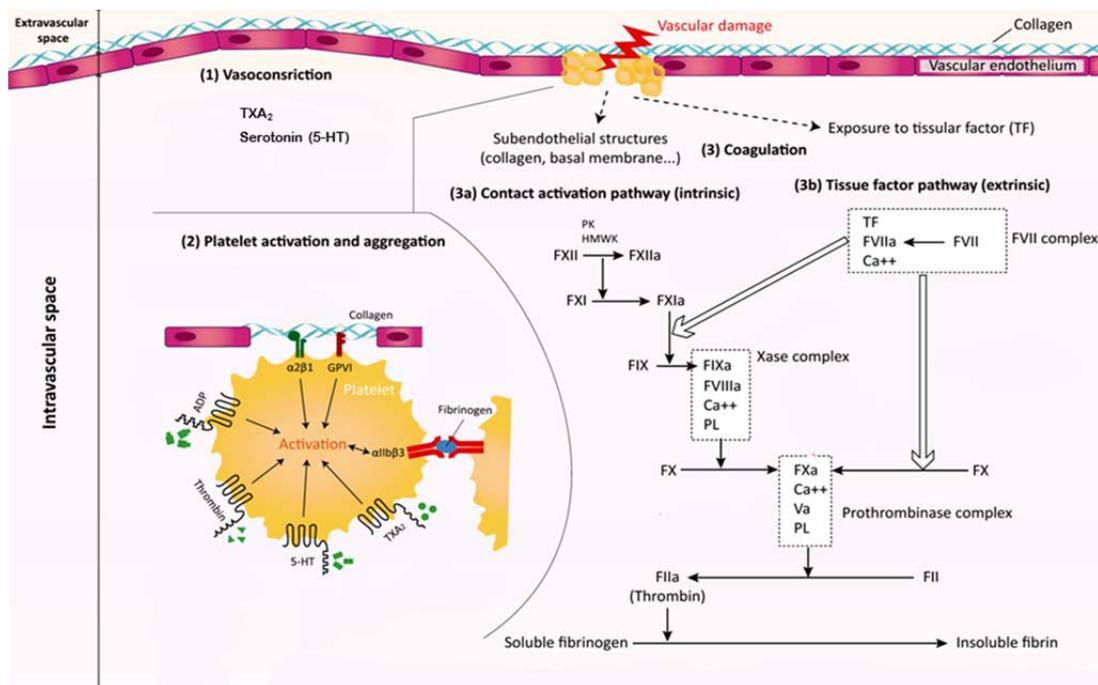
Por último, las plaquetas activadas segregan varias moléculas con importantes funciones hemostáticas. Por una parte segregan ADP, trombina, TXA₂ y serotonina, las cuales reclutan y activan nuevas plaquetas, amplificando el trombo plaquetario; además, el TXA₂ y la serotonina son también potentes vasoconstrictores que restringen el flujo de sangre en la zona dañada. Y por otra parte, las plaquetas activas también producen prostaciclina, que tiene propiedades inversas a las anteriores, es decir, es un agente vasodilatador y antiagregante, y actúa como antagonista funcional en la regulación fisiológica de la hemostasia. Adicionalmente, la serotonina contribuye a la activación de las células endoteliales, las cuales expresan moléculas de adhesión celular (ICAM-1, E-selectina y P-selectina), que promueven la adhesión y posterior extravasación de los leucocitos (principalmente neutrófilos), que contribuirán al desarrollo de la respuesta inflamatoria (ver más adelante).

Junto a la agregación plaquetaria y la vasoconstricción, el daño vascular también activa al **sistema de la coagulación**. Este sistema está constituido por un conjunto de proteasas, mayoritariamente serina-proteasas, que se encuentran en forma inactiva o proenzima en el plasma y que se activan secuencialmente generando una cascada de amplificación. El sistema tiene como finalidad generar trombina, cuya misión, a su vez, es la de generar fibrina, proteína que en unión con las plaquetas forma el coágulo que tapona las heridas. Este sistema puede iniciarse por dos vías: la intrínseca -o de contacto- y la extrínseca; ambas tienen como objetivo

la activación de una misma molécula, el factor X activo, con el que se inicia la denominada vía común de la cascada de la coagulación (Cuadro 2).

La vía intrínseca se inicia cuando el factor XII entra en contacto con el colágeno subendotelial y con superficies cargadas negativamente que quedan expuestas a la sangre al producirse el daño vascular. La extrínseca se inicia mediante la asociación del factor VII con el factor tisular subendotelial, que está presente en la membrana de la mayoría de las células. Esta vía extrínseca es de respuesta instantánea y tiene como objetivo generar inmediatamente pequeñas cantidades de factor X activo y de trombina. La misión de la trombina en este punto es esencialmente la amplificación de ambas vías mediante la retroactivación de otros factores de la cascada, fundamentalmente los factores VIII y V. Una vez iniciada la vía común, el factor X activo, en unión con el factor V activo, calcio y fosfolípidos forman el complejo protrombinasa, que transforma muy activamente la protrombina en trombina. La trombina, finalmente, transforma el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, que es el primer componente del coágulo y sirve de sustrato de unión para las plaquetas (Chmelar et al., 2012).

La regulación de la respuesta hemostática se completa con **la fibrinólisis**, que es el proceso natural de solubilización del coágulo de fibrina. La fibrinólisis es iniciada por los activadores del plasminógeno, como el activador tisular del plasminógeno (tPA) y la urokinasa (uPA), quienes convierten el plasminógeno en plasmina activa, la cual degrada la malla de fibrina, disolviendo el coágulo. La plasmina también está implicada en la degradación de la matriz extracelular, lo que es importante para la angiogénesis y la cicatrización de la herida (Maritz-Olivier et al., 2007).



Cuadro 2. Representación esquemática de la respuesta hemostática al daño vascular producido por la alimentación de las garrapatas (Fontaine et al., 2011).

2.2. Respuesta inmunitaria innata (inflamación).

Íntimamente conectado con la coagulación, y ligado a ésta con la respuesta inflamatoria, está el sistema de las cininas. Las cininas son péptidos que se liberan de unas moléculas precursoras, los cininógenos, por la acción de unas proteasas conocidas como calicreinas. Las calicreinas se encuentran en forma inactiva o precalicreina en el plasma formando complejos equimoleculares con los cininógenos. Tras el daño vascular, el factor XII de la coagulación, una vez activo, transforma a la precalicreina en calicreina. La calicreina, por una parte, activa a más factor XII creando un asa de amplificación; por otra, transforma al cininógeno de alto peso molecular en bradicinina y, por último, hidroliza al componente C5 del complemento generando la anafilotoxina C5a e interconectando la coagulación con la inflamación y el sistema inmunitario. La bradicinina resultante de la activación de este sistema, al igual que otros péptidos vasoactivos como las anafilotoxinas, es un potente activador del endotelio vascular y, además, es un agonista del sistema nervioso que ocasiona dolor. Ambas acciones pueden tener consecuencias muy perjudiciales para las garrapatas (ver a continuación).

Otro de los mecanismos que intervienen en la respuesta inflamatoria aguda es el sistema del complemento. Éste es una pieza clave en el sistema defensivo, con importantes acciones sobre la hemostasia y el endotelio vascular, por lo que influye en la toma de sangre y las garrapatas, necesariamente, han de neutralizar sus acciones. Este sistema puede activarse hasta por cuatro vías: la clásica, que requiere anticuerpos específicos para su iniciación, por lo que, en los contactos primarios, no es operativa hasta los 5-7 días; la alternativa, que se inicia directamente por la deposición de C3b sobre carbohidratos; la de las lectinas, que es iniciada por carbohidratos tipo mananos (Nonaka y Yoshizaki, 2004) y la recientemente descubierta de la trombina, la cual puede activar directamente al componente C3 conectando a este sistema con el de la coagulación (Paul, 2008). Estas tres últimas vías son operativas de forma inmediata, tanto en contactos primarios como en contactos secundarios.

La activación del complemento produce fundamentalmente tres efectos: la lisis de las células diana, la opsonización de los organismos invasores y la inflamación tisular. De estas tres acciones, a las garrapatas, previsiblemente, sólo les afectan las relacionadas con la inflamación tisular inducida por las anafilotoxinas generadas durante la activación del sistema (C3a, C4a y C5a). Estas moléculas, junto con otros agonistas proinflamatorios como la bradicinina y la serotonina, activan el endotelio vascular produciendo un incremento de la permeabilidad vascular, así como el reclutamiento, extravasación, activación y desgranulación de neutrófilos (y de los mastocitos residentes) que liberan mediadores proinflamatorios adicionales (incluyendo leucotrienos e histamina), los cuales, a su vez, reclutan nuevas células inflamatorias. El resultado es un tejido cutáneo edematoso que aleja a la garrapata de los capilares y la obliga a alimentarse, no de sangre, sino de un exudado rico en leucocitos y en sus productos citotóxicos, lo que puede provocarle la muerte o una reducción de su fertilidad. Además, el prurito y el dolor, ocasionados por la histamina y la bradicinina, pueden alertar al hospedador induciendo en él comportamientos defensivos como el rascado, que en el mejor de los casos interrumpiría la alimentación de la garrapata y, en el peor, podría provocar su muerte.

2.3. Respuesta inmunitaria específica.

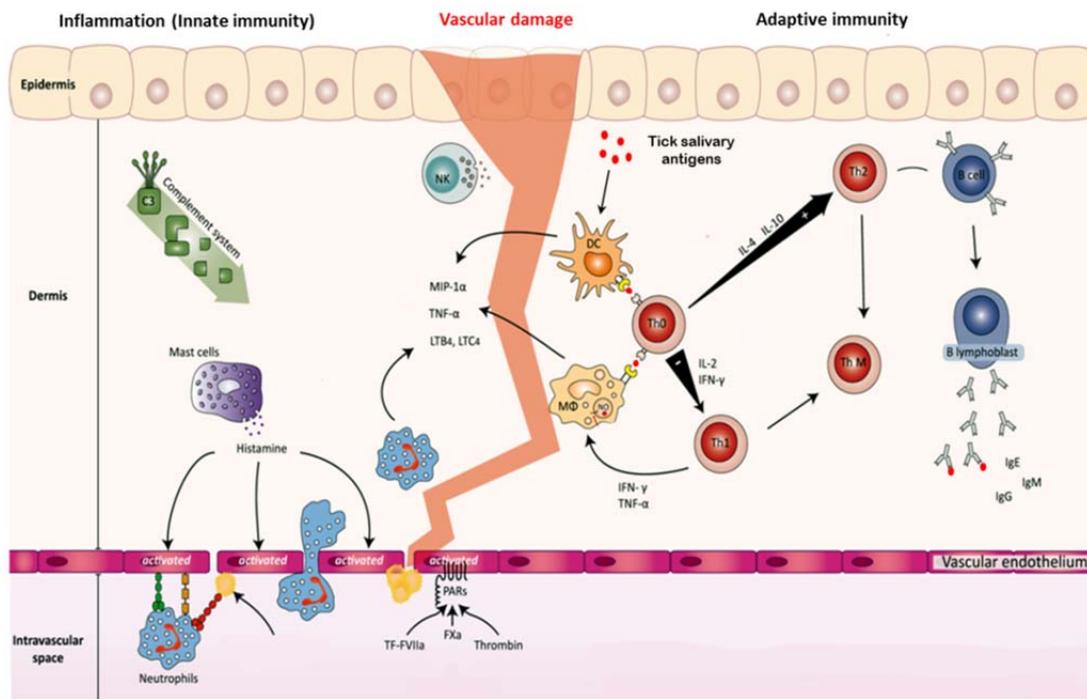
El proceso de alimentación de las garrapatas también induce en sus hospedadores complejas respuestas inmunitarias, algunas de las cuales no generan protección frente a la garrapata, al tiempo que otras proporcionan cierto grado de resistencia frente al parásito.

Por lo general, esta resistencia consiste en el bloqueo de la alimentación, la reducción de la fertilidad y a veces en la muerte de la garrapata (Brossard y Wikel, 2008). En consecuencia, es importante distinguir los mecanismos inmunológicos que no generan protección de aquellos que sí lo hacen, sobre todo con vistas al desarrollo de vacunas anti-garrapata. Esta distinción no es fácil porque no existe un modelo universal de respuesta inmunitaria anti-garrapata, sino que ésta varía en función de diversos factores como la especie de garrapata y hospedador implicados, la edad del hospedador y su historia de exposición previa (Ribeiro y Arcà, 2009).

No obstante, y pese a lo que acabamos de mencionar, la mayoría de revisiones sobre este tema describen una respuesta inmunitaria genérica frente a las garrapatas que tendría lugar de la siguiente manera (Cuadro 3).

En un primer contacto, las moléculas inmunogénicas de la saliva son capturadas por las células presentadoras de antígenos (APC), en este caso las células dendríticas de la dermis, que los fragmentan proteolíticamente y expresan en su superficie asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de la clase II (MHC-II). Estas células migran a los ganglios linfáticos próximos al lugar de la picadura y allí presentan los antígenos salivales a los linfocitos T CD4+ indiferenciados (Th0). Los linfocitos reconocen específicamente al complejo MHC-II/antígeno a través de su receptor de antígenos (el complejo TCR-CD4) y, tras recibir las oportunas señales coestimuladoras, se activan y expanden clonalmente diferenciándose en linfocitos Th1 o en linfocitos Th2. Esta diferenciación depende en gran medida de las señales coestimuladoras proporcionadas por las citocinas presentes en el medio en el momento de la presentación antigénica. Por ejemplo, la IL-4 e IL-10 inducen respuestas Th2, mientras que el IFN γ y la IL-12 inducen respuestas Th1. Una vez activos, los linfocitos Th1 y Th2 segregan nuevas citocinas, diferentes en cada caso, y éstas ponen en marcha distintos mecanismos inmunitarios.

En las respuestas Th2 los linfocitos segregan citocinas como IL-4, IL-5, e IL-13, que estimulan la producción de anticuerpos específicos (IgG e IgE) por los linfocitos B, así como la movilización de mastocitos y eosinófilos, propiciando el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad inmediata, que potencialmente pueden proteger frente a hematófagos de alimentación rápida. Por el contrario, en las respuestas Th1, las citocinas segregadas por los linfocitos, principalmente IFN γ e TNF- α , estimulan respuestas mediadas esencialmente por macrófagos y basófilos, que conducen al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad retardada, potencialmente protectoras frente a hematófagos de alimentación lenta (Francischetti et al., 2009; Fontaine et al., 2011) (Cuadro 3).

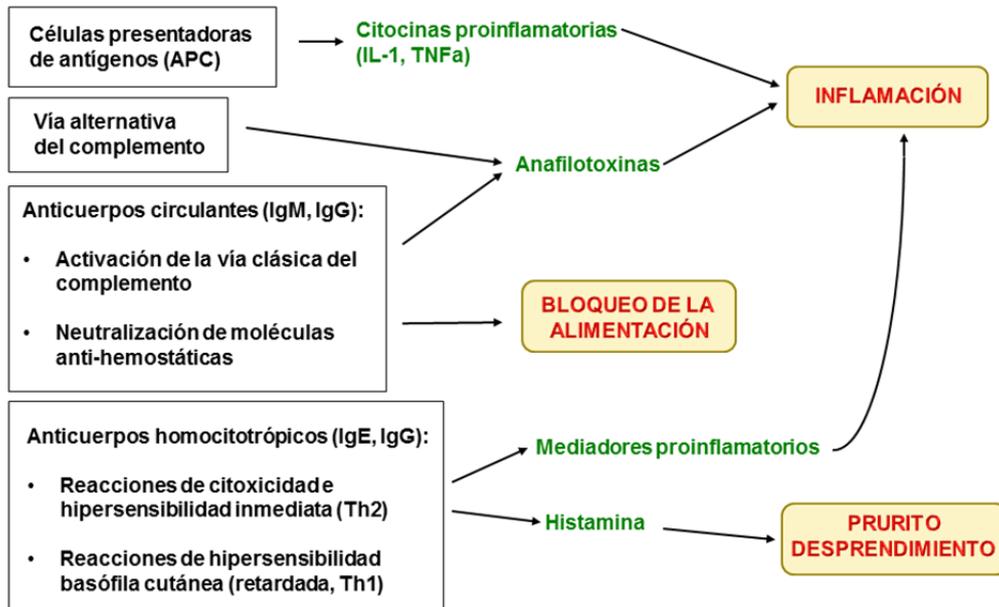


Cuadro 3. Representación esquemática de la respuesta inflamatoria y la inmunitaria específica al daño vascular producido por la alimentación de las garrapatas (Fontaine et al., 2011).

De estos mecanismos, los que más pueden afectar a la garrapata proporcionando al hospedador cierto grado de resistencia serían los siguientes (Cuadro 4).

1. Reacciones inflamatorias en el punto de fijación, inducidas por las anafilotoxinas generadas tras la activación del complemento por la vía clásica, o bien por citocinas proinflamatorias, como la IL-1 y el TNF α , que son segregadas por las propias células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos) cuando son estimuladas.
2. Anticuerpos circulantes, que pueden neutralizar moléculas antihemostáticas esenciales para la toma de sangre, o activar la vía clásica del complemento, provocando las acciones ya mencionadas, y también anticuerpos homocitotrópicos, que, tras sensibilizar a mastocitos y eosinófilos, pueden participar en reacciones de hipersensibilidad inmediata y citotoxicidad.
3. Reacciones de hipersensibilidad basófila cutánea, que son un tipo de hipersensibilidad retardada (12-24 horas) mediada por respuestas Th1. En estas reacciones, los basófilos sensibilizados con anticuerpos, al desgranularse en contacto con el antígeno, liberan mediadores proinflamatorios, como los leucotrienos y la histamina. Estas moléculas ejercen sus acciones anti-garrapata indirectamente a través de la activación del endotelio, la quimiotaxis y la activación de los leucocitos; en definitiva, generando una

respuesta inflamatoria local. Además, la histamina puede ejercer sobre las garrapatas un efecto negativo directo, inhibiendo su alimentación y provocando su desprendimiento prematuro (Allen y Kemp, 1982).



Cuadro 4. Principales mecanismos de la respuesta inmunitaria específica capaces de generar resistencia frente a las garrapatas.

3. FUNCIONES DE LA SALIVA DURANTE LA ALIMENTACIÓN: INTERÉS Y APLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS SALIVALES.

Para completar la toma de sangre, las garrapatas deben neutralizar necesariamente las respuestas defensivas anteriores. Para ello, a lo largo de la coevolución con sus hospedadores, han desarrollado una saliva de composición compleja y redundante, que refleja la complejidad y redundancia de las defensas del hospedador (Francischetti et al., 2009; Kazimírová y Štibrániová, 2013).

Dicha saliva contiene (i) moléculas antihemostáticas, que permiten a la garrapata mantener la hemorragia, (ii) moléculas antiinflamatorias, que, entre otras acciones, evitan el prurito y el dolor de la picadura, permitiéndoles pasar desapercibidas, y (iii) moléculas inmunomoduladoras, que permiten a las garrapatas alimentarse sobre hospedadores sensibilizados en contactos previos.

Todas estas moléculas modifican significativamente la fisiología del hospedador en el sitio de alimentación permitiendo no sólo la alimentación de las garrapatas, sino también facilitando la infección por los agentes patógenos que las propias garrapatas transmiten. A este fenómeno, presente en garrapatas y en otros vectores hematófagos, se le ha denominado “transmisión asistida por la saliva” (Nuttall y Labuda, 2008).

Debido a sus variadas actividades biológicas, las moléculas salivales de las garrapatas han despertado un gran interés por su potencial utilidad práctica: (i) en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de trastornos vasculares, inflamatorios o autoinmunes; (ii) como dianas antigénicas para el desarrollo de vacunas anti-garrapata y vacunas bloqueantes de la transmisión de patógenos y (iii) como marcadores biológicos de exposición a vectores, es decir, como antígenos para el serodiagnóstico de los parasitismos por garrapatas, de aplicación en estudios epidemiológicos para localizar poblaciones de estos parásitos o para medir el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por garrapatas al que están expuestas las poblaciones de hospedadores (Hovius et al., 2008; Willadsen, 2008; Ribeiro y Arcà, 2009; Fontaine et al., 2011; Chmelar et al., 2012). Este interés, y la hipótesis de que toda proteína secretada a la saliva previsiblemente tendrá al menos una función específica en la regulación de las relaciones garrapata-hospedador-patógeno (Ribeiro et al., 2011), ha impulsado desde hace varias décadas el estudio de la saliva de estos parásitos con objeto de identificar sus moléculas y caracterizar su actividad y funciones. Como resultado de estos estudios se han identificado y caracterizado, total o parcialmente, más de 50 proteínas salivales con actividad farmacológica.

En los apartados que siguen comentamos primero los métodos utilizados en el estudio de la composición salival de las garrapatas, prestando especial atención a los nuevos métodos de análisis masivo. A continuación, revisamos el repertorio de proteínas salivales ya caracterizadas y, finalmente, analizamos la utilización de antígenos salivales de garrapata en el desarrollo de herramientas para el diagnóstico serológico de los parasitismos por garrapatas y en el desarrollo de vacunas anti-garrapata. En el último apartado señalamos brevemente las más modernas aproximaciones para la identificación de potenciales antígenos vacunales.

4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SALIVA: OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL SIALOMA.

Los métodos de estudio de la composición de la saliva han experimentado una notable evolución en los últimos 20 años. Los primeros estudios se llevaban a cabo individualmente, proteína a proteína, empezando por la purificación de dicha proteína a partir de un extracto para llegar a la identificación y clonaje del gen correspondiente. Los métodos actuales, por el contrario, utilizan aproximaciones reversas en las que se parte de secuencias codificantes identificadas en un análisis genómico o transcriptómico, para, pasando por la obtención de las proteínas en forma recombinante, llegar finalmente al establecimiento de su función y a la verificación de su presencia en la saliva de la garrapata.

En los estudios clásicos se comenzaba preparando un extracto de las glándulas salivales (el denominado SGE) o bien, aunque menos frecuentemente, obteniendo una muestra de saliva. El SGE/saliva se fraccionaba sucesivamente por métodos bioquímicos hasta aislar un componente con una determinada actividad farmacológica, por ejemplo, un anticoagulante inhibidor de la trombina. Acto seguido, se obtenía la secuencia aminoterminal de ese componente, o la de fragmentos peptídicos internos, y con esas secuencias se diseñaban oligonucleótidos que se utilizaban como sondas para analizar genotecas de cDNA y aislar el gen correspondiente. Una vez clonado el gen, se producía la proteína en forma recombinante y se realizaban las oportunas pruebas de actividad. El uso de SGE como material de partida, en lugar de saliva, reunía las ventajas de ser más fácil de obtener y producir un mayor rendimiento en proteínas. El inconveniente es que su composición no es exactamente igual a la de la saliva, ya que el SGE puede contener una alta proporción de proteínas intracelulares procedentes de la lisis celular, que no son realmente secretadas a la saliva (Chmelar et al., 2012).

En los 10 últimos años, los grandes avances técnicos en el campo de la secuenciación masiva y la espectrometría de masas han impulsado un cambio radical en los métodos de estudio, pasando de los métodos de análisis individual a los métodos de análisis masivo. La aplicación de estos métodos al estudio de las glándulas salivales de las garrapatas ha facilitado la obtención y análisis de sus transcriptomas y proteomas. De acuerdo con la terminología introducida por Mans et al. (2008a), al transcriptoma de las glándulas salivales se le denomina sialotranscriptoma, al proteoma de la saliva/SGE sialoproteoma, y al conjunto de sialotranscriptoma + sialoproteoma se le denomina sialoma.

Para obtener el transcriptoma se extrae el mRNA de las glándulas salivales, se fragmenta, transcribe a cDNA y se le añaden adaptadores a los extremos. La genoteca resultante se somete a secuenciación masiva y las secuencias obtenidas se analizan con las oportunas herramientas bioinformáticas incluyendo su depuración, ensamblaje, alineamiento, e identificación por comparación con las bases de datos de acceso público como la del National Centre for Biotechnology Information GeneBank (NCBI), la Protein families database (Pfam), la Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) o Gene Ontology (GO). El resultado final es una base de datos de transcritos salivales en la que las secuencias están agrupadas por familias proteicas y anotadas con sus posibles funciones.

Hasta la fecha, este análisis transcriptómico se ha efectuado con 15 especies de garrapatas, incluyendo ixódidos y argásidos (ver tabla a continuación). Para varias de esas especies, junto al transcriptoma se ha obtenido también el proteoma de su SGE, lo que ha permitido verificar la expresión de determinados transcritos en la glándula salival, o bien el proteoma de su saliva, confirmando su secreción a ese fluido. En líneas generales, para la obtención de estos proteomas la muestra se resolvió por electroforesis (mono o bi-dimensional) y las correspondientes bandas y spots se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y/o LC-MS/MS.

A las 15 especies anteriores añadimos *O. erraticus* y *O. moubata*, para las cuales nuestro equipo ha llevado a cabo algunos análisis iniciales del proteoma de su SGE mediante electroforesis 2D y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. En dichos análisis sólo se llegaron a identificar 6 proteínas en *O. erraticus* y 12 en *O. moubata* (Oleaga et al., 2007; Pérez-Sánchez et al., 2010b).

Especies de garrapatas en las que se han llevado a cabo análisis transcriptómicos y/o proteómicos de sus glándulas salivales.

Especie	Análisis		Referencias
	Transcriptoma	Proteoma	
<i>Ixodes ricinus</i>	X		Chmelar et al., 2008
<i>Ixodes scapularis</i>	X	X (Saliva)	Valenzuela et al., 2002; Ribeiro et al., 2006
<i>Ixodes pacificus</i>	X		Francischetti et al., 2005
<i>Amblyomma variegatum</i>	X	X	Ribeiro et al., 2011
<i>Amblyomma maculatum</i>	X		Karim et al., 2011
<i>Amblyomma cajennense</i>	X		Batista et al., 2008
<i>Amblyomma americanum</i>	X		Aljamali et al., 2009a
<i>Rhipicephalus microplus</i>	X		Santos et al., 2004; Wang et al., 2007
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	X	X (Saliva)	Anatriello et al., 2010; Oliveira et al., 2013
<i>Dermacentor andersoni</i>	X		Alarcon-Chaidez et al., 2007
<i>Hyalomma marginatum</i>	X	X	Francischetti et al., 2011
<i>Argas monolakensis</i>	X	X	Mans et al., 2008a
<i>Ornithodoros parkeri</i>	X	X	Francischetti et al., 2008a
<i>Ornithodoros coriaceus</i>	X	X	Francischetti et al., 2008b
<i>Ornithodoros moubata</i>		X	Oleaga et al., 2007; Pérez-Sánchez et al., 2010a
<i>Ornithodoros erraticus</i>		X	Oleaga et al., 2007
<i>Antricola delacruzi</i>	X		Ribeiro et al., 2012

Con el objetivo de ofrecer una perspectiva global sobre las proteínas salivales de las garrapatas y, sobre todo, de identificar al conjunto de proteínas del sialoma que son secretadas a la saliva (también denominado secretoma salival), Francischetti et al. (2009) recopilaron y analizaron todas las secuencias salivales publicadas hasta esa fecha, clasificándolas en dos grandes categorías según la presencia/ausencia de señales de secreción clásica (péptido señal).

Así clasificaron 3.453 secuencias como proteínas potencialmente secretadas y otras 4.531 secuencias como proteínas potencialmente intracelulares o “housekeeping”, encargadas del metabolismo celular. Dentro de estas dos categorías clasificaron las proteínas en grupos de acuerdo con su función (real o teórica) y/o su pertenencia a familias proteicas.

Este mismo esquema, con mínimas variaciones, ha sido utilizado en el análisis y clasificación de los transcritos/proteínas de los sialomas de otras especies obtenidos con posterioridad a esa fecha, la mayoría de ellos por este mismo grupo de investigadores (Francischetti et al., 2011).

Según estos autores, el análisis de todos esos sialomas reveló lo siguiente:

1. La composición de la saliva de las garrapatas es una mezcla mucho más compleja de lo que se preveía, conteniendo cientos (en argásidos) o miles (en ixódidos) de proteínas.
2. Muchas de esas proteínas son previsiblemente nuevas y únicas entre todos los organismos conocidos, en vista de que no se parecen a ninguna de las proteínas depositadas en las bases de datos.
3. Las proteínas salivales más abundantes forman familias multigénicas de hasta 30 miembros distintos, frecuentemente con funciones redundantes, los cuales son expresados secuencialmente a lo largo del proceso de alimentación (Chmelar et al., 2008). De este modo pueden compensar la neutralización por el sistema inmunitario, y consiguiente pérdida de función, evadiendo la respuesta defensiva del hospedador.
4. Para una gran proporción de las proteínas del sialoma de cualquier garrapata aún no es posible predecir su función. De hecho, menos del 5 % de las proteínas del sialoma de cualquier garrapata han sido expresadas y su función verificada, de modo que familias proteicas enteras esperan su caracterización funcional. Cabe suponer que las proteínas potencialmente secretadas con función desconocida previsiblemente llevarán a cabo alguna actividad antihemostática, antiinflamatoria o inmunosupresora, e incluso antiangiogénica o anti-microbiana (Ribeiro et al., 2011; Chmelar et al., 2012).
5. Las proteínas clasificadas como intracelulares/housekeeping suelen ser muy numerosas en los transcriptomas analizados (en torno al 60 %). Esto es lógico si tenemos en cuenta que el material analizado es la glándula salival completa y no la saliva.

En relación con dichas proteínas intracelulares, los autores de estos sialomas sugieren que algunas de ellas tal vez puedan ser objeto de secreción específica a la saliva, aunque por vías distintas de las clásicas, y que, si esto se confirma mediante su identificación en los análisis proteómicos de dicho fluido, sus secuencias podrían conducir a la identificación de nuevas familias de proteínas secretadas (Francischetti et al., 2009).

5. ANTIHEMOSTÁTICOS, ANTIINFLAMATORIOS E INMUNOMODULADORES DE LA SALIVA DE LAS GARRAPATAS.

El repertorio de proteínas salivales de garrapata con funciones anti-defensivas ha sido objeto de revisiones más o menos periódicas desde los años 90 hasta la actualidad.

Tradicionalmente, en estas revisiones se recopila a las proteínas salivales agrupándolas según el tipo de función anti-defensiva que desempeñan y, en consecuencia, se exponen siguiendo la secuencia temporal de las respuestas a las que interfieren. Según el objetivo concreto de cada revisión, se atiende preferentemente a los componentes antihemostáticos (Champagne y Valenzuela, 1996; Maritz-Olivier et al., 2007; Anderson y Valenzuela, 2008; Ribeiro y Arcà, 2009; Mans, 2011; Chmelar et al., 2012), o a los antiinflamatorios e inmunomoduladores (Wikel et al., 1996; Brossard y Wikel, 2008; Schroeder et al., 2009), aunque en algunas de estas revisiones se recopila todo el repertorio de proteínas salivales caracterizadas (Hovius et al., 2008; Fontaine et al., 2011; Kazimírová y Štibrániová, 2013; Štibrániová et al., 2013; Wikel, 2013).

En las revisiones mencionadas se pone de manifiesto que las garrapatas han desarrollado moléculas capaces de interferir todas y cada una de las respuestas defensivas del hospedador (sistémicas y locales) y en prácticamente todas y cada una de sus fases. Dado que las respuestas defensivas del hospedador son redundantes, también lo son las funciones de las moléculas salivales de las garrapatas, de modo que en una misma especie puede haber varias moléculas que realicen la misma función y, al mismo tiempo, moléculas multifuncionales capaces de realizar varias acciones distintas. En algunos casos la saliva posee moléculas que ejercen funciones aparentemente contradictorias (ver más adelante el paradigma de la histamina), lo que refleja la complejidad de las interacciones moleculares entre las garrapatas y sus hospedadores. En los siguientes apartados suministramos ejemplos representativos de dichas moléculas.

5.1. Moléculas reguladoras de la hemostasia.

Incluimos aquí básicamente a los antiagregantes, vasodilatadores, anticoagulantes y agentes profibrinolíticos.

5.1.1. Antiagregantes.

Las garrapatas han desarrollado numerosas moléculas salivales con actividad antiagregante plaquetaria, lo cual indica claramente la importancia que tiene para ellas neutralizar este mecanismo. Estos antiagregantes, según su modo de acción, se pueden clasificar en tres grupos: apirasas, kratagonistas y péptidos tipo desintegrina.

Las apirasas o ATP-difosfohidrolasas son enzimas que hidrolizan el ATP y el ADP hasta AMP, evitando el efecto activador del ADP y el dolor de la picadura inducido por el ATP, que de otro modo podría alertar al hospedador e inducir en él comportamientos de defensa. Se ha detectado actividad apirasa en la saliva de la mayoría de los artrópodos hematófagos examinados, lo que da una idea de la importancia del ADP en la agregación plaquetaria y de la

necesidad de neutralizar su acción para hacer posible la toma de sangre. En las garrapatas, se ha detectado apirasa tanto en ixódidos como en argásidos y hasta la fecha se han clonado y expresado las de *O. savignyi* (Mans et al., 1998) y *R. microplus* (Liyou et al., 1999). La apirasa de *O. savignyi* es, de hecho, tan potente que puede desagregar plaquetas ya agregadas.

Los kratagonistas, según el término acuñado por Ribeiro y Arcá (2009), son proteínas que se unen con alta afinidad a moléculas pequeñas que actúan como activadores (o agonistas) de los receptores de la superficie celular, retirándolos del medio e impidiéndoles ejercer su función.

Casi todos estos kratagonistas pertenecen a la superfamilia de las lipocalinas, que son proteínas de pequeño tamaño (alrededor de 20 kDa) cuya principal función es el transporte de moléculas más pequeñas. Las lipocalinas son muy abundantes y ubicuas en la naturaleza y, aunque su secuencia de aminoácidos puede ser bastante divergente, presentan una estructura terciaria muy bien conservada en forma de barril (Skerra, 2000).

En la saliva de las garrapatas, la familia de las lipocalinas es una de las más relevantes tanto por el elevado número de sus miembros y sus altos niveles de expresión, como por sus múltiples y variadas funciones en la regulación de la hemostasia y la inflamación; funciones que desempeñan mediante el secuestro de diferentes agonistas (Oleaga et al., 2007; Mans y Ribeiro, 2008b, a; Mans et al., 2008c; Francischetti et al., 2009). Según el agonista que capturan, las lipocalinas salivales de las garrapatas pueden clasificarse en distintos grupos; no obstante, algunas de ellas pueden secuestrar varios de estos agonistas y, consecuentemente, desempeñar varias acciones distintas, pudiéndose incluir en más de uno de estos grupos:

1. Lipocalinas secuestradoras de TXA₂. Actúan como inhibidores de la agregación plaquetaria y la vasoconstricción: moubatina de *O. moubata*, TSGP3 de *O. savignyi* y longicornina de *Haemaphysalis longicornis*.
2. Lipocalinas secuestradoras de aminas biogénicas (histamina y serotonina). Actúan como antiagregantes e inhibidoras de la inflamación (bloqueando la activación del endotelio) y, además, evitan el prurito inducido por la histamina. Este grupo es el más numeroso y sus miembros son los más abundantes en la saliva. Se caracterizan por conservar el denominado motivo de unión a aminas biogénicas (biogenic amine binding, BAB), cuyo patrón más degenerado es CD[VIL]X₇₋₁₇EL[WX]X₃₋₃₀C (Mans et al., 2008c). Ejemplos conocidos y bien caracterizados de este grupo son TSGP1 de *O. savignyi*, monomina y monotonina de *Argas monolakensis* y SHBP de *H. longicornis*.
3. Lipocalinas secuestradoras de leucotrieno B₄ (LCB₄). Actúan como inhibidoras de la activación de los neutrófilos: moubatina de *O. moubata*, TGSP2 y TSGP3 de *O. savignyi*; y también lipocalinas secuestradoras de cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ y LTE₄), que desempeñan una acción antihemostática y antiinflamatoria al inhibir la acción vasodilatadora y activadora del endotelio de estos mediadores lipídicos: entre estas tenemos la AM-33 de *A. monolakensis* y la TSGP4 de *O. savignyi*.

4. Lipocalinas secuestradoras del componente C5 del complemento, que inhiben la formación de C5a ejerciendo igualmente una potente acción antiinflamatoria: OmCI de *O. moubata* (Nunn et al., 2005), así como las ya mencionadas TSGP2 y TSGP3 de *O. savignyi*.

Péptidos tipo desintegrina. Las plaquetas activas se adhieren entre sí mediante la interacción entre su integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ y el fibrinógeno, el cual actúa como molécula puente entre plaquetas y en el que dicha integrina reconoce a un motivo de tres aminoácidos (Arg-Gly-Asp, RGD) que sirve de sitio de unión. Las desintegrinas son péptidos que contienen el motivo RGD, lo que les permite inhibir competitivamente la unión al fibrinógeno bloqueando así la agregación plaquetaria. Estos péptidos son habituales en la saliva de todo tipo de hematófagos incluyendo a las garrapatas, en las cuales se han identificado al menos 8 moléculas de este tipo, tanto en argásidos como en ixódidos.

Los ejemplos mejor conocidos son: la savignigrina de *O. savignyi* y sus ortólogos identificados en *Ornithodoros coriaceus*, la monogrina de *A. monolakensis* y la variabilina de *Dermacentor variabilis* y sus ortólogos identificados en *Ixodes* spp. (ixodegrinas) (Chmelar et al., 2012). Un caso particular es la disagregina de *O. moubata*, que también se une a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, aunque, a diferencia de las anteriores, carece de motivo RGD en su secuencia (Karczewski et al., 1994).

Un péptido similar a las desintegrinas, el “tick adhesion inhibitor” (TAI) de *O. moubata*, así como la antes mencionada lipocalina longicornina, pueden inhibir competitivamente la unión de la integrina $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ al colágeno evitando de este modo la activación plaquetaria inducida por el colágeno subendotelial.

5.1.2. Vasodilatadores.

Además de bloquear la agregación plaquetaria, las garrapatas deben inhibir también la vasoconstricción inducida por el TXA_2 , la serotonina y los cisteinil-leucotrienos para mantener el flujo de sangre a la lesión de alimentación. Para ello utilizan parte de las lipocalinas ya mencionadas en el apartado anterior, las cuales retiran del medio a estas moléculas vasoconstrictoras. Además, en el caso de los ixódidos, éstos secretan en su saliva importantes cantidades de moléculas lipídicas como las prostaglandinas, fundamentalmente de PGE_2 y prostaciclina (PGI_2), que son potentes vasodilatadores (Champagne y Valenzuela, 1996), e incluso pueden provocar en el hospedador la liberación de vasodilatadores, como la histamina (Dai et al., 2010).

5.1.3. Anticoagulantes.

La coagulación sanguínea representa un notable obstáculo para la alimentación de las garrapatas y buena prueba de ello son los numerosos péptidos anticoagulantes con los que estos parásitos han dotado a su saliva. En todas las especies estudiadas se han encontrado péptidos anticoagulantes y en algunas de ellas se han identificado varios anticoagulantes que actúan sobre distintas dianas. Mayoritariamente estos anticoagulantes son inhibidores de serinaproteasas y pertenecen o bien a la familia de inhibidores de tipo Kunitz (familia I2, clan IB, en la base de datos MEROPS de inhibidores de proteasas, <http://merops.sanger.ac.uk>), o

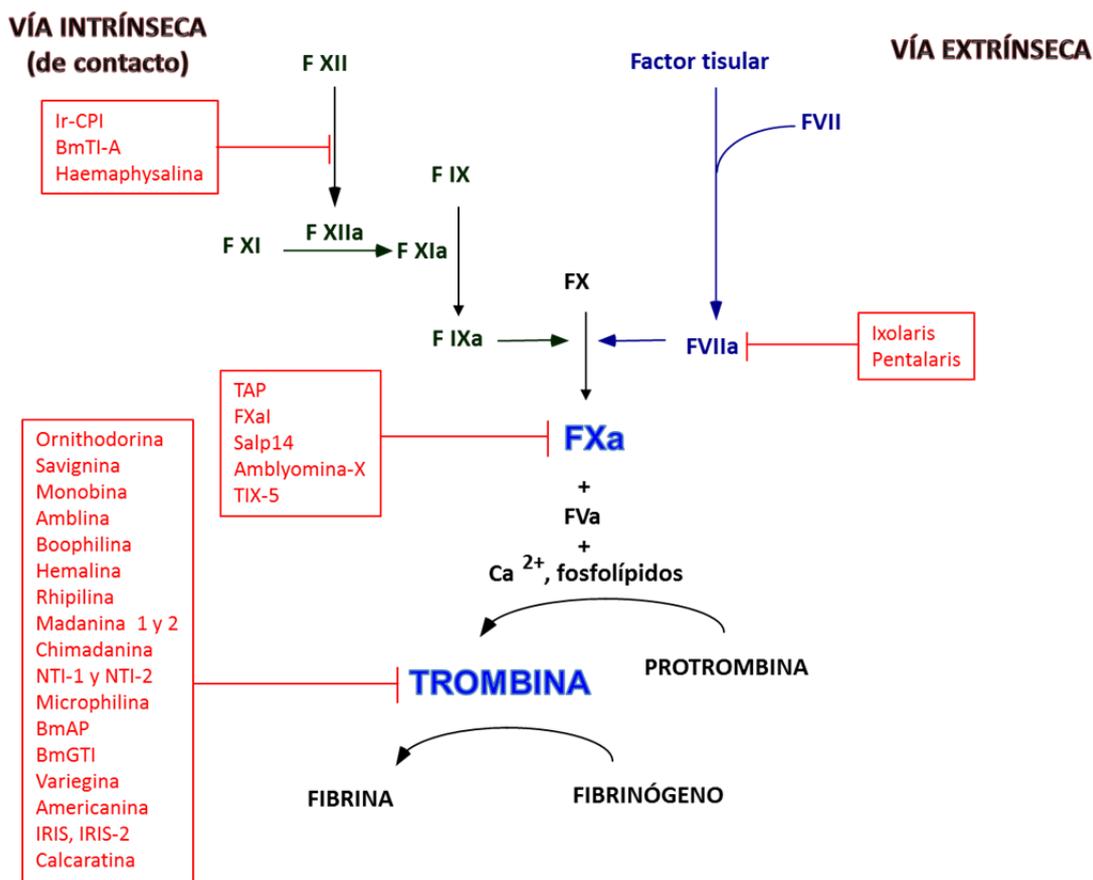
bien a la familia de las serpinas (Serine Protease Inhibitor, familia I4 de MEROPS) (Chmelar et al., 2012; Tirloni et al., 2014).

Las garrapatas poseen inhibidores para casi todos los factores de la coagulación, pero es llamativo el hecho de que la inmensa mayoría de estos anticoagulantes son inhibidores específicos del factor X activo (FXa) o inhibidores específicos de la trombina. Con ellos, las garrapatas evitan la formación de trombina (mediante la inhibición del FXa), o bien la neutralizan inmediatamente en caso de que llegue a formarse (ver tabla a continuación y cuadro 5). De esta manera las garrapatas consiguen no sólo evitar la coagulación de la sangre en la lesión de alimentación, sino también impedir la agregación plaquetaria inducida por trombina.

Anticoagulantes de la saliva de las garrapatas recogidos por Chmelar et al. (2012)

Nombre	Tipo	Especie	Referencia
Inhibidores de trombina			
Ornithodorina	Kunitz	<i>Ornithodoros moubata</i>	van de Locht et al., 1996
Savignina	Kunitz	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Nienaber et al., 1999
Monobina	Kunitz	<i>Argas monolakensis</i>	Mans et al., 2008b
Amblina	Kunitz	<i>Amblyomma hebraeum</i>	Lai et al., 2004
Boophilina	Kunitz	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Macedo-Ribeiro et al., 2008
Hemalina	Kunitz	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Liao et al., 2009
Madanina 1 y 2	Otros	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Iwanaga et al., 2003
Chimadanina	Otros	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Nakajima et al., 2006
NTI-1 y 2	Otros	<i>Hyalomma dromedari</i>	Ibrahim et al., 2001
Microphilina	Otros	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ciprandi et al., 2006
Rhipilina	Kunitz	<i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>	Gao et al., 2011
BmAP	Otros	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Horn et al., 2000
BmGTI	Otros	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ricci et al., 2007
Variiegina	Otros	<i>Amblyomma variegatum</i>	Koh et al., 2007
Americanina	Otros	<i>Amblyomma americanum</i>	Zhu et al., 1997
IRIS	Serpina	<i>Ixodes ricinus</i>	Prevot et al., 2006
IRIS-2	Serpina	<i>Ixodes ricinus</i>	Chmelar et al., 2011
Calcaratina	Otros	<i>Boophilus calcaratus</i>	Motoyashiki et al., 2003
Inhibidores de FXa			
TAP	Kunitz	<i>Ornithodoros moubata</i>	Waxman et al., 1990
FXaI	Kunitz	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Gaspar et al., 1996
Salp14	Otros	<i>Ixodes scapularis</i>	Narasimhan et al., 2002
Amblyomina-X	Kunitz	<i>Amblyomma cajennense</i>	Batista et al., 2010
TIX-5	Otros	<i>Ixodes scapularis</i>	Schuijt et al., 2013
Inhibidores del complejo FVIIa/factor tisular			
Ixolaris	Kunitz	<i>Ixodes scapularis</i>	Francischetti et al., 2002
Pentalaris	Kunitz	<i>Ixodes scapularis</i>	Francischetti et al., 2004
Inhibidores de la vía de contacto			
Ir-CPI	Kunitz	<i>Ixodes ricinus</i>	Decrem et al., 2009
Haemaphysalina	Kunitz	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Kato et al., 2005
BmTI-A	Kunitz	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Tanaka et al., 1999

Entre los anticoagulantes de las garrapatas cabe destacar también a los inhibidores de la vía intrínseca o de contacto, pues en esta vía se produce así mismo la activación del sistema de las cininas, generando bradicinina, que como ya hemos mencionado está involucrada en la inducción de inflamación y dolor. No es extraño, por tanto, que las garrapatas bloqueen también esta vía, evitando simultáneamente la formación de FXa y de bradicinina. Se han descrito 3 inhibidores de la vía de contacto, todos ellos pertenecientes a la familia Kunitz: el Ir-CPI de *Ixodes ricinus*, que bloquea al FXIIa, FXIa y la calicreína; la haemaphysalina de *H. longicornis*, que inhibe la activación recíproca entre FXII y precalicreína, y el BmTI-A de *R. microplus*, que es un inhibidor de calicreína (Chmelar et al., 2012).



Cuadro 5. Cascadas de la coagulación y anticoagulantes salivales de las garrapatas.

5.1.4. Agentes profibrinolíticos.

Para las garrapatas es importante disolver cualquier coágulo que pueda formarse durante el proceso de alimentación y distribución de la sangre en sus ciegos intestinales (Maritz-Olivier et al., 2007). Cabe por tanto esperar que hayan dotado a su saliva de agentes fibrino/fibrinogenolíticos directos y/o de agentes profibrinolíticos que estimulen la formación de plasmina.

Entre los primeros se han identificado varias metaloproteasas con actividad fibrinolítica directa en *Ixodes scapularis* y *O. savignyi*; las de *O. savignyi* también pueden hidrolizar al fibrinógeno unido a las plaquetas provocando la desagregación de las plaquetas ya agregadas (Maritz-Olivier et al., 2007).

En relación con los segundos, el único agente de este tipo identificado hasta ahora es la longistatina de *H. longicornis*, que es un activador de plasminógeno *per se*, capaz de generar plasmina en ausencia de activadores fisiológicos como el tPA y la urokinasa, y que también puede degradar al propio fibrinógeno (Anisuzzaman et al., 2011).

5.2. Agentes antiinflamatorios e inhibidores del complemento.

La inflamación aguda en el lugar de la picadura de las garrapatas es, básicamente, el resultado de la activación del endotelio vascular inducida por los múltiples mediadores proinflamatorios que se generan como consecuencia de la respuesta inmunitaria innata. Estos mediadores son fundamentalmente bradicinina, anafilotoxinas, leucotrieno B₄, histamina, serotonina y también la propia trombina. Las garrapatas pueden evitar la acción de estos mediadores utilizando tres tipos de mecanismos, como son la inhibición de su producción, el secuestro o la degradación.

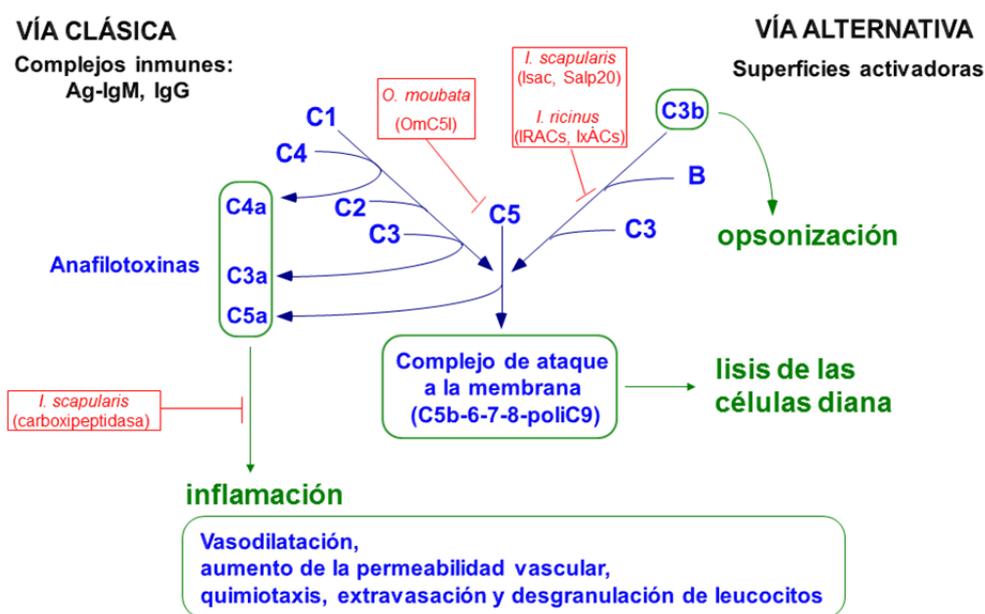
Para evitar la producción de bradicinina y trombina utilizan los variados anticoagulantes que hemos indicado antes.

Para evitar la producción de las anafilotoxinas procedentes del complemento utilizan agentes que o bien bloquean directamente al componente C5, como el ya mencionado OmCI *O. moubata* (Nunn et al., 2005), o bien impiden la activación de la vía alternativa. De estos segundos se han caracterizado varios (Schroeder et al., 2009): (i) el Isac de *I. scapularis* y sus homólogos en *I. ricinus*, IRAC-I, IRAC-II e IxACs B1 a B5; todos ellos inhiben la unión del componente C3b al factor B; (ii) el Salp20 de *I. scapularis*, que se une con alta afinidad a la properdina, desplazándola de la convertasa alternativa de C3 y provocando la disociación de dicha convertasa. Se ha comprobado que el IRAC-I e IxAC-1B de *I. ricinus*, además de inhibir la unión entre C3b y el factor B, también inhiben a la properdina de modo similar al Salp20. Ninguno de estos inhibidores de la vía alternativa actúan sobre la vía clásica (Cuadro 6); de hecho, la vía alternativa del complemento es la diana más habitualmente modulada por las garrapatas (Wikel, 2013).

Por su parte, la acción proinflamatoria de la histamina, serotonina y leucotrieno B₄ es bloqueada mediante su secuestro por las lipocalinas antes mencionadas. En este sentido, un caso llamativo es la regulación de la histamina por los ixódidos. Durante la fase inicial de alimentación lenta se segregan grandes cantidades de lipocalinas unidoras de histamina que la retiran de la lesión de alimentación evitando el edema. Sin embargo, durante la fase rápida final estos parásitos segregan una proteína (el "tick histamine-release factor", tHRF) que estimula la liberación de histamina por los mastocitos (Dai et al., 2010). El objetivo de este fenómeno aparentemente contradictorio parece ser beneficiarse de la vasodilatación inducida

por la histamina, logrando un mayor flujo de sangre a la lesión de alimentación durante la fase rápida, a la vez que evitarían el edema utilizando a los agentes antiinflamatorios secretados simultáneamente (Chmelar et al., 2012).

Por último, algunas garrapatas, como *I. scapularis*, dotan a su saliva con carboxipeptidasas que inactivan a la bradisinina y a las anafilotoxinas que puedan haberse producido mediante la hidrólisis de la arginina carboxiterminal de estos péptidos, la cual constituye su centro activo (Ribeiro y Spielman, 1986).



Cuadro 6. Activación del complemento y agentes inhibidores identificados en la saliva de las garrapatas.

5.3. Inmunomoduladores.

Además de manipular las respuestas hemostática, inflamatoria e inmunitaria innata, las garrapatas han desarrollado también diversas moléculas para suprimir o modular la respuesta inmunitaria específica, con objeto de favorecer su alimentación. Dichas moléculas actúan de forma múltiple, redundante e interconectada y pueden interferir la respuesta específica desde las fases iniciales de procesamiento y presentación antigénica hasta las fases efectoras finales (Wikel, 2013). Las garrapatas pueden interferir la respuesta inmunitaria específica utilizando una o varias de las estrategias siguientes.

1. Evitando que sus moléculas salivales sean consideradas como antígenos por el hospedador, para lo cual delegan las funciones antihemostáticas de la saliva en moléculas poco o nada inmunogénicas, bien por su reducido tamaño o bien por ser moléculas idénticas a las del hospedador, como por ejemplo, las prostaglandinas (Brossard y Wikel, 2008).

2. Interfiriendo la maduración de las células dendríticas y la presentación antigénica a los linfocitos T CD4+. La maduración de las células dendríticas requiere el estímulo positivo proporcionado por determinadas citocinas como el IFN γ , mientras que dicha maduración es inhibida por la IL-10, que es una potente citocina inmunosupresora y antiinflamatoria. Se ha comprobado que la saliva de *I. ricinus* contiene una molécula (Iris) que es capaz de inducir la síntesis de IL-10 en el hospedador, evitando así, la maduración de las células dendríticas y, consecuentemente, la presentación antigénica (Leboulle et al., 2002). Un efecto similar ejerce la japanina de *Rhipicephalus appendiculatus*, una lipocalina salival que puede inhibir la diferenciación de las células dendríticas a partir de los monocitos y alterar en ellas la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias (Preston et al., 2013). Entre los argásidos, se ha identificado en *O. moubata* un inhibidor de cisteína proteasas, la cistatina OmC2, que impide el procesamiento proteolítico de los antígenos por las células dendríticas e inhibe en ellas la producción de citocinas proinflamatorias (Salat et al., 2010).
3. Inhibiendo la activación y proliferación de los linfocitos T CD4+ y, por tanto, las respuestas inmunitarias T-dependientes. Dos estrategias utilizadas por algunas garrapatas para inhibir la activación de los linfocitos T son el bloqueo del receptor CD4 en el linfocito y el secuestro de la IL-2. La primera se descubrió en *I. scapularis*, que segrega una molécula denominada Salp15, la cual se une al CD4 bloqueando su unión al MHC-II (Anguita et al., 2002). La segunda se observó en *I. ricinus*, que secreta un péptido que se une y secuestra a la IL-2 impidiendo la estimulación autocrina y evitando de esta otra forma la activación del linfocito (Gillespie et al., 2001). En ambos casos lo que se consigue es un bloqueo de las respuestas inmunes que dependan de la activación de los linfocitos T, como es, por ejemplo, la síntesis de anticuerpos frente a antígenos T-dependientes. Este bloqueo, sin embargo, no es completo y prueba de ello es que en toda respuesta anti-garrapata se detectan anticuerpos no sólo frente a antígenos T-independientes, sino también frente a los T-dependientes. Contando con la presencia de tales anticuerpos, las garrapatas han desarrollado mecanismos para evitar sus efectos nocivos, como se describe más adelante.
4. Polarizando las respuestas T-dependientes. Las garrapatas pueden suprimir la producción de citocinas proinflamatorias y la secreción de citocinas Th1, al tiempo que potencian la secreción de citocinas Th2, polarizando la respuesta inmunitaria hacia la vía Th2. La supresión de los linfocitos Th1 puede inhibir la expansión de los clones de células T específicas de antígeno, la diferenciación de las células B dependientes de linfocitos T, la activación de los macrófagos y la actividad de las células “natural killer” (NK). Por su parte, el perfil de citocinas Th2 inducido por las garrapatas parece ser ventajoso para la supervivencia de éstas, debido a los efectos antiinflamatorios de dichas citocinas (Kazimírová y Štibrániová, 2013). Como ya se ha mencionado, las respuestas Th1 ponen en marcha reacciones de hipersensibilidad basófila cutánea, las cuales protegen frente a los hematófagos de alimentación lenta, mientras que las respuestas Th2 ponen en marcha reacciones de hipersensibilidad inmediata, mediadas por IgE, que protegen frente a hematófagos de alimentación rápida. Teniendo esto en cuenta, se ha observado

que, por ejemplo, *O. erraticus* induce respuestas Th1 evitando las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Astigarraga et al., 1997), mientras que *I. ricinus* induce respuestas Th2, evitando las reacciones de hipersensibilidad basófila cutánea. Se desconoce el mecanismo en el primer caso. El segundo lo consigue con el ya mencionado Iris, que induce la síntesis de IL-10 e inhibe la síntesis de IFN γ (Leboulle et al., 2002).

5. Modulando la actividad de las quimiocinas del hospedador, que son agentes quimiotácticos para distintos efectores del sistema inmunitario como los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, células NK y linfocitos T principalmente. Se ha observado que la saliva de las garrapatas contiene moléculas inhibitoras (las evasinas 1, 2 y 3) de múltiples quimiocinas (fundamentalmente CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CCL18, CXCL8 y CXCL1) (Frauensschuh et al., 2007; Déruaz et al., 2008).
6. Inhibiendo en los linfocitos B la producción de anticuerpos específicos que pueden provocar el rechazo de la garrapata por parte del hospedador (ver más adelante). Se han identificado proteínas inhibitoras de células B en *I. ricinus* y *Hyalomma asiaticum*, llamadas BIP y BIF respectivamente (Hannier et al., 2004; Yu et al., 2006).
7. Bloqueando a los anticuerpos, mediante su unión a las denominadas proteínas ligadoras de inmunoglobulinas (IGBP). Las garrapatas no evitan por completo la síntesis de anticuerpos frente a sus componentes salivales, aunque tales anticuerpos parecen estar dirigidos mayoritariamente frente a epítomos irrelevantes, a juzgar por la escasa eficacia protectora de las respuestas inducidas en los contactos naturales (Oleaga et al., 1990; García-Varas et al., 2010). No obstante, aunque los anticuerpos vayan dirigidos frente a epítomos irrelevantes, podrían afectar negativamente al parásito de diferentes formas, como por ejemplo activando al complemento por la vía clásica, o bien opsonizando a las moléculas salivales -lo cual permitiría su retirada de la cavidad de alimentación por células con los receptores FcR adecuados- o provocando reacciones de hipersensibilidad y de citotoxicidad mediada por anticuerpos. Las garrapatas evitan todas esas reacciones de defensa simplemente bloqueando la región Fc de los anticuerpos mediante su unión con las IGBP. Se sabe que en los ixódidos las IGBP son sintetizadas por los machos, quienes las inoculan en la cavidad de alimentación de la hembra ayudándola así a alimentarse y, por tanto, favoreciendo indirectamente la propagación de sus propios genes en la siguiente generación (Wang y Nuttall, 1999).

6. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LOS PARASITISMOS POR GARRAPATAS.

Es un hecho probado que la saliva de las garrapatas induce en sus hospedadores respuestas humorales detectables, por lo que la presencia en el suero de anticuerpos frente a antígenos salivales de garrapata representa un marcador biológico de exposición a estos vectores.

Dichos anticuerpos pueden ser de utilidad para: (i) el diagnóstico de reacciones alérgicas inducidas por garrapatas; (ii) la evaluación del riesgo de contraer enfermedades transmitidas por garrapatas y (iii) como herramienta para la localización y vigilancia epidemiológica de las poblaciones de vectores.

Pese al interés de lo que acabamos de señalar, aún son pocos los trabajos publicados en relación con estos posibles usos. De ellos, los efectuados con ixódidos han tenido como objetivo o bien confirmar el diagnóstico de casos de anafilaxia provocados por garrapatas (revisados por Fernández-Soto et al., 2001 y Fernández-Soto, 2003) o bien establecer si la presencia de anticuerpos en un grupo de individuos podía relacionarse con las tasas de infección por diversos patógenos transmitidos por garrapatas (revisados por Fernández-Soto, 2003 y Ribeiro y Arcà, 2009).

Por su parte, el objetivo de los trabajos efectuados con argásidos ha sido la localización de las poblaciones de estos parásitos usando la serología como alternativa a la búsqueda directa sobre el terreno, la cual es inviable a gran escala (Pérez-Sánchez et al., 2010a).

6.1. Diagnóstico serológico del parasitismo por ixódidos.

La relación entre la exposición a una garrapata y la presencia de anticuerpos (IgG totales) frente a antígenos salivales en el suero del hospedador se estableció por primera vez con trabajadores forestales que habían estado expuestos a *I. scapularis* durante su jornada laboral (Schwartz et al., 1990).

Posteriormente, se intentó relacionar la presencia y nivel de IgGs anti-garrapata con las tasas de infección por patógenos transmitidos por garrapatas, en concreto por *Borrelia burgdorferi*, agente productor de la enfermedad de Lyme. Con ese objetivo Schwartz et al. (1991, 1993, 1996), y Lane et al. (1999) buscaron, respectivamente, anticuerpos IgG frente a *I. scapularis* o *I. pacificus* en el suero de personas picadas por una u otra especie utilizando la técnica de ELISA como método y extractos de las glándulas salivales (SGE) de esas especies como antígeno.

Estos autores evidenciaron que este método era útil para diagnosticar los parasitismos por garrapatas y que existía una clara asociación entre la seropositividad frente a ambas garrapatas y la infección por *B. burgdorferi*, confirmando que ambas especies son, en sus respectivas zonas de distribución, las principales transmisoras de la enfermedad de Lyme a las personas. Basándose en lo anterior, dichos autores concluyen que el nivel sérico de anticuerpos anti-antígenos salivales de garrapata es un indicador fiable de la densidad de los

vectores y, por tanto, una vía indirecta para medir el riesgo de las personas (individual y colectivo) de haber contraído enfermedades transmitidas por éstos hematófagos.

No obstante, la serología con SGE presentaba el inconveniente de no ser completamente específica, ya que se observó reactividad cruzada entre ixódidos. En concreto, estos investigadores verificaron la existencia de reactividad cruzada entre *I. scapularis* y *Dermacentor variabilis* (Schwartz et al., 1993) y entre *I. pacificus* y *Dermacentor occidentalis* (Lane et al., 1999), aunque no suministran datos ni sobre el número y tamaño molecular de los antígenos implicados ni sobre la naturaleza (peptídica o sacarídica) de los epítomos responsables de dichas reactividades.

A una conclusión similar llegaron Fernández-Soto (2003) y Nebreda Mayoral et al. (2004), tras analizar varios cientos de sueros de personas picadas por garrapatas frente al SGE de cinco de las especies de ixódidos más abundantes en la zona de procedencia de esos sueros (la comunidad de Castilla y León): *Dermacentor marginatus*, *I. ricinus*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus* y *Rhipicephalus sanguineus*. Estos autores concluyen que la serología es una buena herramienta para conocer si una persona ha sido picada o no por una garrapata, aunque la fuerte reactividad cruzada existente entre especies no permite conocer la implicada en cada caso.

En consecuencia, todos los autores citados sugieren que, para mejorar la especificidad y sensibilidad de la serología, no se utilice como antígeno al SGE sino a una o varias de sus proteínas inmunodominantes obtenidas por recombinación.

En este sentido, Sanders et al. (1998) y Alarcon-Chaidez et al. (2006) han desarrollado un ELISA para detectar anticuerpos frente a una forma recombinante de la calreticulina de *Amblyomma americanum* e *I. scapularis* respectivamente. Ambos grupos observaron que las personas picadas por las garrapatas desarrollaban respuestas humorales específicas frente a la calreticulina recombinante, por lo que han propuesto a esta proteína como herramienta epidemiológica para medir la exposición a garrapatas.

6.2. Diagnóstico serológico del parasitismo por argásidos.

Respecto al diagnóstico serológico de los parasitismos por argásidos, los estudios existentes son, básicamente, los llevados a cabo por nuestro grupo de investigación con el propósito final de desarrollar herramientas fiables para la localización de poblaciones de ornithodoros en el entorno doméstico y peridoméstico; en concreto de *O. erraticus* en Europa y Norte de África y de *O. moubata* en África subsahariana y Madagascar.

Estos estudios comenzaron con *O. erraticus* en los años 90, en el marco de la campaña para la erradicación de la PPA de nuestro país.

Utilizando un extracto de glándulas salivales (SGE) del parásito como antígeno y el ELISA como método comprobamos, primero, la sensibilidad y la especificidad del SGE en la detección de anticuerpos anti-*O. erraticus* en condiciones experimentales. Para ello se

utilizaron sueros porcinos obtenidos mediante infestaciones experimentales con el propio *O. erraticus* y con otros 8 ectoparásitos, incluyendo 4 especies de ixódidos, *O. moubata*, *Sarcoptes scabiei*, el piojo *Haematopinus suis* y el mosquito *Anopheles atroparvus* (Canals et al., 1990; Pérez-Sánchez et al., 1992). Posteriormente, el SGE se evaluó en condiciones de campo enfrentándolo con varios miles de sueros porcinos procedentes de granjas de las provincias de Salamanca, Badajoz y Huelva en las que la presencia/ausencia de *O. erraticus* se verificó mediante la búsqueda directa (Canals et al., 1990; Oleaga-Pérez et al., 1994). Este estudio mostró, entre los sueros negativos de campo, cierto grado de reactividad cruzada por epítomos carbohidratados, que ocasionaba un 10 % de falsos positivos, pero que podía eliminarse mediante la desglicosilación del SGE con metaperiodato sódico. Se concluyó que el SGE presentaba un 90 % de especificidad y sensibilidad con los sueros de campo y se recomendó su desglicosilación para confirmar los resultados dudosos. En estas condiciones, el SGE se utilizó para el análisis de 19.000 sueros porcinos procedentes de 3.478 granjas localizadas en 234 municipios de la provincia de Salamanca. Este análisis permitió la identificación de las granjas infestadas por el parásito en esa provincia y el establecimiento de una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *O. erraticus* y la persistencia de la PPA en dichas granjas (Pérez-Sánchez et al., 1994). Este conocimiento facilitó la adopción de medidas específicas de control para evitar el contacto entre los cerdos y las garrapatas en las granjas infestadas, contribuyendo a la erradicación de la PPA de la zona analizada.

Partiendo de la experiencia adquirida con *O. erraticus*, nuestro equipo desarrolló un extracto similar (SGE) a partir de las glándulas salivales de *O. moubata* (Baranda et al., 1997, 2000), el cual fue aplicado por primera vez en Madagascar en una zona endémica de PPA en el periodo 2006-2007. El objetivo fue identificar si los cerdos domésticos y los potamóqueros (*Potamochoerus larvatus*) habían sido parasitados por *O. moubata* con el fin de determinar el papel desempeñado por todos ellos (vector y posibles reservorios) en la epizootiología de la PPA en esa zona. El 5,6 % de los sueros de cerdos domésticos presentaban anticuerpos anti-*O. moubata*, indicando que habían estado en contacto con esta garrapata, mientras que ninguno de los potamóqueros resultó positivo a *O. moubata*, sugiriendo que, en condiciones naturales, estas dos especies no interactúan (Ravaomanana et al., 2011).

En conjunto, todos estos trabajos mostraron que el SGE es un antígeno válido y sensible para la detección por serología de los cerdos picados por los ornithodoros, pero que no está exento de inconvenientes, como son su obtención laboriosa y difícil de estandarizar y su composición compleja y poco conocida, que puede plantear dudas acerca de su especificidad. En consecuencia, en trabajos posteriores se purificaron los cuatro antígenos inmunodominantes del SGE de *O. erraticus* y de *O. moubata* y se evaluó individualmente su eficacia diagnóstica con el fin de identificar al más sensible y específico de cada especie para su posterior obtención en forma recombinante (Baranda et al., 2000).

En relación con los antígenos de *O. erraticus*, aunque ninguno de los cuatro mejoró la sensibilidad del SGE, sí aumentaron la especificidad del test, de modo que se propuso como candidato al más reactivo, el denominado Oe260. Actualmente, este antígeno aún no ha sido clonado.

En relación con los antígenos de *O. moubata*, el mejor candidato para el serodiagnóstico de los animales parasitados, por su especificidad, reactividad y abundancia en la saliva y el SGE, fue el denominado 20A1. En posteriores análisis por secuenciación de Edman y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se obtuvieron secuencias peptídicas específicas del antígeno 20A1 que permitieron su identificación como un ortólogo de la lipocalina salival TSGP1 de *O. savignyi* (Baranda et al., 2000; Oleaga et al., 2007), posibilitando así abordar su clonaje, caracterización molecular y producción recombinante.

7. DESARROLLO DE VACUNAS ANTI-ORNITHODOROS.

El control de las poblaciones de garrapatas se ha basado esencialmente en el empleo de acaricidas químicos, pero el uso de estos productos presenta graves inconvenientes como la contaminación ambiental y de los productos de origen animal, así como el rápido desarrollo de resistencias frente a ellos, que limita su vida media en el mercado (Graf et al., 2004; Ghosh et al., 2007; Guerrero et al., 2012). Además, en relación con los ornithodoros, la aplicación de acaricidas resulta ineficaz por el simple hecho de que no alcanzan a los parásitos en el interior de sus refugios (Astigarraga et al., 1995).

Estos inconvenientes, junto con el elevado coste de la comercialización de nuevos acaricidas, estimularon el desarrollo de vacunas anti-garrapata como método alternativo y complementario de control, lo que condujo en los años 90 a la comercialización de dos vacunas anti-garrapata (TickGARD[®] en Australia y GAVAC[®] en Latinoamérica). Ambas vacunas estaban dirigidas frente al ixódido *R. microplus* y se basan en el antígeno oculto Bm86, una glicoproteína expresada en la membrana luminal de los enterocitos del intestino medio. Aunque con eficacia variable, la aplicación de estas vacunas a lo largo de las dos últimas décadas ha demostrado que la vacunación de hospedadores es un método sostenible de control de las poblaciones de garrapatas y que su implementación en programas de control integrado permite disminuir el uso de acaricidas retrasando la aparición de resistencias (de la Fuente et al., 2007; Willadsen, 2008; Vargas et al., 2010).

Pese a lo anterior y a la intensa actividad investigadora llevada a cabo, sobre todo en ixódidos, el desarrollo de nuevas vacunas anti-garrapata más eficaces ha sido más lento de lo esperado y, de hecho, aún no se ha comercializado ninguna vacuna nueva. Al margen de causas de índole mercantil analizadas por Guerrero et al. (2012), la principal causa de ese retraso ha sido la dificultad para la identificación de nuevos antígenos protectores altamente eficaces, de modo que actualmente se dispone de un repertorio limitado de candidatos vacunales, los cuales pueden consultarse en varias revisiones recientes (Willadsen, 2008; Guerrero et al., 2012; Parizi et al., 2012; Merino et al., 2013).

En relación con los argásidos, los trabajos en los que se aborda el desarrollo de una vacuna han sido mucho más escasos que los efectuados en ixódidos y, salvo los de Chinzei y Minoura (1988) y Salat et al. (2010) con *O. moubata* y Need y Butler (1991) con *Ornithodoros turicata* y *Ornithodoros talaje*, apenas existen otros que los llevados a cabo por nuestro equipo de investigación con *O. erraticus* y *O. moubata*. En los citados trabajos se ha evaluado el valor vacunal de los antígenos salivales de esas especies y también el de diferentes tipos de antígenos ocultos, esto es, de antígenos que, en condiciones naturales, los parásitos no exponen al sistema inmunitario de los hospedadores pero que pueden ser alcanzados por los efectores de la inmunidad si artificialmente se induce una respuesta frente a ellos.

7.1. Ensayos con antígenos ocultos.

El primero de estos trabajos se llevó a cabo en conejos utilizando como antígeno vacunal el vitelo de huevos de *O. moubata*, el cual indujo una respuesta que disminuyó la fecundidad de las hembras en un 50 % (Chinzei y Minoura, 1988). Puesto que al igual que en los ixódidos, en los argásidos -y en particular en *O. moubata*-, las inmunoglobulinas del hospedador pasan intactas desde el intestino a la hemolinfa (Minoura et al., 1985; Chinzei y Minoura, 1988; Ben-Yakir, 1989), esto podría explicar el resultado antes indicado. Al ser la vitelogenina la proteína más abundante en la hemolinfa de *O. moubata* (Kopacek et al., 2000; Gudderra et al., 2002), cabe pensar que unos anticuerpos frente a ella podrían inhibir su incorporación a los oocitos en forma de vitelina, lo que explicaría la caída en la fertilidad de las hembras observada en este trabajo.

El siguiente trabajo con antígenos ocultos fue el de Need y Butler (1991), quienes en sus pruebas de vacunación de ratones CD1 frente a *O. turicata* y *O. talaje*, utilizaron como antígenos vacunales un extracto de tubo digestivo y un extracto del resto de los órganos internos distintos del tubo digestivo. Ninguno de los dos extractos proporcionó protección frente a las larvas de *O. turicata*, pero sí frente a las de *O. talaje*, que son de alimentación lenta, entre las cuales provocaron un incremento de la mortalidad del 12 al 29 %, similar al inducido por la respuesta natural frente a esta especie.

En cuanto a nuestros trabajos, éstos comenzaron con la vacunación de cerdos frente a *O. erraticus* utilizando como antígenos unos extractos solubles de la hemolinfa, singanglio, glándulas coxales y tubo digestivo (Astigarraga et al., 1995). Con estos antígenos no se consiguió protección alguna, previsiblemente debido a que, por el modo de preparación de los extractos antigénicos, se eliminó de ellos la fracción de proteínas de membrana y justamente esas proteínas, y en particular las que exponen los enterocitos por su cara luminal, podrían ser las de mayor interés vacunal (ver más adelante el apartado 7.3.).

La comprobación de la hipótesis anterior fue uno de los objetivos de la tesis doctoral de Manzano Román (2002), en la cual se demostró: (i) que, efectivamente, un extracto de las proteínas de membrana de los enterocitos de *O. erraticus* inducía en cerdos, conejos y ratones una respuesta protectora capaz de provocar descensos de hasta el 50 % en las tasas de alimentación y fecundidad de las hembras y, además, la muerte en las primeras 24-72 horas post-alimentación de hasta el 80 % de las ninfas de *O. erraticus* alimentadas sobre los animales vacunados; (ii) que la molécula responsable de la protección es una proteína de 45 kDa (denominada Oe45) que se expresa en la membrana luminal de los enterocitos entre las 24 y 72 horas post-alimentación y (iii) que la protección está mediada por el sistema del complemento, el cual se fija sobre la superficie de los enterocitos a través de los anticuerpos anti-Oe45 provocando la lisis celular y la subsiguiente destrucción del intestino de forma similar a lo observado en las vacunas basadas en el antígeno Bm86 (Manzano-Román et al., 2006, 2007). Actualmente aún desconocemos la identidad de este antígeno Oe45.

En vista de la alta protección conseguida frente a *O. erraticus* con las proteínas de membrana de sus enterocitos, se llevaron a cabo ensayos de vacunación de cerdos frente a *O. moubata* utilizando unos extractos del tubo digestivo de esta especie obtenidos de forma

similar a los anteriores (García Varas, 2004). La protección conseguida frente a *O. moubata* fue menor y consistió en un 40 % de reducción de las tasas de alimentación y de fertilidad de las hembras, sin provocar la muerte prematura de los parásitos. El hecho de que esta respuesta no matase a los ejemplares se atribuyó a que *O. moubata* elimina el fluido coxal durante el proceso de alimentación, a diferencia de *O. erraticus* que lo hace en las 24 horas siguientes, de modo que la sangre puede llegar al intestino medio lo suficientemente concentrada como para impedir que los anticuerpos y las proteínas del complemento difundan hacia la cara luminal de los enterocitos y alcancen a sus dianas (García Varas, 2004).

Por último, en un trabajo más reciente se evaluó el potencial valor protector de la subolesina frente a *O. erraticus* y *O. moubata* mediante silenciamiento génico por RNA interferente (RNAi) y vacunación con las correspondientes proteínas obtenidas en forma recombinante (Manzano-Román et al., 2012b). La subolesina fue descubierta como antígeno protector en la especie americana *I. scapularis* (Almazán et al., 2003) y es un ortólogo estructural y funcional de la akirina de insectos y la akirina 2 de los mamíferos (Goto et al., 2008; Galindo et al., 2009). La subolesina actúa como factor de transcripción por lo que su función afecta a múltiples procesos como la digestión, el desarrollo, la reproducción y la respuesta inmunitaria innata de la garrapata, influyendo en la infección y multiplicación de los patógenos en el vector (Prudencio et al., 2010; Zivkovic et al., 2010; de la Fuente et al., 2011). La vacunación con subolesina, o con sus epítopos protectores conservados, protege frente a las infestaciones por garrapatas, mosquitos y flebotomos y reduce las tasas de transmisión de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. burgdorferi* (Merino et al., 2011; Moreno-Cid et al., 2013), por lo que se considera un buen candidato para el desarrollo de una vacuna universal frente a artrópodos hematófagos, con el doble efecto protector de controlar las infestaciones por estos organismos y de reducir su capacidad vectorial de patógenos (de la Fuente et al., 2011, 2013).

En ornithodoros, el silenciamiento génico de la subolesina por RNAi no afectó a las tasas de alimentación ni supervivencia, pero inhibió la oviposición en más de un 88 %; la vacunación indujo una respuesta menos potente, inhibiendo la oviposición hasta el 24,3 % en *O. erraticus* y hasta el 8,5 % en *O. moubata*. Esto sugiere que el bloqueo de la función de esta proteína también puede ejercer un efecto protector frente a argásidos ampliando su espectro de organismos diana.

7.2. Ensayos con antígenos salivales.

Con los antígenos salivales se han obtenido unos resultados bastante variables. El primero de estos ensayos fue el de Need y Butler (1991), en el cual observaron un 16 % de mortalidad en las larvas de *O. talaje* alimentadas sobre ratones CD1 vacunados con un extracto completo de las glándulas salivales; mortalidad de similar magnitud a la inducida por la respuesta natural.

Más recientemente, Salat et al. (2010) evaluaron la capacidad protectora de la cistatina OmC2 de *O. moubata* en ratones C3H/HeN, observando un 15 % de mortalidad y un

39 % de reducción en las tasas de alimentación y muda de las nifas-1 alimentadas sobre los animales vacunados, que fue la única fase evolutiva analizada en este trabajo.

En cuanto a los ensayos con antígenos salivales llevados a cabo por nosotros, éstos también fueron iniciados por Astigarraga et al. (1995) vacunando cerdos con SGE de *O. erraticus* y de *O. moubata*.

Frente a *O. erraticus* se obtuvo una respuesta protectora muy variable, que en el mejor de los casos llegó a inhibir hasta el 50 % la alimentación y la fecundidad de las hembras. Aunque dicha variabilidad restaba interés al SGE de *O. erraticus* como antígeno vacunal, los resultados dejaron claro que en esta especie era posible inducir respuestas protectoras con antígenos salivales. La protección lograda en estas pruebas se atribuyó al reconocimiento, forzado por los adyuvantes de Freund, de varios componentes del SGE que no son antigénicos en condiciones naturales (Astigarraga et al., 1995).

Estas observaciones de Astigarraga et al. (1995) fueron el punto de partida del trabajo de Manzano Román (2002) con el SGE de *O. erraticus*, trabajo que tuvo por objetivo el conseguir una respuesta uniforme frente a esta especie e identificar a las moléculas del SGE responsables de la inhibición de la toma de sangre. Con ese fin purificó los componentes no antigénicos del SGE que eran reconocidos habitual (de 70 y 50 kDa) o esporádicamente (de 20 kDa) por los animales vacunados con este extracto y los administró individualmente a los cerdos con los adyuvantes de Freund o con otros adyuvantes. En estos ensayos se comprobó: (i) que todos los animales reconocían a los componentes de 70 y 50 kDa, pero que dicho reconocimiento no proporcionaba protección y (ii) que el reconocimiento del componente de 20 kDa inhibía en más de un 50 % la alimentación de los parásitos, pero que la mayoría de los cerdos eran incapaces de reconocerlo, con independencia de la dosis, adyuvante y modo de administración (soluble, particulado o en forma de complejos inmunes). Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que, en *O. erraticus*, la mera inducción del reconocimiento de componentes salivales no inmunogénicos (como los de 70 y 50 kDa) no es sinónimo de protección y que, en cambio, sí podría serlo el reconocimiento de los componentes aparentemente más protegidos por el parásito (como el de 20 kDa) en vista de la dificultad para forzar dicho reconocimiento.

Por su parte, frente a *O. moubata*, Astigarraga et al. (1995) obtuvieron una respuesta que inhibió la alimentación de los adultos de ambos sexos y la posterior oviposición de las hembras hasta en un 60-70 %; inhibición que, además, fue muy uniforme en todos los animales vacunados. El antígeno reconocido y neutralizado por los animales vacunados con SGE, pero no por los animales sensibilizados por infestación natural, en los cuales la respuesta inmunitaria carece por completo de valor protector, presentaba un peso molecular de 44 kDa y fue denominado Om44.

Al utilizar esta proteína individualmente como antígeno vacunal (purificada mediante electroelución a partir de geles de poliacrilamida), los animales inmunizados también presentaron altos niveles de protección (García Varas, 2004; García-Varas et al., 2010).

La proteína Om44 está presente en la saliva de todas las fases evolutivas del argásido, sin embargo la respuesta protectora inducida por Om44 afectaba de distinta manera a las diferentes fases evolutivas. Dicha respuesta bloquea casi por completo la alimentación de las fases de mayor tamaño (adultos y ninfas 4, las cuales tardan más de 30 minutos en realizar la toma de sangre), pero apenas afecta a las fases evolutivas más pequeñas (ninfas 1, 2 y 3), las cuales se alimentan en menos de 30 minutos. Dado que todas las fases evolutivas poseen la molécula Om44, su diferente sensibilidad a la vacuna con Om44 resultaba inesperada. La explicación a este fenómeno la encontramos al realizar la caracterización de la molécula Om44, que resultó ser un ligando de la P-selectina.

Como ya hemos mencionado, la P-selectina es una molécula de adhesión implicada en los mecanismos hemostáticos/inflamatorios del hospedador. La P-selectina se expresa en la superficie endotelial y en las plaquetas activadas a partir de los 20-30 minutos tras la lesión vascular (Cleator et al., 2006), en este caso la picadura de la garrapata, contribuyendo a la respuesta hemostática e inflamatoria. Esta respuesta puede impedir la alimentación de las garrapatas y, en consecuencia, la inhibición de la interacción entre la P-selectina y el PSGL-1 resulta esencial para *O. moubata* para poder completar la toma de sangre.

Se comprobó que Om44 se une a la P-selectina y que dicha unión es inhibida por los anticuerpos anti-Om44 inducidos por la vacunación con la propia molécula y con el SGE. El papel de Om44 y su acción a lo largo del tiempo tras la picadura, dependiente de la expresión temporal de P-selectina, explicaba la ausencia de protección frente a estados parasitarios que se alimentan antes de la expresión de la P-selectina (ninfas 1, 2 y 3). Igualmente se comprobó que si en los animales vacunados se induce la expresión de P-selectina antes de que comiencen a alimentarse los parásitos, entonces se bloqueaba la alimentación de todas las fases evolutivas, incluidas las ninfas 1, 2 y 3 (García-Varas et al., 2010). Los datos anteriores representaban la primera evidencia de un nuevo mecanismo antihemostático en artrópodos hematófagos y por tanto asignaban un gran interés a la Om44 como antígeno vacunal.

Con objeto de averiguar su identidad, la Om44 fue purificada por inmunoprecipitación (utilizando la propia P-selectina como sonda específica) y sometida a análisis por espectrometría de masas y secuenciación *de novo*. Esos análisis mostraron que Om44 no es un ortólogo de PSLG-1 ni de otros ligandos conocidos de P-selectina como la pentraxina 3 (Ptx3) (García-Varas et al., 2010), y en cambio indicaban que podría ser una isoforma de enolasa, aunque sobre la base de un único péptido identificado, de modo que no fue posible establecer su identidad con certeza (Pérez-Sánchez et al., 2010b).

7.3. Definición del antígeno ideal para el desarrollo de vacunas anti-garrapata.

Existe un amplio consenso en cuanto a la urgente necesidad de identificar nuevos antígenos que amplíen el actual repertorio de candidatos vacunales y también en relación con los atributos que debería reunir el antígeno óptimo para una vacuna anti-garrapata (de la Fuente, 2012; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; Parizi et al., 2012).

Son los siguientes: (i) ser accesible a los efectores inmunes ingeridos con la sangre, básicamente los anticuerpos y el complemento (Flower et al., 2010); en este sentido las proteínas salivales y las de la membrana luminal del intestino de la garrapata son los candidatos de primera elección; (ii) ejercer una función vital para la garrapata, de modo que su bloqueo produzca la muerte del parásito o la inhibición de su reproducción; (iii) estar codificado por un gen único, o con un bajo número de copias, y que no pertenezca a una familia multigénica para evitar que la pérdida de función inducida por la vacuna sea compensada por otros miembros de la familia con funciones redundantes; (iv) que sea expresado como antígeno salival silente según el concepto de Kotsyfakis et al. (2008), es decir, que no sea reconocido por la respuesta inmunitaria inducida por la picadura, pero sí por la respuesta inducida por la vacuna; este tipo de antígeno conservaría una alta inmunogenicidad al no haber sufrido la presión selectiva de la respuesta inmunitaria y permitiría desarrollar vacunas de acción dual (Trimnell et al., 2002), en las cuales las propias picaduras actuarían como dosis antigénicas de recuerdo, haciendo innecesarias las revacunaciones; (v) que esté conservado en las diferentes especies de garrapatas, e incluso en otras especies de artrópodos hematófagos, permitiendo así obtener vacunas de amplio espectro y, por último, (vi) que reduzca las tasas de infección y transmisión de patógenos.

Teniendo en cuenta los requisitos anteriores, actualmente la búsqueda de nuevos antígenos protectores de garrapata prioriza a los antígenos expresados en las glándulas salivales y en las membranas lumbales de los enterocitos, por ser los que con mayor probabilidad pueden reunir un mayor número de los atributos antes mencionados, a fin de desarrollar vacunas universales basadas en mezclas de antígenos que proporcionen protección cruzada (de la Fuente et al., 2011; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; Parizi et al., 2012; Moreno-Cid et al., 2013; Wikel, 2013).

7.4. Nuevas estrategias para la identificación de antígenos protectores.

En su revisión sobre vacunas anti-garrapata, Willadsen (2008) analiza los tres tipos de aproximaciones experimentales utilizadas tradicionalmente para la búsqueda individual de antígenos protectores: inmunológica, funcional y fraccionamiento bioquímico.

Actualmente, la creciente disponibilidad de secuencias genómicas, transcriptómicas y proteómicas de garrapatas en bases de datos de acceso público (p.e.: VectorBase, The Gene Index Project, CattleTickBase) y el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis masivo (RNAseq, microarrays, etc.) están permitiendo la rápida transición desde las aproximaciones tradicionales para la búsqueda de antígenos protectores a las nuevas estrategias de vacunología reversa, que forman parte del emergente campo de la “vacunómica” (Flower et al., 2010; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; de la Fuente y Merino, 2013).

En estas aproximaciones holísticas se estudian las interacciones entre hospedadores, garrapatas y patógenos obteniendo información genómica, transcriptómica, proteómica, inmunológica y metabólica (biología de sistemas), que es posteriormente integrada y analizada *in silico* para la selección de candidatos teóricos en función de determinados criterios o

hipótesis (Six et al., 2012; Nakaya et al., 2012). La lista resultante de antígenos potencialmente protectores puede acotarse mediante pruebas experimentales como el silenciamiento génico por RNAi, a fin de seleccionar a los que presenten mayor potencial protector (de la Fuente et al., 2010; Manzano-Román et al. 2012a, 2012b). Los candidatos seleccionados son producidos en forma recombinante y validados en pruebas de vacunación de animales; por último, se caracteriza su función y mecanismo protector (de la Fuente y Merino, 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

La heterogeneidad de los objetivos perseguidos en la presente tesis doctoral ha exigido la utilización de procedimientos experimentales distintos en cada uno de ellos. Por este motivo describimos primero la obtención del material parasitario y las técnicas y procedimientos de uso más general y rutinario. Posteriormente, en distintos apartados para cada objetivo, se describen los métodos específicos empleados.

PARÁSITOS, HOSPEDADORES Y MÉTODOS GENERALES.

I. PARÁSITOS.

Todos los ejemplares de *O. moubata* utilizados en el presente trabajo proceden de la colonia de laboratorio del IRNASA (CSIC), establecida en 1990 a partir de ejemplares donados por el Dr. Philip Wilkinson (Institute for Animal Health, Pirbright, Reino Unido). Esta colonia se mantiene en una cámara de simulación ambiental a 28 °C, 85 % de humedad relativa y 14/10 horas de luz/oscuridad, y se alimenta regularmente sobre conejos.

II. HOSPEDADORES.

Como hospedadores se han utilizado conejos de raza New Zealand White procedentes de la Granja Cunicula San Bernardo S.L. (Tulebras, Navarra). Los animales, todos hembras y de 1,5 kg de peso al inicio de las pruebas, se mantuvieron en el animalario del IRNASA (Nº de Registro, P.A.E.-SA.002, ES37274000043) y se alimentaron *ad libitum* con pienso específico para conejos de esa edad.

Estos conejos se utilizaron para el mantenimiento de la colonia de garrapatas (24 animales) o para los ensayos de vacunación que se describen más adelante (30 animales). Todos los procedimientos en los que se utilizaron los conejos cumplían la normativa vigente en materia de experimentación con animales (Reales Decretos 1201/2005 y 53/2013) y contaron con la autorización del Comité Ético de Experimentación Animal del IRNASA (CSIC).

III. MATERIAL PARASITARIO.

GLÁNDULAS SALIVALES.

Las glándulas salivales se han usado para la extracción de RNA total, para la purificación de RNA mensajero poliadenilado (mRNA poliA+) y para la preparación de extractos proteicos (SGE). Dichas glándulas se obtenían rutinariamente a partir de ejemplares adultos en ayunas (machos y hembras por separado) mediante la disección en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 4 °C (García-Varas et al., 2010). Acto seguido se lavaban en PBS a 4 °C y se procesaban de distinta forma según su uso posterior (ver a continuación).

Obtención de RNA total de glándulas salivales.

El RNA total se obtuvo a partir de lotes de 20 pares de glándulas (10 hembras + 10 machos) utilizando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA resultante se preservó a -80 °C.

Este RNA se utilizó directamente, sin purificar el mRNA, para la amplificación por RT-PCR (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction) y 3'/5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) del cDNA codificante de varias de las proteínas incluidas en la presente memoria.

Purificación de mRNA poliA+ de glándulas salivales.

El mRNA poliA+ se empleó para la construcción de una genoteca de expresión de glándulas salivales. Como se detallará en el apartado correspondiente, dicha genoteca se construyó utilizando el kit CloneMiner II cDNA Library Construction (Invitrogen), el cual recomienda utilizar entre 1 y 5 µg de mRNA poliA+ purificado como material de partida.

En consecuencia, y de acuerdo con la cantidad de mRNA poliA+ obtenido en pruebas previas (4-5 ng/ejemplar), se estimó que para conseguir al menos 2 µg de este material sería necesario diseccionar 450 ejemplares de *O. moubata* (225 hembras + 225 machos). La disección se llevó a cabo en lotes de 25 ejemplares/lote, preservando las glándulas recién extraídas en RNA later (Ambion). Los lotes se almacenaron a -20 °C y, una vez extraídas todas las glándulas, se mezclaron y procesaron conjuntamente para aislar el mRNA poliA+.

Con ese fin se extrajo primero el RNA total utilizando el kit RNeasy (Qiagen) y, a partir de este RNA, se purificó el mRNA poliA+ utilizando el Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo en ambos casos los protocolos recomendados por el fabricante de los kits. La concentración y calidad del mRNA se estimó mediante la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El mRNA se almacenó a -80 °C hasta el momento de ser utilizado.

Preparación de extracto proteico de glándulas salivales (SGE).

Este extracto se preparó a partir de lotes de 50 pares de glándulas (25 hembras + 25 machos) siguiendo el procedimiento habitual (García-Varas et al., 2010), que describimos a continuación:

1. Extracción y lavado de las glándulas salivales, en PBS a 4 °C, depositándolas finalmente en 1 mL de PBS.
2. Rotura de las células glandulares mediante 5 ciclos de congelación-descongelación a -20 °C.
3. Centrifugación, 2 minutos a 1.000 rpm, para sedimentar los restos de tejido glandular y recuperación del sobrenadante.
4. Filtrado del sobrenadante a través de un filtro de 0,2 µm (Costar-Corning Inc.) para retirar el material particulado. Este filtrado es lo que denominamos SGE.
5. Determinación de la concentración proteica del SGE mediante medida de la absorbancia a 280 nm (espectrofotómetro NanoDrop 2000; Thermo Scientific) y preservación del SGE a -20 °C.

SALIVA.

Obtención y análisis de la reproducibilidad del método.

La saliva se obtuvo por separado a partir de machos y de hembras de *O. moubata* tras estimular su secreción con pilocarpina o con dopamina. Todos los ejemplares utilizados eran de la misma edad, se habían alimentado sobre los mismos conejos el mismo número de veces (dos ciclos trofogónicos) y, en el momento de usarlos para la obtención de la saliva, llevaban 4 meses en ayunas.

Por razones de facilidad de manejo, la saliva se obtuvo en lotes de 5 ejemplares siguiendo el protocolo de Ribeiro et al. (1991), con las modificaciones de Baranda et al. (1997), que describimos seguidamente.

Los ejemplares se lavaron tres veces en agua destilada templada y se secaron sobre un papel toalla. Acto seguido se inmovilizaron sobre una placa de cristal pegándolas por el dorso con cinta adhesiva de doble cara. A cada ejemplar se le inyectó 1 μ L de clorhidrato de pilocarpina (Sigma) al 1 % en PBS a través del poro genital utilizando una jeringuilla de Hamilton de 5 μ L.

Inmediatamente después de la administración de la pilocarpina, las garrapatas comenzaban a mover sus quelíceros y a emitir sobre sus apéndices bucales pequeñas gotas de saliva (< 0,5 μ L). Las gotitas eran recogidas con una micropipeta y depositadas en 200 μ L de PBS mantenido en hielo. La recolección se repetía continuamente durante aproximadamente 30-40 minutos, momento en el que habitualmente cesaba tanto la emisión de gotitas como el movimiento de los quelíceros. La saliva de cada lote se filtró a través de 0,2 μ m y se almacenó a -20 °C.

La concentración proteica de los sucesivos lotes de saliva se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y la reproducibilidad de las muestras se analizó por SDS-PAGE.

Para comprobar si el protocolo de inducción de la salivación influía en la composición de la muestra, varios lotes adicionales de adultos de ambos sexos fueron estimulados mediante una inyección de 10 μ L de dopamina (Sigma) al 0,2 % en PBS, siguiendo el protocolo de Oliveira et al. (2008).

Dado que la saliva obtenida con ambos protocolos mostraba igual composición y que el método basado en la pilocarpina proporcionaba un mayor rendimiento en proteína salival (ver apartado correspondiente en resultados), en consecuencia la estimulación con pilocarpina fue utilizada como método de rutina para la obtención de saliva.

Ecuilibración de las muestras de saliva.

Para facilitar la detección e identificación de las proteínas minoritarias, la saliva se equilibró siguiendo el método de Righetti et al. (2006). Este método consiste en una cromatografía de afinidad que utiliza como fase sólida una biblioteca de hexa-péptidos capaces de unir de forma específica y saturable cualquier proteína.

Para aumentar la eficiencia de la equalización todas las muestras de saliva de un mismo sexo se mezclaron y se concentraron unas 10 veces mediante su liofilización y resuspensión en un volumen de agua equivalente a 1/10 de su volumen inicial. Después de la concentración, el exceso de sales se eliminó mediante diálisis frente a PBS durante dos horas a temperatura ambiente, utilizando el kit 3.5K Slade-A-Lyzer Mini (Pierce).

Posteriormente, las muestras fueron equalizadas utilizando el kit ProteoMiner small capacity (Bio-Rad) y siguiendo el protocolo del fabricante. Las dos fracciones de cada muestra obtenidas en este proceso, es decir, las proteínas no retenidas por la columna y las unidas y posteriormente eluidas (saliva equalizada), fueron recogidas y preservadas a -20 °C. Su concentración se midió por espectrofotometría a 280 nm y su composición se analizó por SDS-PAGE.

IV. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS E INMUNOENZIMÁTICAS

Como técnicas de rutina para el análisis de proteínas se han utilizado la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y el western blot. A lo largo del texto se hace referencia a estas técnicas en numerosas ocasiones, por lo cual describimos a continuación su protocolo general y en el apartado correspondiente las condiciones particulares en las que se llevaron a cabo.

SDS-PAGE.

En la mayoría de las ocasiones esta técnica se ha usado como método analítico empleando minigeles de 5 x 9 cm. Más esporádicamente se ha usado como método preparativo en algunos procedimientos de purificación de antígenos, empleando geles grandes, de 15 x 19 cm.

En ambos casos se utilizó un sistema discontinuo, similar al descrito por Laemmli (1970), en el que la concentración del gel de carga fue del 3 % y la del gel separador del 12 %, 15 % o un gradiente del 5-20 %.

Inmediatamente antes de ser cargadas, las muestras se hirvieron durante cinco minutos en tampón desnaturante (TRIS-HCl 31,25 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerina 10 % y 2-mercaptoetanol 5 %). Salvo mención expresa, los minigeles se cargaron con 5-10 µg de proteína por pocillo y los geles grandes con 50-100 µg/pocillo. Como referencia para la valoración de los pesos moleculares, en cada gel se cargó también una mezcla de proteínas marcadoras tratadas de igual modo que el resto de las muestras (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad o Unstained Protein MW Marker de Fermentas).

Las electroforesis se realizaron a 30-45 mA/gel y una vez completadas, las proteínas resueltas en los geles fueron o bien teñidas con diversos colorantes o transferidas a membranas de nitrocelulosa.

TINCIÓN DE LOS GELES.

En líneas generales, la tinción se llevó a cabo con azul de Coomassie o con nitrato de plata siguiendo los protocolos descritos por Morrissey (1981). Cuando los geles se utilizaron para la purificación de proteínas por electroelución, se tiñeron con CuCl_2 siguiendo el protocolo de Harlow y Lane (1988).

Una vez teñidos, los geles fueron escaneados y digitalizados utilizando el ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

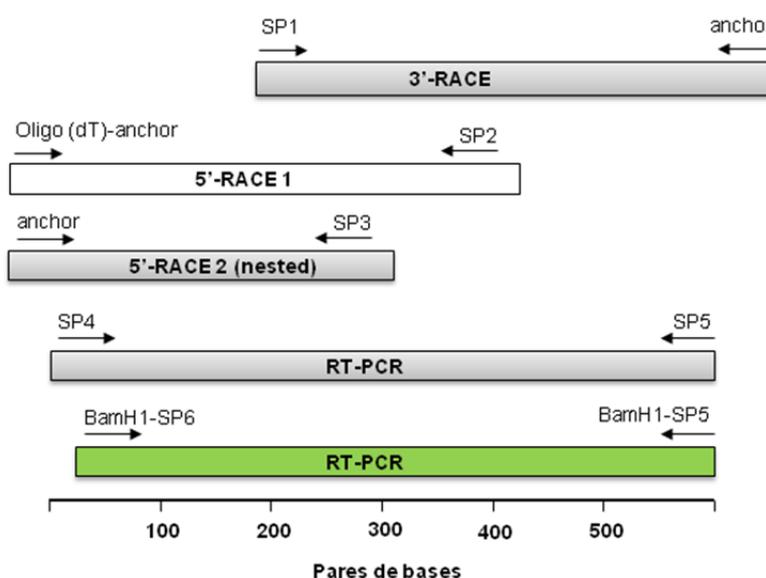
WESTERN BLOT.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin et al. (1979). Las transferencias se realizaron a 400 mA y 4 °C durante 90 minutos en tampón TRIS 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.

Las membranas se lavaron con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. Tras 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente en PBS con Tween20 al 0,05 % (TPBS) se incubaron con el primer anticuerpo diluido en TPBS durante 1 hora a 37 °C. Después de 3 nuevos lavados, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 hora a 37 °C, y tras los correspondientes lavados se revelaron incubándolas con sustratos cromogénicos (4-cloro-1-naftol, diamino-bencidina) o quimioluminiscentes (luminol). Al igual que los geles, las membranas fueron escaneadas y digitalizadas utilizando el ChemiDoc System MP imaging System (Bio-Rad).

OBJETIVO 1.**CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TSGP1 DE *O. MOUBATA*, PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y ANÁLISIS DE SU UTILIDAD COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.****1.1. Obtención de la secuencia codificante completa de cDNA de TSGP1.**

Partiendo de un fragmento de secuencia peptídica de esta proteína (EHSCVYILPP) obtenido por nuestro grupo en trabajos previos (Oleaga et al., 2007), abordamos la obtención de la secuencia completa de su cDNA codificante mediante la aplicación sucesiva de las técnicas 3'- y 5'-RACE y RT-PCR (Cuadro 1).



Cuadro 1. Estrategia para la amplificación y secuenciación del cDNA de TSGP1. Las flechas indican los cebadores utilizados en cada reacción y los recuadros el fragmento de secuencia amplificado. Los recuadros grises representan los fragmentos que fueron clonados y secuenciados en el vector pSC-A. El recuadro verde representa el fragmento subclonado y expresado en el vector pQE-30.

Las reacciones de 3'-RACE y 5'-RACE se llevaron a cabo con el kit 5'/3' RACE 2nd Generation (Roche) siguiendo los protocolos del fabricante.

1.1.1. 3'-RACE.**Transcripción reversa (RT).**

Se llevó a cabo a partir del RNA salival total, utilizando el cebador "oligo d(T)-anchor" suministrado por el kit (ver Tabla I).

Amplificación.

1 µL de cDNA monocatenario se utilizó como molde para la amplificación del extremo 3' de la TSGP1, utilizando el cebador específico SP1, diseñado a partir de la secuencia peptídica

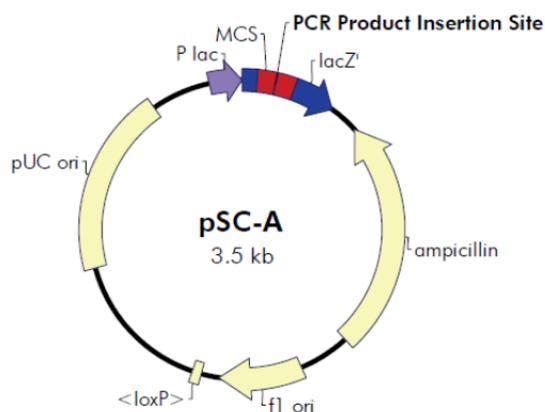
EHSCVYILPP, y el cebador “anchor” incluido en el kit (Tabla I). Las condiciones para esta PCR fueron las siguientes: 35 ciclos (94 °C 15 s, 66 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min a 72 °C.

Purificación.

El producto de esta PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en Tris-Borato-EDTA (TBE) con 0,005 % de bromuro de etidio y la banda correspondiente al fragmento amplificado se cortó del gel de agarosa y purificó con el kit StrataPrep DNA Gel Extraction (Stratagene). El cDNA purificado se re-suspendió en agua ultra-pura estéril y su concentración se determinó por espectrofotometría a 260 nm.

Clonaje y secuenciación.

Una vez purificado, el cDNA se clonó en el vector de secuenciación pSC-A, utilizando el kit StrataClone PCR Cloning (Stratagene).



Cuadro 2. Mapa del vector pSC-A, utilizado para el clonaje directo y secuenciación de productos de PCR (Stratagene)

El plásmido recombinante (cDNA-pSC-A) se utilizó para transformar células competentes (*Escherichia coli* SoloPack) suministradas en el kit. Tras la transformación, las células se sembraron en placas de agar con 100 µg/mL de ampicilina y 80 µL/placa de X-gal al 2 %. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y al día siguiente se seleccionaron varias colonias recombinantes (de color blanco) y se inocularon en cultivos de 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl) con ampicilina (100 µg/mL). Estos cultivos se incubaron a 37 °C, en agitación, hasta el día siguiente.

Las células de los distintos cultivos se recuperaron por centrifugación; posteriormente se lisaron y se extrajo su DNA plasmídico utilizando el kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel).

La presencia de inserto en los plásmidos purificados se verificó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Takara), y los plásmidos recombinantes se secuenciaron en ambos sentidos con los cebadores T3 y T7 (Tabla I) en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Las secuencias obtenidas fueron analizadas, depuradas y alineadas utilizando las aplicaciones Chromas 1.45 y Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

1.1.2. 5'-RACE.

Para el 5'-RACE, se diseñaron dos cebadores específicos (SP2 y SP3, Tabla I) a partir de la secuencia del extremo 3' obtenida previamente.

Síntesis de la primera cadena de cDNA.

La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó a partir del RNA total utilizando el cebador SP2. El cDNA resultante se purificó mediante el kit High Pure PCR Product Purification (Roche). Posteriormente se poliadeniló su extremo 3' y se amplificó mediante una PCR anidada, todo ello siguiendo los protocolos del kit.

Primera PCR.

Cebadores: SP2 y "oligo d(T)-anchor"

Condiciones: 10 ciclos (94 °C 15 s, 30 °C 30 s, 72 °C 40 s) +
25 ciclos (94 °C 15 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min 72 °C

Segunda PCR (anidada).

Utilizamos como molde 1 µL del producto de la primera PCR, diluido 1:20 en agua.

Cebadores: SP3 y "anchor"

Condiciones: 35 ciclos (94 °C 15 s, 64 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min 72 °C

El producto de esta segunda PCR se purificó, clonó y secuenció de forma similar a lo descrito para el fragmento 3'.

1.1.3. RT-PCR.

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos de los fragmentos 3' y 5', se diseñó un nuevo par de cebadores (SP4 y SP5; Tabla I) para amplificar el cDNA completo mediante RT-PCR a partir de RNA total de glándulas salivales.

La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando el kit 1st Strand cDNA Síntesis (Roche) y el oligo-d(T)₁₅, suministrado en el kit, como cebador. Para la PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 35 ciclos (94 °C 15 s, 64 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min 72 °C. El producto amplificado se purificó, clonó en pSC-A y la construcción resultante (pSC-A-OmTSGP1) se secuenció de forma similar a lo descrito para los fragmentos 3' y 5'.

Una vez obtenida la secuencia codificante completa, se amplificó una versión truncada de la misma carente de péptido señal. Para ello se diseñaron dos cebadores adicionales (BamH1-SP5 y BamH1-SP6; Tabla I) con un sitio de corte para la enzima *Bam*HI a fin de facilitar el subclonaje de este fragmento en el vector de expresión pQE-30 (Qiagen). Esta PCR se llevó a cabo en las mismas condiciones que la anterior y el fragmento amplificado se purificó y clonó en pSC-A obteniéndose una construcción (pSC-A-tOmTSGP1) que fue utilizada para el clonaje posterior en un vector de expresión (ver más adelante).

Las tablas I y II recogen las secuencias de los diversos cebadores y la mezcla de reacción utilizados en las PCR descritas en este apartado.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados en la amplificación y clonaje del cDNA de TSGP1.

Nombre	Secuencia
SP1	5'-GAGCACAGCTGCGTGTACATCCTGCCCC
SP2	5'-CTATGGTACCACAGCTCAAGATATGG
SP3	5'-GGTCATTGTCATTGATGTTGCTGCCC
SP4	5'-ATGCACCGGCTGCTACTGCTACTC
SP5	5'-TCAACTTTTTTGCTCGATGACGTCAGC
BamH1-SP6	5'-GGATCCGAAGAAAACAGCGTGGGAAGGG
BamH1-SP5	5'-GGATCCTCAACTTTTTTGCTCGATGACGTCAGC
Oligo d(T)-anchor	5'-ACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT (V=A,C o G)
Anchor	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC
Oligo d(T) ₁₅	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTT (V=A,C o G)
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGG
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGG
pQSEC	5'- CCCGAAAAGTGCCACCTG

Tabla II. Mezcla de reacción de las PCR llevadas a cabo en la amplificación y clonaje del cDNA de la TSGP1.

Componente	Volumen (µL)
Buffer Taq 10x	5
dNTPs (10 mM)	1
Cebador Fw (50 µM)	1
Cebador Rv (50 µM)	1
Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,25
Agua	40,75
cDNA	1
Volumen total	50

La correcta identidad de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas se confirmó mediante un análisis BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), y las correspondientes secuencias peptídicas se obtuvieron con la aplicación “Translate” disponible en el servidor ExpASY (<http://web.expasy.org/translate/>).

1.2. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la TSGP1.

La secuencia peptídica se sometió a un análisis *in silico* utilizando diversas herramientas bioinformáticas para analizar su estructura primaria y las posibles modificaciones postransduccionales: cálculo del punto isoelectrico (pI) y el peso molecular (PM) (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html); predicción de señales de secreción con SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004a) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); localización de sitios de N-glicosilación y O-glicosilación (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>;

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>); predicción de dominios transmembrana con TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) y búsqueda de sitios de anclaje a la membrana tipo glicosil-fosfatidil inositol (GPI) con big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 2000) (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html).

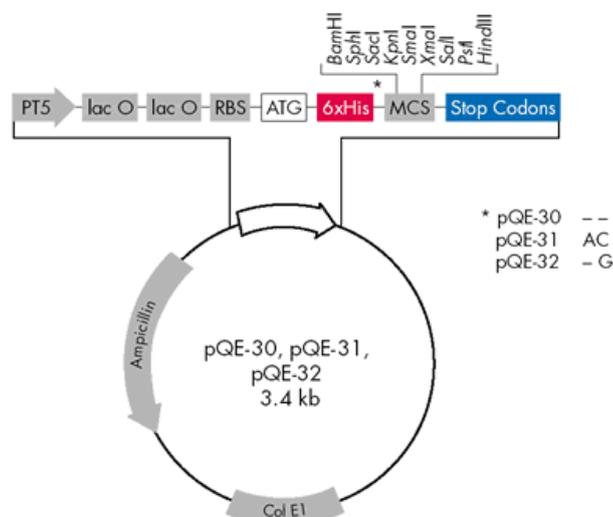
A continuación se llevó a cabo un análisis BLASTp para la búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos NCBI nr y Uniprot (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.uniprot.org/>). Las secuencias homólogas a TSGP1 con un valor de E inferior a 10^{-15} se alinearon con el programa ClustalW 2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y, basándonos en este alineamiento, se llevó a cabo un análisis filogenético con el paquete Mega v5.05 (Tamura et al., 2011).

Por último, se efectuó la predicción de la estructura secundaria y el modelado tridimensional de TSGP1 de *O. moubata* con el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) (Kelley y Sternberg, 2009), los cuales se compararon con los correspondientes a la TSGP1 de *O. savignyi*. Los modelos tridimensionales se visualizaron con la aplicación Pymol package (DeLano, 2002).

1.3. Expresión y purificación de TSGP1 recombinante truncada (rtOmTSGP1).

Se decidió expresar la versión truncada de la TSGP1 (sin péptido señal), en lugar de la proteína completa, por su mayor rendimiento en proteína recombinante y porque dicha recombinante coincide con el antígeno nativo maduro inoculado al hospedador con la saliva.

La recombinante truncada se expresó en el vector pQE-30 (Qiagen). Este vector produce péptidos recombinantes con una marca de 6 residuos de histidina (His-tag) en el extremo amino terminal (Cuadro 3), que permite la posterior purificación de la recombinante mediante cromatografía de afinidad en resina de níquel.



Cuadro 3. Mapa de los vectores de la serie pQE-30 (Qiagen).

1.3.1. Clonaje del cDNA tOmTSGP1 en el vector de expresión pQE-30.

Preparación del inserto.

El plásmido pSC-A-tOmTSGP1 obtenido previamente fue digerido con la enzima *Bam*HI (Takara) para liberar el inserto. Dicha enzima se había seleccionado, entre las incluidas en el “polylinker” del vector pQE-30, tras comprobar con NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) que la secuencia codificante de la proteína no poseía sitios de corte para ella.

La mezcla de reacción (Tabla III) se incubó a 37 °C durante 2 horas y el inserto se separó en gel de agarosa y se purificó como en ocasiones anteriores. La concentración de producto purificado se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Tabla III. Mezcla de reacción para la digestión con *Bam*HI.

Componente	Volumen (μL)
DNA (pSC-A-tOmTSGP1)	10
<i>Bam</i> HI (10 unidades)	1
Buffer 10x	2
Agua	7
Volumen total	20

Preparación del vector pQE-30

En paralelo, el vector pQE-30 fue digerido, desfosforilado y purificado del modo siguiente:

1. Digestión con *Bam*HI: incubación 3 horas a 37 °C.

Tabla IV. Mezcla de reacción para la digestión con *Bam*HI.

Componente	Volumen (μL)
pQE-30 (9 μg)	100
<i>Bam</i> HI (90 unidades)	9
Buffer 10x	13
Agua	8
Volumen total	130

2. Purificación con Fenol/Cloroformo.
 - Adición a la mezcla de reacción anterior de un volumen equivalente de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
 - Centrifugación a 12.000 g, 1 minuto a temperatura ambiente, y transferencia de la fase acuosa (con el DNA) a un tubo nuevo.

3. Precipitación con acetato de sodio.
 - Adición de 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 + 2 volúmenes de etanol a 4 °C e incubación toda la noche a -80 °C para precipitar el DNA.
 - Centrifugación a 12.000 g, 15 minutos a 4 °C.
 - Lavado del sedimento con etanol 80 % a 4 °C.
 - Centrifugación a 12.000 g, 15 minutos a 4 °C.
 - Secado al aire o al vacío para eliminar los restos de etanol.
 - Resuspensión en 60 µL de agua Milli-Q.
4. Desfosforilación: incubación 15 minutos a 37 °C y 15 minutos a 74 °C para inactivar la fosfatasa.

Tabla V. Mezcla de reacción para la desfosforilación.

Componente	Volumen (µL)
pQE-30 digerido	60
Thermosensitive Alkaline Phosphatase (TSAP) (Promega)	1
Multi-Core 10x buffer	7
Agua	2
Volumen total	70

5. Purificación a partir de gel de agarosa.
6. Determinación de la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm.

Ligación

La ligación se llevó a cabo en una proporción 5:1 (inserto:vector), partiendo de 100 ng de vector pQE-30 digerido y desfosforilado y utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Roche). La reacción se incubó a 4 °C durante 16 horas. En paralelo se incubó una reacción de ligación sin inserto que se usó como control negativo.

Tabla VI. Mezcla de reacción para la ligación.

	Ligación	Control negativo
Componente	Volumen (µL)	Volumen (µL)
pQE-30	2,5	2,5
tTSGP1	6,8	-
Buffer10x	2	2
Ligasa	2	2
Agua	6,7	13,5
Volumen total	20	20

1.3.2. Transformación de células *E. coli* M15 competentes con pQE-30-tOmTSGP1.

El producto de la ligación anterior se utilizó para transformar células que soportaran la expresión de la proteína recombinante, en este caso *E. coli* M15 (Qiagen).

Tanto la transformación de células M15 competentes, como la expresión y purificación de la proteína recombinante se efectuaron, en líneas generales, siguiendo el protocolo descrito en el manual del fabricante (The QIA expressionist, Qiagen).

Para la transformación el protocolo fue el siguiente:

1. Descongelación en hielo de una alícuota de 100 μ L de células *E. coli* M15 y adición de 10 μ L de la reacción de ligación.
2. Incubación de la mezcla en hielo durante 20 minutos.
3. Choque térmico a 42 °C durante 90 segundos e incubación en hielo durante 2 minutos.
4. Adición de 500 μ L de medio LB precalentado a 37 °C e incubación durante 1 hora a 37 °C en agitación.
5. Sembrado de alícuotas de 50, 100 y 200 μ L de la transformación en placas de agar con 25 μ g/mL de kanamicina y 100 μ g/mL de ampicilina e incubación a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente, se seleccionaron al azar tres colonias de cada una de las placas sembradas con las células transformadas y se crecieron en 5 mL de medio LB con 25 μ g/mL de kanamicina y 100 μ g/mL de ampicilina durante toda la noche a 37 °C. De cada uno de estos cultivos se tomó una alícuota para su almacenamiento en glicerol al 15 % a -80 °C y el resto se utilizó para purificar el DNA plasmídico y secuenciar el inserto a fin de verificar si la secuencia, la orientación y el marco de lectura eran los correctos. Para esta secuenciación se utilizó el cebador pQSEC (Tabla I). Los clones correctos se almacenaron a -80 °C.

1.3.3. Expresión de la proteína recombinante.

Una alícuota del clon seleccionado (pQE-30-tOmTSGP1 en células M15), se inoculó en medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y 25 μ g/mL de kanamicina, y se incubó a 37 °C y 180 rpm, durante toda la noche. A la mañana siguiente este preinóculo se diluyó en un volumen 20 veces superior del mismo medio de cultivo y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. En ese momento se indujo la expresión con 1 mM de Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) (Takara) durante 3 horas manteniendo las mismas condiciones de cultivo.

Transcurrido ese tiempo las células se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en tampón de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,9). A continuación, la mezcla anterior se sonicó durante 5 ciclos de 30 segundos y el lisado celular se centrifugó a 20.000 g durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante y el sedimento. Ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie para comprobar si la proteína recombinante se producía de forma soluble o insoluble.

1.3.4. Purificación de la proteína recombinante (rtOmTSGP1).

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA.

Como se indica en el capítulo de resultados, esta proteína se expresó en su totalidad de forma insoluble, por lo que antes de purificarla fue necesario solubilizarla con un agente caotrópico y realizar la purificación en condiciones desnaturalizantes. Para ello, el sedimento de la lisis celular se solubilizó en el tampón de lisis con urea 8 M (tampón de solubilización). Una vez solubilizado, se centrifugó 30 minutos a 20.000 g y se recogió el sobrenadante.

La cromatografía de afinidad con Ni^{2+} se realizó en columnas empaquetadas con 1 mL de resina comercial (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) que se equilibró mediante el paso secuencial de 2 mL de agua ultrapura y 3 mL de tampón de solubilización.

Una vez preparada la columna, se filtró 1 mL de la fracción solubilizada. Posteriormente, a fin de favorecer la re-naturalización y el plegamiento de la proteína unida a la columna, se efectuaron varios lavados sucesivos con 5 mL/lavado de tampón de solubilización conteniendo cantidades decrecientes de urea (6 M, 4 M, 2 M y 0 M). Por último, la proteína fue eluida con 250 mM de imidazol en tampón NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM (pH 7,9). Se realizaron 4 eluciones consecutivas con 1 mL de este tampón y las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE para verificar la presencia y pureza de la proteína.

Las fracciones que contenían la proteína purificada se dializaron frente a PBS durante 24 horas a 4 °C, se determinó su concentración mediante espectrofotometría a 280 nm y se almacenaron a -80 °C hasta su uso como antígeno diagnóstico en pruebas de ELISA.

1.4. Utilidad de la rtOmTSGP1 como herramienta diagnóstica.

Para evaluar la especificidad y sensibilidad de la TSGP1 en la detección de anticuerpos anti-*O. moubata* y compararlas con las del extracto completo de glándulas salivales (SGE), ambos antígenos se enfrentaron por ELISA con un panel de sueros porcinos bien definidos.

1.4.1. Sueros analizados

Para este análisis se emplearon 172 sueros con las siguientes características:

- i. Sueros anti-*O. moubata*: 18 sueros procedentes de cerdos infestados experimentalmente con *O. moubata*. Estos sueros (tres por animal) fueron obtenidos por Baranda et al. (2000) a partir de 6 cerdos infestados con 1.000 ninfas-1 ó con 50 adultos por cerdo, en 3 ocasiones, a intervalos quincenales. Las muestras de sangre se recogieron a los siete días de la primera infestación (respuesta primaria), y a los siete días y dos meses y medio después de la tercera infestación (respuesta secundaria y residual, respectivamente).

- ii. Sueros frente *O. erraticus*: 27 sueros obtenidos también por Baranda et al. (2000) de forma similar a los anteriores, a partir de 9 cerdos infectados experimentalmente con 1.000 larvas, con 200 ninfas-1 ó con 50 adultos de esta especie.
- iii. Sueros frente a otros ectoparásitos: 6 sueros obtenidos por Pérez-Sánchez et al. (1992); 5 de ellos procedentes de cerdos infestados experimentalmente con 4 especies de garrapatas duras (*D. marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *R. turanicus* y *R. bursa*) y con el piojo porcino *H. suis*; el sexto suero procedía de un cerdo intensamente infestado de forma natural por el ácaro de la sarna *S. scabiei*.
- iv. Sueros negativos experimentales: 21 sueros negativos, tomados de los cerdos anteriores, antes de practicar las infestaciones experimentales.
- v. Sueros negativos de campo: 100 sueros de cerdos de campo recogidos por Oleaga-Pérez et al. (1994) en explotaciones en extensivo de la provincia de Salamanca para la detección de anticuerpos anti-*O. erraticus*. Estos cerdos, por su modo de vida, libre en el campo, estuvieron expuestos a una gran variedad de ectoparásitos, pudiendo ser portadores de anticuerpos frente a ellos. Estas muestras se utilizaron como sueros negativos de campo al proceder de una zona en la que *O. moubata* no está presente.

1.4.2. Protocolo ELISA.

La comparación del valor diagnóstico de la rtOmTSGP1 con el SGE de *O. moubata* para la detección específica de anticuerpos IgG anti-*O. moubata* se realizó mediante la técnica de ELISA utilizando un protocolo estándar.

Brevemente, las placas de poliestireno (Corning) fueron tapizadas con 1 µg de SGE ó 100 ng de rtOmTSGP1 por pocillo, en tampón carbonato pH 9,6, lavadas con Tween20 al 0,05 % en PBS (TPBS) y pos-tapizadas con BSA al 1 % en PBS. Tras lavarlas de nuevo, se incubaron, sucesivamente, con los sueros diluidos 1/300 en TPBS y con un anticuerpo anti-IgG porcina-peroxidasa (Sigma) diluido 1/6.000 en TPBS. La reacción se reveló con orto-fenilendiamina (OPD, Sigma) y se detuvo con ácido sulfúrico 3 N. La densidad óptica (DO) a 492 nm se leyó en el espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific).

1.4.3. Análisis estadístico.

Para analizar los resultados de los sueros y poder comparar los resultados de las distintas placas, cada valor de DO se transformó en índice serológico (IS) aplicando la siguiente fórmula: $IS = (CN - S) \times 100 / (CN - CP)$ donde CN y CP son, respectivamente, las DOs de los sueros controles negativos y positivos y S la DO de los sueros analizados.

Los sueros se clasificaron en grupos, de acuerdo con su origen y especificidad. En cada grupo se calculó la media de los índices serológicos obtenidos con el antígeno recombinante (rtOmTSGP1) y con el SGE y se compararon como pares relacionados mediante el test de la *t* de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Para establecer el umbral de positividad de cada antígeno (rtOmTSGP1 y SGE) se construyeron las correspondientes curvas ROC (Receiver-Operator Characteristic) utilizando los valores de IS. El umbral de positividad/negatividad se definió como el valor de IS que presentaba la mayor eficacia diagnóstica, calculada como la suma de la sensibilidad y la especificidad dividida entre dos. El área bajo la curva se utilizó para comparar la eficacia diagnóstica de ambos antígenos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v17.

OBJETIVO 2.

ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE *O. MOUBATA*.

El análisis proteómico de la saliva se llevó a cabo mediante dos tipos de abordajes.

El primero fue de tipo “off-gel” y consistió en la digestión con tripsina de las proteínas salivales en solución, separación de los péptidos tripticos por cromatografía líquida y análisis de éstos por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Este abordaje se aplicó a las muestras de saliva nativa y ecualizada (de machos y hembras) y se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

El segundo fue un abordaje clásico “in-gel” y consistió en la separación de las muestras por SDS-PAGE monodimensional, cortado del gel en bandas, digestión con tripsina en gel y análisis de los péptidos tripticos por LC-MS/MS. Este segundo tipo de análisis se aplicó sólo a muestras de saliva nativa (sin ecualizar) y se efectuó en la Sección de Proteómica de la Universidad de Valencia.

2.1. Análisis proteómico “off-gel”.

2.1.1. Digestión con tripsina.

Las muestras de saliva (10 µg/muestra) se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %, a 4 °C durante toda la noche. Los sedimentos se lavaron con acetona a -20 °C y se redisolviaron en 20 µL de NH₄HCO₃ 50 mM con 50 % de trifluoroetanol (TFE). A continuación, se redujeron con ditioneitol (DTT) 10 mM durante 30 minutos a 60 °C, se alquilaron con iodoacetamida 55 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se digirieron durante toda la noche a 37 °C con 2,5 ng/µL de tripsina (Promega) en un volumen total de 200 µL de NH₄HCO₃ 50 mM y TFE 5 %. Las reacciones se detuvieron añadiendo ácido trifluoroacético (TFA) al 10 % hasta alcanzar una concentración del 0,1 %, se filtraron a través de 0,22 µm y se secaron al vacío.

2.1.2. LC-MS/MS.

Se llevó a cabo siguiendo un protocolo similar al descrito por de la Torre Escudero et al. (2011), que describimos a continuación.

Los péptidos resultantes de las digestiones anteriores se resuspendieron en 6 µL de acetonitrilo al 5 % y TFA al 0,1 %. 5 µL de estas muestras se cargaron en una precolumna PepMap C18, 300 µm × 5 mm (LC Packings) y se desalaron con un flujo isocrático de TFA al 0,1 % durante 3 minutos (30 µL/min). Posteriormente, se cargaron en una columna analítica PepMap C18 3 µm 100 Å 75 µm × 15 cm (LC Packings) equilibrada con acetonitrilo al 5 % y ácido fórmico al 0,1 % y se eluyeron con un gradiente 5-40 % de solvente B (acetonitrilo al 95 % con ácido fórmico al 0,1 %) a 300 µL/minuto durante 120 minutos. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI-Q-TOF (QSTAR-XL, AB Sciex) realizándose experimentos de IDA (Information Dependent Adquisition) a lo largo de todo el cromatograma.

Para ello se seleccionaron automáticamente los 50 precursores más intensos por ciclo de MS y se fragmentaron.

2.1.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas.

La búsqueda en las bases de datos y la identificación de las proteínas se llevó a cabo de forma similar a lo descrito en trabajos previos (de la Torre Escudero et al., 2011), en los cuales se usó el motor Mascot v.2.2 (Matrix Science) para interrogar bases de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags) y el Protein Pilot v.2.0 (Applied Biosystems) para interrogar bases de datos de proteínas en formato FASTA.

Para las búsquedas por Mascot, la información combinada de MS y MS/MS se procesó conjuntamente a través del software Mascot Daemon v2.2.2 (Matrix Science) y se utilizó para interrogar la base de datos EST_acari del NCBI con los siguientes parámetros: especificidad por tripsina, se permitió un máximo de dos errores de digestión, 80 ppm de tolerancia en la masa de los péptidos (en modo MS) y 0,5 Da en los iones MS/MS; la carbamidometilación de cisteínas se estableció como modificación fija y la oxidación de metionina y la desaminación de asparagina y glutamina como modificaciones variables. El umbral de significación se estableció en 0,05 (equivalente a un “score” ≥ 50) para mantener la tasa de falsos positivos por debajo del 5 %. Una proteína se consideró correctamente identificada cuando al menos dos de sus péptidos presentaron un “score” superior al umbral de identidad suministrado por el servidor Mascot (al menos dos péptidos marcados en rojo y negrita).

La abundancia relativa de cada proteína identificada en la muestra se estimó utilizando su valor de emPAI o “índice de abundancia proteica modificado exponencialmente” que es directamente proporcional al contenido de esa proteína en la muestra (Ishihama et al., 2005). Para ello se calculó el porcentaje de emPAI de cada proteína (% emPAI) dividiendo el valor de emPAI de dicha proteína entre la suma de todos los valores de emPAI de las proteínas de esa muestra y multiplicándolo por 100.

En paralelo se realizaron búsquedas con el algoritmo Paragon de Protein Pilot en la base de datos de proteínas NCBI nr_metazoa, con los siguientes parámetros: especificidad por péptidos trípticos, alquilación de cisteínas y taxonomía restringida a metazoos. Para evitar utilizar la misma evidencia espectral con más de una proteína, las proteínas identificadas fueron agrupadas con el algoritmo Protein-Pilot Progroup basándose en su espectro MS/MS. De este modo las proteínas que compartían espectros MS/MS fueron incluidas en el mismo grupo con independencia de la secuencia peptídica asignada. La proteína de cada grupo capaz de explicar más datos espectrales con confianza se designó como proteína principal del grupo y sólo estas se incluyeron en los listados. Una proteína se consideró correctamente identificada cuando presentó un valor de “Protein pilot unused score” superior a 1,3, que es equivalente a un umbral de confianza mayor del 95 %. Con estas condiciones, la tasa de falsos positivos fue menor del 1 %.

2.2. Análisis proteómico clásico.

2.2.1. SDS-PAGE.

Las muestras de saliva nativa (sin ecualizar) de machos y hembras se separaron en geles en gradiente 5–20 % y se tiñeron con el colorante fluorescente Sypro Ruby (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante. Los geles se digitalizaron en el ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) y las correspondientes imágenes se analizaron con la aplicación Image Lab software (Bio-Rad), incluyendo la medida de la abundancia relativa de las distintas bandas detectadas. Todas las bandas (13 en la muestra de hembras y 16 en la de machos) fueron cortadas del gel y enviadas para su análisis a la Sección de Proteómica de la Universidad de Valencia.

2.2.2. Digestión con tripsina y LC-MS/MS.

Los fragmentos de gel se destiñeron con acetonitrilo al 50 %, se deshidrataron con acetonitrilo 100 %, se secaron y se rehidrataron con NH_4HCO_3 100 mM. A continuación, se redujeron con DTT 10 mM durante 30 minutos a 60 °C, se alquilaron con iodoacetamida 55 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se digirieron con 20 ng/ μL de tripsina (Promega) en NH_4HCO_3 25 mM toda la noche a 37 °C. Las reacciones se detuvieron añadiendo TFA al 10 % hasta alcanzar una concentración del 0,1 %. Los sobrenadantes se filtraron a través de 0,22 μm , se secaron mediante centrifugación al vacío y se resuspendieron en 6 μL de acetonitrilo al 5 % y TFA al 0,1 %.

A continuación, 5 μL de estas muestras se cargaron en una precolumna NanoLC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm \times 15 cm (Eksigen) y se desalaron con TFA 0,1 % (2 $\mu\text{L}/\text{min}$) durante 10 minutos. Seguidamente, los péptidos se cargaron en una columna analítica NanoLC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm \times 25 cm (Eksigen) y se eluyeron con un gradiente lineal 5-40 % de solvente B (acetonitrilo al 95 % con ácido fórmico al 0,1 %) a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 30 minutos. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI-Q-TOF (5600 TripleTOF, AB Sciex) realizándose experimentos IDA a lo largo de todo el cromatograma, para lo cual se seleccionaron automáticamente los 50 precursores más intensos por ciclo de MS y se fragmentaron.

2.2.3. Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas.

La información combinada de los espectros MS y MS/MS se procesó conjuntamente a través del software Mascot v.2.3.02 (Matrix Science) y se utilizó para interrogar las bases de datos NCBI nr_metazoa y EST_acari con los siguientes parámetros: especificidad por tripsina, se permitió un error de digestión, 50 ppm de tolerancia en la masa de los péptidos (en modo MS) y 0,6 Da en los iones MS/MS; la carbamidometilación de cisteínas se estableció como modificación fija y la oxidación de metionina y la desaminación de asparagina y glutamina como modificaciones variables. El umbral de significación se estableció en 0,05 y las proteínas se consideraron correctamente identificadas cuando al menos dos de sus péptidos presentaron un “score” superior al umbral de identidad suministrado por el servidor Mascot (al menos dos péptidos marcados en rojo y negrita).

2.3. Análisis bioinformático de las secuencias, anotación funcional y clasificación de las proteínas identificadas.

Las proteínas identificadas se sometieron a un análisis *in silico* para anotar su posible función y localización celular y facilitar su clasificación.

En primer lugar las secuencias peptídicas fueron comparadas por BLAST en las siguientes bases de datos: NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), GO (<http://amigo.geneontology.org>) y UniProt (<http://www.uniprot.org>) incluyendo la búsqueda de dominios conservados en las bases Pfam, SMART, Kog y conserved domains (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

A continuación se determinó la presencia de péptido señal usando SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Bendtsen et al., 2004b); la presencia de hélices transmembrana con la aplicación TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>); la presencia de sitios de anclaje GPI con la aplicación big-PI Predictor (<http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpiserver.html>) (Eisenhaber et al., 2000) y la existencia de vías de secreción proteica distintas de las clásicas con la herramienta SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (Bendtsen et al., 2004a).

La función de las proteínas se anotó de acuerdo con los resultados de las comparaciones anteriores y teniendo en cuenta lo descrito en la bibliografía para los sialomas de otras especies de garrapatas (artículos y revisiones citados en el capítulo de Revisión Bibliográfica).

Siguiendo el modelo propuesto en la descripción de dichos sialomas, las proteínas fueron clasificadas en dos grandes categorías, secretadas e intracelulares/housekeeping, y, dentro de estas categorías, en diferentes grupos de acuerdo con su función y/o pertenencia a familias proteicas.

Las proteínas para las cuales no se pudo predecir su función se anotaron como “función desconocida”.

Por último, se identificaron algunas proteínas del hospedador que se clasificaron en un grupo aparte.

2.4. Confirmación de resultados del análisis proteómico mediante western blot.

El análisis proteómico indicaba la presencia en la saliva de *O. moubata* de isoformas secretadas de determinadas proteínas intracelulares. Este resultado se confirmó mediante western blot para dos de esas proteínas, la actina y la enolasa. Para ello se enfrentaron muestras de saliva nativa de machos y hembras con sueros hiperinmunes frente a estas dos proteínas, obtenidos en conejos a lo largo del desarrollo de esta tesis (ver más adelante los apartados 3.5. y 5.2).

Para este western blot, muestras de 15 µg de saliva de hembras y machos y de 1 µg de proteína recombinante se resolvieron por SDS-PAGE en geles en gradiente del 5-20 %.

Tras la transferencia a nitrocelulosa, las membranas se bloquearon con BSA al 1 % y se incubaron con los sueros hiperinmunes frente a la actina y la enolasa (1/100), y con una mezcla de los sueros porcinos anti-*O. moubata* (1/100) obtenidos mediante infestación natural en trabajos previos (Baranda et al., 2000). Posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo-peroxidasa o anti-IgG porcina-peroxidasa (ambos de Sigma y diluidos 1/2.000) y se revelaron con 4-Cl-1-naftol. Como controles negativos se incluyeron en este experimento unas membranas similares a las anteriores incubadas con los correspondientes sueros pre-inmunes de conejo o cerdo.

OBJETIVO 3.

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENOLASA SALIVAL DE *O. MOUBATA*.

3.1. Obtención de la secuencia codificante completa de cDNA de enolasa.

La secuencia de cDNA de la enolasa se amplificó por RT-PCR a partir de RNA total de glándulas salivales. La transcripción reversa se llevó a cabo usando la “Transcriptor Reverse Transcriptase” y el cebador “oligo d(T)-anchor” del kit 5’/3’ RACE Kit 2nd Generation (Roche) según el protocolo del fabricante.

Para la amplificación por PCR se utilizaron un cebador degenerado (dOmEno5), diseñado a partir de las secuencias de enolasa de *I. scapularis* (GeneBank: XM_002408335.1), *Aleuroglyphus ovatus* (GeneBank: EU106613.1) y *Glycyphagus domesticus* (GeneBank: AY288683.1), y el cebador “anchor” suministrado en el kit (Tabla I).

La mezcla de reacción fue similar a la utilizada para la TSGP1 (Tabla II) y las condiciones fueron las siguientes: 5 ciclos (94 °C 15 s, 43 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 53 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min 72 °C.

El producto de esta PCR se separó en gel de agarosa y la banda correspondiente, de unos 1300 pares de bases (pb), fue extraída del gel, purificada y clonada en el vector pSC-A. El inserto fue secuenciado en ambos sentidos con los cebadores T3 y T7 y con un par de cebadores internos diseñados *ad hoc* para verificar y completar la secuencia de la zona central (OmEnoSeq5 y OmEnoSeq3, Tabla VII).

Tabla VII. Oligonucleótidos empleados en la amplificación y clonaje del cDNA de enolasa.

Nombre	Secuencia
dOmEno5	5'- ATGCCRATCMMSMARRTWYWTGC
OmEnoSeq5	5'-CTGGCAACCACAAGATTCTCC
OmEnoSeq3	5'-GCCGTAGCGTTGAATTTGGTC
BamH1OmEno5	5'- GGATCCATGCCTATCACGAAGATTAATGC
BamH1OmEno3	5'- GGATCCTTAAGCGGGGTGCTGAAATTC

3.2. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la enolasa.

La secuencia peptídica obtenida tras la traducción *in silico* se utilizó para la búsqueda de ortólogos en la base de datos NCBI nr mediante un análisis BLAST. Las secuencias recuperadas presentaban todas ellas valores de E iguales a cero e incluían ortólogos de especies muy separadas en la escala evolutiva, desde ixódidos hasta *Homo sapiens*. De todas ellas se seleccionaron las pertenecientes a artrópodos hematófagos y se alinearon, junto con la enolasa humana utilizando el programa ClustalW 2.1. Basándonos en este alineamiento, se llevó a cabo un análisis filogenético con el paquete Mega v5.05 (Tamura et al., 2011), en el que la secuencia de la enolasa humana se usó como grupo externo.

Como en el caso de la TSGP1, la secuencia de aminoácidos de la enolasa fue analizada con varias herramientas bioinformáticas para determinar su punto isoeléctrico y peso molecular, la presencia de motivos conservados, la existencia de señales de secreción clásicas o alternativas y la presencia de hélices transmembrana y/o de sitios de anclaje a la membrana tipo GPI.

3.3. Expresión y purificación de la proteína recombinante (rOmEno).

El protocolo utilizado fue similar al seguido en la expresión y purificación de la proteína recombinante rtOmTSGP1.

Para ello se diseñaron nuevos cebadores (BamH1OmEno5 y BamH1OmEno3) que incluían en sus extremos el sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI, con el fin de facilitar su clonaje en el vector de expresión pQE-30. La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 35 ciclos (94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 7 min 72 °C.

El producto de la amplificación se purificó a partir de un gel de agarosa y se clonó en el vector pQE-30. Después de comprobar mediante secuenciación con el cebador pQSEC la correcta orientación del inserto, se transformaron células *E. coli* M15 y se procedió a la expresión y purificación de la proteína recombinante.

Como se indica en el capítulo de resultados, esta proteína se expresó en su totalidad de forma insoluble, por lo que antes de purificarla fue necesario solubilizarla con urea 8 M y realizar su purificación en condiciones desnaturalizantes siguiendo idéntico protocolo al descrito para la rtOmTSGP1.

3.4. Análisis funcional de la enolasa.

Para comprobar la posible actividad de la enolasa como ligando activador de plasminógeno y/o como ligando antagonista de P-selectina, se llevaron a cabo varios análisis con la proteína recombinante (rOmEno) y con la enolasa nativa contenida en la saliva de *O. moubata*.

Adicionalmente, se llevó a cabo el silenciamiento del gen de la enolasa mediante RNAi para evaluar el efecto fenotípico de dicho silenciamiento en la alimentación, reproducción y supervivencia de *O. moubata*.

3.4.1. Ensayos de unión a plasminógeno.

La unión de la enolasa al plasminógeno se evaluó mediante ELISA siguiendo un protocolo similar al descrito por de la Torre-Escudero et al. (2010).

Se efectuó en placas de 96 pocillos que fueron tapizadas con las siguientes proteínas, diluidas en 100 μ L/pocillo de tampón carbonato pH 9,6, durante toda la noche a 4 °C:

- 2 μ g de saliva *O. moubata* (enolasa nativa)
- 1 μ g de rOmEno
- 1 μ g de rOmEno tratada con DTT 2 %
- 1 μ g α -caseína bovina (Sigma)
- 1 μ g de BSA (Sigma)
- 1 μ g de gelatina (Sigma)
- 1 μ g γ -globulina bovina (GGB, Sigma)

La α -caseína se incluyó como control positivo de unión a plasminógeno (Markus et al., 1993; Heegaard et al., 1994, 1997), mientras que la BSA, la gelatina y la GGB se utilizaron como controles negativos.

Tras el tapizado, las placas se lavaron tres veces con 200 μ L/pocillo de TPBS y se bloquearon con 200 μ L/pocillo de BSA al 3 % en PBS. A continuación, se realizaron otros tres lavados y se incubó con cantidades crecientes (desde 0 a 3 μ g/pocillo) de plasminógeno humano (Acris Antibodies) diluido en 100 μ L/pocillo de PBS. Después de tres nuevos lavados, las muestras se incubaron de forma sucesiva con 100 μ L/pocillo de anti-plasminógeno humano producido en oveja (Acris Antibodies), diluido 1/2.000 en TPBS, y de anti-IgG de oveja-peroxidasa (Sigma), diluido 1/4.000 en TPBS. Todas las incubaciones se realizaron durante 1 hora a 37 °C y los lavados entre incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. La reacción se reveló con OPD y se paró con ácido sulfúrico 3 N. La absorbancia se midió a 492 nm. Todas las reacciones se analizaron por cuadruplicado.

Para determinar el papel desempeñado por los residuos de lisina de la enolasa en la interacción con el plasminógeno, se llevaron a cabo ensayos idénticos a los anteriores en los que se incluyó el ácido ϵ -aminocaproico (ϵ ACA) (Sigma) durante la incubación con plasminógeno. El ϵ ACA es un análogo de lisina que inhibe competitivamente la unión del plasminógeno a su receptor y fue usado a una concentración fija de 40 mM de acuerdo con el protocolo descrito por de la Torre-Escudero et al. (2010) y Nogueira et al. (2012).

3.4.2. Ensayos de activación de plasminógeno.

Para comprobar si la enolasa de *O. moubata*, además de unir plasminógeno, es capaz de activarlo y generar plasmina, se efectuaron ensayos en los que se midió la actividad amidolítica de la plasmina naciente sobre un sustrato cromogénico específico, en concreto el S2251 (D-valil-leucil-lisina-p-nitroanilina diclorhidrato) (Sigma).

Se realizaron dos tipos de ensayos: el primero en fase líquida, siguiendo el protocolo descrito por de la Torre-Escudero et al. (2010), y el segundo con la enolasa inmovilizada sobre una fase sólida, siguiendo el protocolo de Floden et al. (2011).

Ensayo en fase líquida.

Se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se depositó una mezcla de reacción que contenía:

- 1 µg de rOmEno ó 2 µg de saliva ó 1 µg de BSA (control negativo)
- 2 µg de plasminógeno
- 0,15 mM de sustrato cromogénico S2251
- 15 ng del activador tisular del plasminógeno humano (tPA, Acris Antibodies)
- PBS hasta un volumen total de 100 µL

El tPA se añadió en último lugar para iniciar la reacción de activación del plasminógeno. Las placas se incubaron a 37 °C y la generación de plasmina se monitorizó cuantificando la hidrólisis del sustrato mediante la medida de la absorbancia a 405 nm, cada 30 minutos, durante 4 horas desde el momento en que se inició la reacción. Simultáneamente se llevaron a cabo varios ensayos control en los que se omitió alternativamente cada uno de los componentes de la mezcla de reacción. Todas las reacciones se analizaron por cuadruplicado.

Ensayo en fase sólida.

También se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. Las placas se tapizaron con las siguientes proteínas, diluidas en 100 µL de PBS, durante toda la noche a 4°C:

- 1 µg de rOmEno
- 2 µg de saliva
- 1 µg de BSA (control negativo)

Tras el tapizado, las placas se lavaron una vez con TPBS y se postapizaron con BSA al 2 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, lavándolas de nuevo, tres veces, con TPBS. Posteriormente, se incubaron con 2 µg/pocillo de plasminógeno en 100 µL de PBS durante 2 horas a 37 °C. Tras nuevos lavados con TPBS, se añadieron 15 ng/pocillo de tPA humano y, a continuación, el sustrato cromogénico S2251 hasta una concentración final de 0,15 mM, todo ello en 100 µL de PBS. Las placas se incubaron a 37 °C y transcurridas 2 horas se midió la absorbancia a 405 nm. Simultáneamente se llevaron a cabo ensayos control en los que se omitió alternativamente el plasminógeno, el tPA o el sustrato. Todas las reacciones se analizaron por cuadruplicado.

3.4.3. Ensayos de unión a P-selectina.

Para determinar si la enolasa de *O. moubata* es capaz de unirse a P-selectina, se realizaron dos tipos de ensayos: un ELISA y una inmunoprecipitación (IP).

ELISA.

El ensayo de ELISA fue similar al utilizado por García-Varas et al. (2010).

Las placas de 96 pocillos se tapizaron con 10 µg de SGE (control positivo), 10 µg de saliva, 1 µg de rOmEno ó 1 µg de BSA (control negativo), en 100 µL de tampón carbonato, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron una vez con TPBS, se postapizaron con BSA al 2 % en PBS, durante 1 hora a 37 °C, y se volvieron a lavar tres veces con TPBS. A continuación se incubaron con 250 ng/pocillo de una quimera recombinante, la P-selectina/IgG humana (R&D Systems), en 100 µL de PBS con CaCl₂ 2 mM, durante 2 horas a 37 °C. Tras lavarlas de nuevo con TPBS se incubaron con 100 µL/pocillo de anti-IgG humana-peroxidasa (Sigma) diluida 1/2.000 en TPBS durante 1 hora a 37 °C. La reacción se desarrolló utilizando OPD como sustrato, se detuvo con ácido sulfúrico 3 N y se leyó la absorbancia a 492 nm.

Para cada uno de los antígenos tapizantes se incluyeron dos reacciones control negativo, en las que se omitió la quimera P-Selectina/IgG humana o el anticuerpo anti-IgG humana-peroxidasa. Todas las reacciones se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Inmunoprecipitación (IP).

En este segundo ensayo se realizó primero una inmunoprecipitación del ligando de P-selectina (la molécula Om44) a partir de la saliva de *O. moubata*, seguido de un análisis mediante western blot del sedimento de la IP, en el que se utilizó el suero hiperinmune anti-rOmEno (apartado 3.5.) para determinar si la Om44 era reconocida como enolasa.

Para la IP se utilizó el siguiente protocolo, adaptado de García-Varas et al. (2010): se sensibilizaron 100 µg de resina "Protein G Sepharose 4B" (Sigma) con 10 µg de la quimera P-selectina/IgG humana, durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación, la resina sensibilizada se sedimentó por centrifugación, se lavó 4 veces con PBS y se incubó con 1 mg de saliva, en un volumen final de 500 µL de PBS con CaCl₂ 100 µM, durante 2 horas, a temperatura ambiente y agitación suave. Tras una nueva centrifugación, se retiró el sobrenadante y el sedimento se lavó 5 veces con PBS + CaCl₂ 100 µM y se resuspendió en 100 µL de PBS. Para descartar la unión directa de alguno de los componentes salivales a la proteína G se realizó un ensayo similar, pero con la resina proteína G-sepharosa 4B sin sensibilizar con la quimera. La captura del ligando se verificó tomando muestras de los sobrenadantes y sedimentos de todo el proceso y analizándolos mediante SDS-PAGE y tinción con plata.

El western blot se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar. Para ello, se hicieron geles SDS-PAGE similares a los anteriores y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se postapizaron con BSA y se incubaron, sucesivamente, con suero hiperinmune de conejo anti-rOmEno diluido 1/100, con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/1.000 y con 4-Cl-1-naftol. Como control negativo se realizó un western blot similar utilizando suero de conejo preinmune.

3.4.4. Silenciamiento del gen de enolasa por RNA interferente y análisis fenotípico.

El silenciamiento génico se indujo mediante la administración a los ejemplares de garrapata de un fragmento de RNA de doble cadena (dsRNA) específico del gen de la enolasa. El grado de silenciamiento se calculó midiendo el nivel relativo de mRNA de enolasa mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y el efecto fenotípico se evaluó tras alimentar a los ejemplares silenciados en conejos.

Síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA).

Para la síntesis de dsRNA se diseñaron los cebadores T7Eno55 y T7Eno33, que amplificaban un fragmento de 244 nucleótidos de cDNA del gen de la enolasa de *O. moubata*. También se diseñaron los cebadores T7Lucif55 y T7Lucif33, que amplificaban un fragmento de 235 nucleótidos de cDNA del gen de la luciferasa bacteriana, cuyo dsRNA fue utilizado como control negativo (Boldbaatar et al., 2010). Todos estos cebadores contenían la secuencia del promotor T7, para facilitar la posterior síntesis de dsRNA (Tabla VIII).

Tabla VIII. Oligonucleótidos empleados en la síntesis de dsRNA de enolasa y en la PCR cuantitativa en tiempo real. La secuencia subrayada corresponde al promotor T7.

Nombre	Secuencia
T7Eno55	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> CAGATTGGCAGCGTACTGA
T7Eno33	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> TCTCCCTGCAAAGACTGCT
T7Lucif55	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> ATGGAAGACGCCAAAAACAT
T7Lucif33	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> TTACAATTTGGACTTTCCGC
Eno55	5'- CAGATTGGCAGCGTACTGA
Eno33	5'- TCTCCCTGCAAAGACTGCT
OmActin55	5'- GCTACGTGGCTCTGGACTTC
OmActin33	5'- GTGTTGGCGTACAGGTCCT

La amplificación del fragmento de enolasa se llevó a cabo a partir del cDNA clonado en pSC-A (pSC-A-OmEno) y la del fragmento de luciferasa a partir de un plásmido comercial (pGEM-Luc Vector, Promega). Las condiciones para la PCR fueron: 5 ciclos de 94 °C 40 s, 57 °C 40 s y 72 °C 1 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C 40 s, 63 °C 40 s y 72 °C 1 min.

Los productos de la PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 1 % usando el QIAquick gel extraction kit (Qiagen), se precipitaron con acetato de sodio y tras su resuspensión se utilizaron como molde para la síntesis de los correspondientes dsRNAs, la cual se efectuó con el kit Megascript RNAi (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los dsRNAs se cuantificaron por espectrometría a 260 nm y su integridad se comprobó en geles de agarosa al 1 %. Se preservaron a -80 °C hasta el momento de ser utilizados.

Inyección del dsRNA a las garrapatas y análisis del grado de silenciamiento.

Para la administración de los dsRNAs, las garrapatas se inmovilizaron adhiriéndolas por su cara dorsal a una placa de vidrio, de forma similar a lo descrito previamente en el apartado de la obtención de saliva. A cada ejemplar se le inyectó 1 µL del correspondiente dsRNA diluido en tampón TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7 (10^{10} - 10^{11} moléculas por µL), en el cuadrante inferior derecho de la cara ventral, utilizando una jeringuilla Hamilton calibre 33.

Cada dsRNA se administró a 30 hembras, 30 machos y 30 ninfas-5 de *O. moubata*. En paralelo, como controles negativos, unos lotes similares fueron tratados sólo con el tampón de inyección (Tabla IX). Después de la inyección, las garrapatas se mantuvieron en la cámara de cultivo a 28 °C, 85 % de humedad relativa y ciclos de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad.

Tabla IX. Protocolo para la inyección de dsRNA a los ejemplares de *O. moubata*.

Grupo de tratamiento	dsRNA	Dosis	Ejemplares
Enolasa	ds-Enolasa	10^{10} - 10^{11} moléculas/ μ L	30 hembras
Luciferasa	dsLuciferasa	10^{10} - 10^{11} moléculas/ μ L	30 machos
Tampón	-	0	30 ninfas-5

Basándonos en observaciones previas que indicaban que el máximo nivel de silenciamiento génico en *O. moubata* tenía lugar ente 5 y 9 días post-inyección (Manzano-Román et al., 2012b), a los cinco días después de la inyección se extrajo el contenido interno de 5 ejemplares de cada grupo y fase evolutiva y se purificó el RNA total.

En estas muestras se cuantificó el nivel de mRNA de enolasa y se normalizó frente al nivel de actina, que fue utilizado como gen de referencia. Con ese fin, se diseñaron cebadores específicos para la enolasa (Eno55 y Eno33) y para la actina de *O. moubata* (OmActin55 y OmActin33) (Tabla VIII) y se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando el kit One Step SYBR PrimeScript RT-PCR (Takara) y el termociclador 7900HT Fast Real-Time System (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue la recomendada por el fabricante del kit, y las condiciones, las siguientes: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 5 s, 58 °C durante 15 s y 72 °C durante 10 s.

El grado de silenciamiento del gen de la enolasa se calculó mediante el método del “cycle threshold” (Ct) (Cikos et al., 2007) comparando los niveles de expresión génica en los ejemplares tratados con dsRNA de enolasa y en los tratados con dsRNA de luciferasa.

Análisis del efecto fenotípico.

El efecto fenotípico del silenciamiento de la enolasa en la alimentación, reproducción y supervivencia de *O. moubata* se evaluó en los 25 ejemplares restantes de cada grupo y fase evolutiva.

Con ese fin, éstos fueron alimentados en conejos a los 6 días de la inyección del dsRNA y en ellos se determinó la cantidad de sangre ingerida, el número de huevos viables depositados por las hembras y las tasas de muda (en las ninfas-5) y de mortalidad (en todos los ejemplares), calculándose la media y la desviación estándar de cada parámetro para cada grupo y fase evolutiva. Las diferencias entre los ejemplares tratados con dsRNA de enolasa y los tratados con dsRNA de luciferasa se compararon utilizando el test de la t de Student; los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

3.5. Evaluación de la capacidad protectora de la rOmEno en ensayos de vacunación de animales.

La capacidad de la rOmEno para inducir respuestas inmunitarias protectoras se evaluó en una prueba de inmunización de conejos similar a las que se practicaron con otras proteínas recombinantes producidas en este estudio, que se describirán con detalle más adelante. Por este motivo, indicamos brevemente en qué consistió esta prueba.

La rOmEno se administró por vía subcutánea a 3 conejos, en tres dosis quincenales de 200 µg/dosis, emulsionada con los adyuvantes de Freund. En paralelo, otros 3 conejos fueron tratados únicamente con los adyuvantes.

Los conejos se sangraron antes de la administración de la primera dosis y una semana después de la última. Los sueros anti-rOmEno obtenidos en estas sangrías son los mismos del apartado 2.4., cuyo título fue superior a 1/12.800.

A los 7 días después de la tercera dosis, todos los conejos, vacunados y controles, recibieron una infestación con 15 hembras, 25 machos, 100 ninfas-4, 100 ninfas-3 y 100 ninfas-2 de *O. moubata*. El efecto de la respuesta inmunitaria inducida por la rOmEno sobre estos ejemplares se determinó midiendo los siguientes parámetros: cantidad de sangre ingerida, número de huevos viables depositados por las hembras, tasas de muda de las fases inmaduras y tasas de mortalidad de todos los ejemplares. Se calculó la media y la desviación estándar de cada parámetro para cada grupo y fase evolutiva y las diferencias entre ejemplares alimentados sobre conejos vacunados y conejos control se compararon utilizando el test de la *t* de Student. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

OBJETIVO 4.

PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE *O. MOUBATA*.

Para alcanzar este objetivo, primero construimos una genoteca cDNA de expresión de glándulas salivales de *O. moubata* en un vector compatible con sistemas acelulares de expresión proteica *in vitro*.

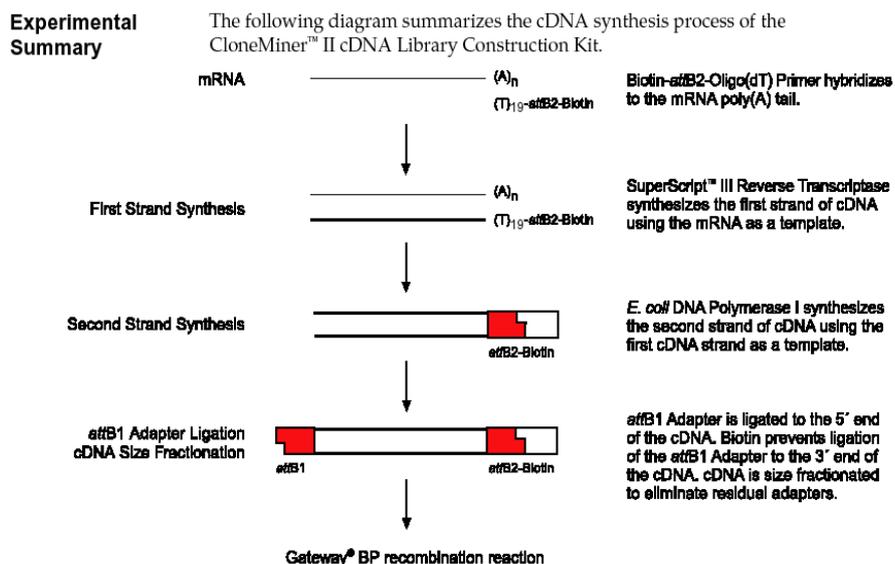
A partir de esta genoteca se construyeron microarrays de proteínas utilizando la tecnología NAPPA (Nucleic Acid Programmable Protein Arrays), la cual permite la síntesis simultánea *in vitro* de las proteínas codificadas por los distintos clones de la genoteca y su fijación a portaobjetos de vidrio convenientemente sensibilizados, permitiendo posteriores análisis en un formato único para múltiples clones al mismo tiempo (High throughput format).

Por último, ensayamos estos microarrays con dos sondas distintas a fin de identificar los clones de interés para el presente trabajo. Estas sondas fueron un suero hiperinmune frente a la proteína Om44 (anti-Om44) y la quimera P-selectina/IgG humana.

4.1. Construcción de la genoteca de expresión.

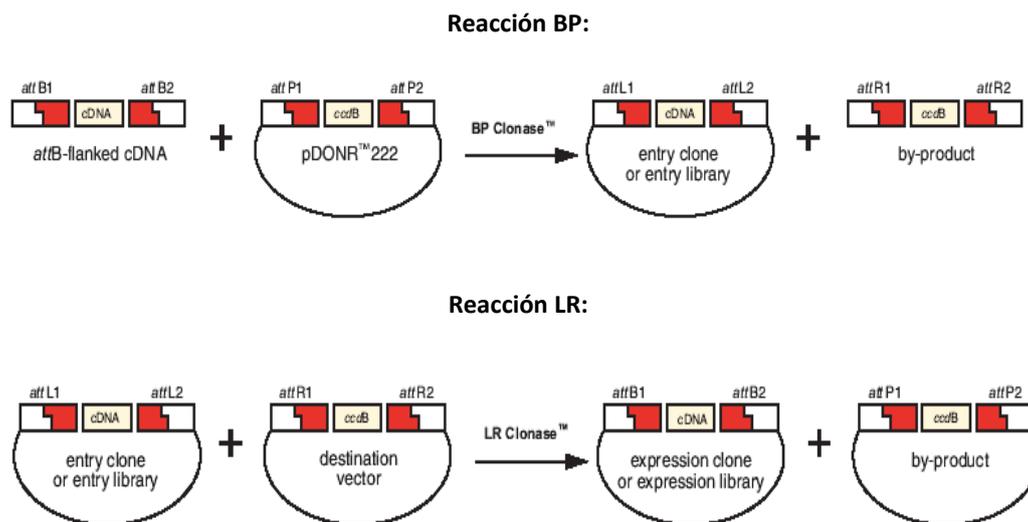
Para la construcción de la genoteca utilizamos la tecnología Gateway, basada en la recombinación entre segmentos homólogos, utilizando el kit CloneMiner II cDNA Library Construction (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este kit utiliza mRNA poliA+ como material de partida. En un primer paso, el mRNA se retro-transcribe a cDNA de doble cadena, al cual se añaden unos fragmentos de secuencia en sus extremos que permiten la recombinación homóloga (secuencias *attB*) (Cuadro 4).



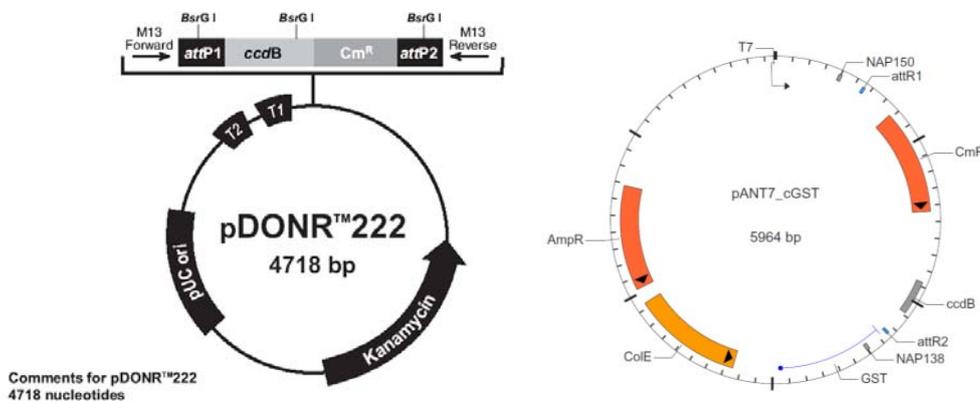
Cuadro 4. Procedimiento para la síntesis de cDNA con secuencias *attB* en sus extremos (Manual de instrucciones del CloneMinerII cDNA Library Construction kit; Invitrogen).

Este cDNA es insertado en un vector de entrada, en nuestro caso el pDONR_222, que contiene secuencias de recombinación *attP*, mediante una reacción de recombinación (reacción BP) catalizada por la enzima BP Clonase II (Invitrogen). La genoteca resultante, o **genoteca de entrada**, que está dotada con secuencias de recombinación *attL*, puede transferirse mediante una segunda reacción de recombinación (reacción LR), catalizada por la enzima LR Clonase II (Invitrogen), a cualquier vector de destino dotado con secuencias de recombinación *attR*, obteniendo así la **genoteca de expresión** (Cuadro 5).



Cuadro 5. Procedimiento para el clonaje de cDNA en el vector de entrada y posterior transferencia mediante recombinación a un vector de destino (Manual de instrucciones del CloneMinerII cDNA Library Construction kit; Invitrogen).

En nuestro caso, el vector de destino fue el vector de expresión pANT7_cGST (DNASU plasmid repository, <http://dnasu.org/DNASU/>) (Ramachandran et al., 2004), que permite la expresión de proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST).



Cuadro 6. Mapas de los vectores de entrada (pDONR_222) y de expresión (pANT7_cGST) utilizados en la construcción de la genoteca de *O. moubata*.

4.1.1. Construcción de la genoteca de entrada, titulación y análisis de calidad.

Para la síntesis de la genoteca de entrada se utilizaron 2 µg de mRNA poliA+ y se siguieron los protocolos del fabricante del kit (http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cloneminer_ii_man.pdf).

El título de la genoteca se determinó preparando diluciones seriadas de la misma (1/100, 1/1.000 y 1/10.000) en medio SOC, que fueron posteriormente sembradas en placas de agar-LB con 50 µg/mL de kanamicina (100 µL/placa, 2 placas por dilución) e incubadas toda la noche a 37 °C. El título resultante fue de 5×10^6 unidades formadoras de colonia (CFUs)

A continuación, se evaluó la calidad de la genoteca analizando la presencia y el tamaño del inserto en 24 clones seleccionados al azar. Para ello, se purificó su DNA plasmídico y se sometió a digestión con la enzima *Bsr*GI (New England Biolabs). Como se indica en el capítulo de resultados, 22 de los 24 clones contenían inserto (92 % de recombinantes) y el tamaño de estos insertos osciló entre 250 y 1.500 pb.

Los resultados anteriores indicaban que tanto el título como la calidad de esta genoteca estaban dentro del rango óptimo indicado por el fabricante, de modo que procedimos a la síntesis de la genoteca de expresión.

Para la identificación de los insertos, los 22 clones recombinantes fueron secuenciados utilizando los cebadores M13 forward (5'-GTTTCCCAGTCACGAC) y M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC).

4.1.2. Construcción de la genoteca de expresión, titulación y análisis de calidad.

En primer lugar amplificamos y purificamos el DNA plasmídico de la genoteca de entrada utilizando el kit PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep (Invitrogen).

Una vez purificado, este DNA se utilizó en la reacción LR de recombinación, la cual se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones del CloneMinerII cDNA Library Construction kit, pero modificando las proporciones entre el vector donante y el de destino para incrementar la eficiencia de la reacción. En concreto, se mezclaron 150 ng de DNA de la genoteca de entrada y 150 ng de vector pANT7_cGST (proporción 1:1) con 2 µL clonasa LR y se incubó 18 horas a 25 °C.

El título y la calidad de la genoteca de expresión se evaluaron de igual modo que los de la genoteca de entrada obteniendo un título de 2×10^7 CFUs y un 83 % de recombinantes (20 clones de los 24 analizados), todos ellos con insertos de tamaño superior a 250 pares de bases (ver resultados, Figura 26).

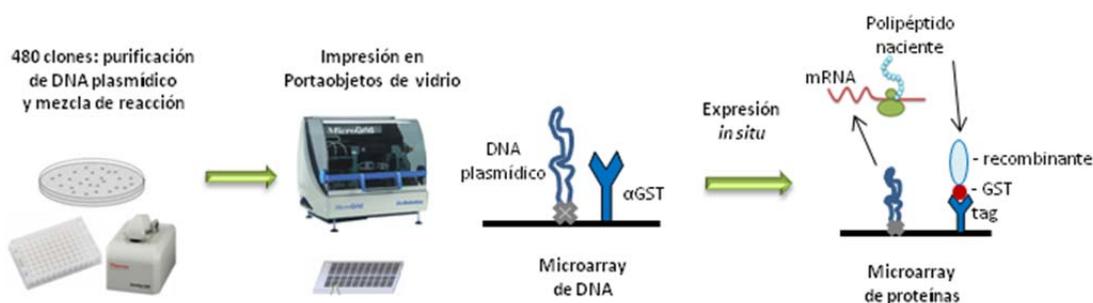
Estos 20 clones recombinantes también fueron secuenciados para la identificación de sus insertos. Para esto se utilizaron los cebadores 55NAP (5'-CCCATTGTATGGGATCTGATC) y 33NAP (5'-CCGCAAGCTTGTCATCAACCACTT), que flanquean las secuencias de recombinación *attR* del vector pANT7_cGST.

Dado que esta genoteca cumplía con los parámetros de calidad indicados por el fabricante del kit, la utilizamos para construir los correspondientes microarrays de proteínas.

4.2. Construcción de microarrays de proteínas mediante la tecnología Nucleic Acid-Programmable Protein Array (NAPPA) y evaluación de su calidad y reproducibilidad.

Para la construcción de los microarrays NAPPA se siguieron los protocolos de Ramachandran et al. (2008). Esta parte del trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca bajo la supervisión del Dr. Manuel Fuentes.

Este procedimiento se inició con la purificación del DNA plasmídico de los clones recombinantes, el cual se mezcló con un anticuerpo policlonal anti-GST y las mezclas se imprimieron sobre portaobjetos de vidrio funcionalizados con aminosilano, quedando así el DNA y el anticuerpo fijados a la superficie del portaobjetos (microarray de DNA). Los portaobjetos se incubaron con un lisado de reticulocitos de conejo para la expresión *in situ* de las proteínas codificadas por los clones, de modo que las proteínas recombinantes, fusionadas con GST, fueron capturadas y fijadas al porta por el anticuerpo anti-GST, quedando listas para su análisis posterior (microarray de proteínas) (Cuadro 7).



Cuadro 7. Procedimiento esquemático para la construcción de microarrays NAPPA.

4.2.1. Purificación y cuantificación de los clones seleccionados.

Se seleccionaron al azar 480 colonias de la genoteca de expresión. Éstas se crecieron en 4 rondas de 1,5 mL/ronda de cultivo en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, a 37 °C durante toda la noche, en placas de pocillo profundo (5 placas de 96 pocillos).

Las células se sedimentaron en las placas mediante centrifugación durante 20 minutos a 2.500 g y el DNA plásmidico se purificó utilizando el kit 96-well Plasmid Miniprep (Whatman) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El DNA de cada clon se cuantificó en las placas mediante tinción con el colorante fluorescente Hoeschst y lectura de la absorbancia en el lector de placas Tecan SpectraFluor Plus (Xfluor 4) con los siguientes parámetros: longitud de onda de excitación 360 nm y de emisión 465 nm.

4.2.2. Preparación de las muestras de DNA.

El DNA purificado se precipitó con isopropanol y se resuspendió en una mezcla de reacción que favorece la fijación del DNA al porta y la captura posterior de las proteínas nacientes.

Precipitación del DNA con isopropanol:

1. Adición de 0,8 volúmenes de isopropanol a cada muestra de DNA y centrifugación durante 30 minutos a 4.000 g.
2. Lavado con etanol al 80 % centrifugación como en el paso anterior.
3. Secado al aire para eliminar restos de etanol.

Preparación de la mezcla de reacción: 3,6 mg/mL de BSA + 50 µg/mL de anticuerpo policlonal de conejo anti-GST (GE Healthcare lifescience) + 2 mM Bis-(Sulfosuccinimidyl) suberate (BS3) (Pierce).

El DNA de cada clon se resuspendió en 25 µL de esta mezcla de reacción y se transfirió a placas de 384 pocillos.

4.2.3. Funcionalización de los portaobjetos de vidrio.

Los portaobjetos se funcionalizaron con aminosilano, según el protocolo descrito por Ramachandran et al. (2008). En primer lugar, los portas se trataron con una solución de aminosilano al 2 % en acetona durante cinco minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con acetona y agua destilada y por último se secaron utilizando aire comprimido.

4.2.4. Impresión de los microarrays.

Para la impresión de los microarrays se utilizó el robot MicroGrid II (Isogen), configurado para usar 48 puntas que generan puntos de 150 µm de diámetro.

Las placas de 384 pocillos que contenían las muestras de DNA y los correspondientes controles negativos (esto es, agua, BSA, BSA+BS3, BS3, anticuerpo anti-GST, anti-GST+BS3 y mezcla de reacción sin DNA) se cargaron en el robot junto con los portas funcionalizados. De cada mezcla de reacción se depositaron 10 nL por punto, que contenían, aproximadamente, 6 ng de DNA plasmídico. Cada clon se imprimió por cuadruplicado, y en cada portaobjetos se imprimieron tres réplicas del microarray.

Estos microarrays de DNA se imprimieron en lotes de 25 portaobjetos por lote y se preservaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

4.2.5. Análisis de la calidad de la impresión.

Antes de proceder a la expresión de las proteínas, se llevaron a cabo controles de calidad y reproducibilidad de la impresión del DNA mediante su tinción específica utilizando tres portaobjetos de cada lote.

Estos portaobjetos se postapizaron con Superblock PBS (Pierce), durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, y a continuación se incubaron con 150 µL/porta del colorante fluorescente PicoGreen (Invitrogen) diluido 1/600 en Superblock PBS. Después de

lavar con PBS y agua destilada se secaron con aire comprimido. Finalmente, los portaobjetos se escanearon utilizando un escáner ProScanArray HT (Perkin-Elmer) y las imágenes obtenidas se analizaron con el programa GenePix Software versión 6.0 (GenePix).

Los datos de intensidad de la señal de los puntos se normalizaron para corregir sesgos y permitir la comparación entre portaobjetos siguiendo las indicaciones de Borrebaeck y Wingren (2009). Como referencia para la normalización se usaron los valores de intensidad de la señal de los controles negativos de cada microarray.

4.2.6. Expresión *in situ* de las proteínas recombinantes.

La expresión de las proteínas se llevó a cabo en un sistema libre de células utilizando el kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) que permite la transcripción y traducción de forma simultánea e *in situ* del DNA depositado en los microarrays. El protocolo fue el siguiente:

1. Lavado de los portaobjetos con PBS a temperatura ambiente, 15 minutos en agitación.
2. Postapizado con Superblock PBS, 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavado con agua destilada, secado de los portaobjetos con aire comprimido y colocación sobre cada portaobjetos de una cámara HybriWell (Grace Biolabs).
4. Preparación de la mezcla de reacción para la transcripción/traducción *in vitro* (**reacción IVTT**). Esta mezcla se preparó para cada 3 portaobjetos a la vez, con el fin de evitar la congelación/descongelación de los distintos componentes:
 - 16 μ L TNT buffer
 - 8 μ L T7 polimerasa
 - 4 μ L Mezcla aminoácidos sin metionina
 - 4 μ L Mezcla aminoácidos sin leucina o sin cisteína
 - 8 μ L RNaseOUT (Invitrogen)
 - 160 μ L agua sin RNAsas (tratada con dietilpirocarbonato, DEPC)
 - 200 μ L lisado de reticulocitos de conejo
5. Adición de 130 μ L de la mezcla anterior a cada porta e incubación durante 90 minutos a 30 °C, seguidos de 30 minutos a 15 °C.
6. Retirado de la cámara HybriWell y lavados con tampón de bloqueo (PBS con 5 % de leche desnatada en polvo y 0,2 % de Tween20): 3 lavados de 5 minutos por lavado, en agitación.

4.2.7. Control de la expresión de proteínas.

Como parte de los controles de calidad del proceso, en tres portaobjetos de cada lote se verificó la correcta expresión de las proteínas mediante la detección de la marca de GST con un anticuerpo anti-GST. El protocolo fue el siguiente:

1. Postapizado con tampón de bloqueo (PBS con 5 % de leche desnatada en polvo y 0,2 % de Tween20) durante 1 hora, en agitación.

2. Incubación con un anticuerpo monoclonal anti-GST (Cell Signaling Technologies), 10 µg/mL en Superblock PBS, durante 1 hora.
3. Lavados con tampón de bloqueo: tres veces, 5 minutos por lavado, en agitación.
4. Incubación con anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Amersham), 10 µg/mL en Superblock PBS, durante 1 hora.
5. Lavados: tres veces con PBS, 5 minutos cada lavado, en agitación y un lavado breve con agua destilada.
6. Revelado: incubación con 200 µL de "Tyramide Signal Amplification" (TSA) (Perkin-Elmer) diluido 1/50, durante 10 minutos.
7. Lavados: tres veces con PBS y una vez con agua destilada.
8. Secado de los portaobjetos con aire comprimido.
9. Escaneado de los portaobjetos y análisis de las imágenes.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, cubriendo los portaobjetos con un cubreobjetos LifterSlips (Erie) para evitar la evaporación de los reactivos.

En paralelo, se procesaron dos microarrays como controles negativos: en uno de ellos se omitió la incubación con el monoclonal anti-GST (sustituyéndolo por Superblock PBS) y en el otro se hizo la incubación completa, pero sobre un portaobjetos en el que se había omitido la polimerasa T7 en la mezcla de reacción para la IVTT.

Los datos de intensidad de señal de cada microarray se normalizaron como en el apartado anterior y los datos normalizados de los controles que llevan la mezcla de reacción sin DNA se usaron para el cálculo del umbral de positividad, que se definió como la intensidad media de dichos controles negativos más tres veces la desviación estándar.

4.3. Análisis de los microarrays con sondas específicas.

Una vez preparados los microarrays y verificada su reproducibilidad, fueron analizados con el suero hiperinmune anti-Om44 y con la quimera recombinante P-selectina/IgG humana, para tratar de identificar a Om44 y a otros posibles ligandos de P-selectina.

4.3.1. Análisis con el suero anti-Om44.

Como ya se ha indicado, este es un suero policlonal obtenido por nuestro equipo en trabajos previos mediante la inmunización de conejos con el antígeno Om44 purificado por electroelución de geles de poli(acrilamida) (García-Varas et al., 2010). Tras su optimización, el protocolo para el análisis fue el siguiente:

1. Postapizado con tampón de bloqueo (PBS con 5 % de leche desnatada en polvo y 0,2 % de Tween20) durante 1 hora en agitación.
2. Incubación con anti-Om44, diluido 1/500 en tampón de bloqueo, durante toda la noche, a 4 °C, en agitación.
3. Lavados: tres veces con tampón de bloqueo, 5 minutos por lavado, en agitación.

4. Incubación con anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma), diluido 1/1.000 en Superblock PBS, durante 1 hora.
5. Lavados: tres con PBS, 5 minutos por lavado, en agitación, y un lavado breve con agua destilada.
6. Revelado: Incubación con 200 μ L de TSA diluido 1/50, durante 10 minutos.
7. Lavados: tres veces con PBS y una vez con agua destilada.
8. Secado con aire comprimido.
9. Escaneado y análisis de las imágenes.

Excepto la incubación con el suero, que se realizó a 4 °C, las demás incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

En paralelo, como control negativo para el procesado de los datos, uno de los microarrays se incubó con suero de conejo pre-inmune en lugar del suero anti-Om44.

4.3.2. Análisis para la identificación de ligandos de P-selectina.

En este ensayo los microarrays se rastrearon con la quimera P-selectina/IgG humana a fin de identificar posibles ligandos de P-selectina.

Para ello se produjeron dos tipos de microarrays. En un caso, las reacciones IVTT se llevaron a cabo en las condiciones estándar descritas previamente. En el otro, a las mezclas de reacción de IVTT se añadieron 6 μ L de membranas microsomales pancreáticas caninas (CMMs, Promega) para permitir la modificación postransduccional de las proteínas (entre otras, la eliminación del péptido señal y la glicosilación de las mismas) (Svitkin et al., 2005; Zahedi et al., 2009).

Tras la expresión proteica, los portaobjetos se postapizaron con tampón de bloqueo y se incubaron con 5 μ g/mL de quimera P-selectina/IgG humana en Superblock PBS suplementado con 100 μ M de CaCl₂, en caso de los microarrays producidos sin CMMs, o con 2 mM de CaCl₂, en el caso de los microarrays producidos con CMMs. A continuación se lavaron tres veces con tampón de bloqueo y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa diluido 1/6.000 en Superblock PBS. El postapizado y las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar y revelar, los microarrays se escanearon y las imágenes se analizaron según lo descrito anteriormente.

Como control negativo para el procesado de los datos se incluyeron microarrays de ambos tipos en los que el paso de incubación con la quimera P-selectina/IgG humana se sustituyó por una incubación con Superblock PBS.

4.3.3. Secuenciación, identificación de los clones positivos y análisis bioinformático de las proteínas identificadas.

Los clones detectados en estos ensayos se secuenciaron en ambas cadenas utilizando los cebadores 55NAP y 33NAP y las secuencias se sometieron a un análisis BLASTn frente a la base de datos del NCBI para su identificación.

Como se detallará en el capítulo de resultados, el suero anti-Om44 reconoció un total de ocho proteínas, de las cuales pudieron identificarse cinco: fosfolipasa A₂ (PLA2), un miembro de la familia 7DB (7DB), la riboproteína 60S L10 (RP-60S), la proteína de choque térmico 90 (HSP90) y la actina.

Por su parte, la quimera P-selectina/IgG humana reconoció tres clones en el ensayo en condiciones estándar, de los que se pudo identificar uno, que resultó ser PLA2, y 6 clones más en el ensayo con microsomas caninos, de las cuales se identificaron 3: Factor de Elongación EF-1 α /Tu, proteína ribosomal 40S S7 y una proteína hipotética de *I. scapularis*.

Como en el caso de la TSGP1 y la enolasa, las secuencias peptídicas de estas proteínas se sometieron a un análisis *in silico* con el fin de comprobar la presencia de motivos conservados, señales de secreción, hélices transmembrana o sitios de anclaje tipo GPI.

4.4. Confirmación de resultados del análisis de los microarrays.

Los resultados obtenidos en el análisis de los microarrays se confirmaron posteriormente en experimentos adicionales. Estos experimentos se llevaron a cabo en distintos momentos a lo largo del desarrollo del objetivo 5, a medida que producíamos algunos de los reactivos necesarios para ello. No obstante, con el fin de exponerlos ordenada y sistemáticamente, hemos considerado conveniente describirlos juntos en el presente apartado.

4.4.1. Confirmación del reconocimiento por el suero anti-Om44.

Las cuatro proteínas reconocidas por el suero anti-Om44 que finalmente pudieron ser producidas en forma recombinante *in vivo* (en bacterias), esto es, PLA2, 7DB, RP-60S y actina, (ver objetivo 5), se enfrentaron por western blot con el propio suero anti-Om44.

Para ello 1 μ g de cada una de estas proteínas recombinantes se separó en gel de acrilamida al 12 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con el suero anti-Om44 diluido 1/100 y con el correspondiente anti-IgG de conejo-peroxidasa diluido 1/2.000. La reacción se reveló con diamino-bencidina (DAB) (Pierce).

4.4.2. Confirmación del reconocimiento de la PLA2 por la quimera P-selectina/IgG.

Para ello, PLA2 recombinante producida tanto *in vivo* (en bacterias) como *in vitro* (en tubo en sistema libre de células) se enfrentaron por ELISA y western blot con la quimera P-selectina/IgG.

La producción de la PLA2 en bacterias se describe más adelante, en relación con la obtención de antígenos para las pruebas de inmunización de animales (apartado 5).

La producción de la PLA2 *in vitro* se llevó a cabo con el kit 1-Step Human Coupled IVT-Kit DNA (Thermo Scientific), que es un sistema de transcripción/traducción *in vitro* basado en un lisado de células HeLa. Este proceso lo describimos a continuación.

Producción de PLA2 in vitro.

Clonaje del cDNA de PLA2 en el vector pT7CFE1-CHis.

En primer lugar, clonamos la secuencia de cDNA de la PLA2 en el vector recomendado por el fabricante del kit, el pT7CFE1-CHis, que permite la expresión de la proteína con una cola carboxi-terminal de 6 residuos de histidina (His-tag), lo que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel o con un anticuerpo anti-His-tag.

Para este clonaje diseñamos un par de cebadores que incluían sitios de corte para las enzimas de restricción *PacI* y *NotI*, así como nucleótidos adicionales en 5' para maximizar la eficiencia de la digestión con dichas enzimas (55PLA2*PacI*: 5'-AATTAATTAAGATGACTAAAGAAAACCAGACC; 33PLA2*NotI*: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTTTGTCTGCTTTATTGAGGAA).

La secuencia de cDNA codificante de la PLA2 fue amplificada por PCR, a partir del correspondiente clon de la genoteca, en las siguientes condiciones: 5 ciclos de 94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, seguidos por 30 ciclos de 94 °C 15 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s y una extensión final de 7 min a 72 °C.

El producto de esta PCR se purificó a partir de gel de agarosa y se sometió a digestión simultáneamente con *PacI* y *NotI* (Fermentas), durante 2 horas a 37 °C.

El vector pT7CFE1-CHis se digirió de forma similar y, en ambos casos (inserto y vector), los productos de la digestión se purificaron a partir de geles de agarosa y se cuantificaron mediante absorbancia a 260 nm.

La ligación se llevó a cabo en condiciones estándar, con la enzima T4 DNA ligasa, durante 16 horas a 4 °C, utilizando una proporción 5:1 (inserto:vector) y partiendo de 100 ng de vector.

Transformación de células competentes E. coli XL1B con pT7CFE1-CHis-PLA2.

El producto de la ligación anterior se utilizó para transformar células *E. coli* XL1B, con el fin de amplificar el clon y disponer de cantidad suficiente de DNA plasmídico para la expresión de la proteína.

El protocolo de transformación fue el siguiente:

1. Se descongeló en hielo una alícuota de 100 µL de células *E. coli* XL1B, se le añadió 10 µL de la reacción de ligación y se incubó en hielo durante 20 minutos.
2. Choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y nueva incubación en hielo durante 2 minutos.
3. Adición de 250 µL de medio LB precalentado a 37 °C e incubación a 37 °C, con agitación, durante 1 hora.
4. Siembra en placas de agar-LB con 100 µg/mL de ampicilina e incubación a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente se seleccionaron varias colonias y se incubaron en 5 mL de medio LB con ampicilina. El DNA plasmídico de cada clon se purificó y se secuenció a fin de verificar si la

secuencia, la orientación y el marco de lectura eran correctos. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores T7 Terminator Primer (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG) y pT7CFE.Sec (5'-GGGACGTGGTTTCCTTTG). El clon con la secuencia y orientación correctas, denominado pT7CFE1-CHis-PLA2, se usó para la expresión *in vitro*.

Expresión in vitro de PLA2

La expresión *in vitro* se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit 1-Step Human Coupled IVT-Kit DNA. Partimos de 1 µg de DNA plasmídico (pT7CFE1-CHis-PLA2) purificado por precipitación con acetato de sodio y resuspendido en agua libre de nucleasas, tal como recomienda el fabricante del kit. La reacción (25 µL) se incubó durante 5 horas a 30 °C.

Se incluyeron una reacción control negativo (vector sin inserto) y una reacción control positivo (la proteína fluorescente verde, GFP) cuya secuencia codificante se suministra en el kit (pCFE-GFP DNA).

La expresión de la PLA2 se confirmó analizando una alícuota (2 µL) de las reacciones IVTT por western blot. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-His-tag marcado con peroxidasa (Sigma), diluido 1/10.000, y también un suero anti-PLA2 obtenido en conejo (ver más adelante), diluido 1/100, junto con el correspondiente anti-IgG de conejo-peroxidasa diluido 1/2.000.

Ensayos de unión de PLA2 a P-selectina

La unión de PLA2 a P-selectina se verificó mediante ELISA y western blot.

ELISA

El ELISA se llevó a cabo en placas comerciales tapizadas con un anticuerpo monoclonal anti-His-Tag (His-Tag Antibody Plate; Novagen), que permite la captura específica de las proteínas recombinantes marcadas con cola de histidina sin necesidad de hacer una purificación previa. La captura de la PLA2 recombinante se verificó utilizando el suero anti-PLA2 obtenido en conejo y la unión a P-selectina utilizando la quimera P-selectina/IgG humana.

El protocolo, adaptado a partir del propuesto por el fabricante de las placas, fue el siguiente.

1. Captura de las proteínas recombinantes diluidas en 100 µL/pocillo de Tris-salino (TBS) pH 7,5 con BSA al 3 %, durante 2 horas. Se incluyeron las siguientes muestras: PLA2 expresada *in vivo* (10 ng de proteína purificada), PLA2 expresada *in vitro* (1 µL de la reacción IVTT) y como controles negativos 1 µL de la mezcla de reacción IVTT y el propio tampón diluyente.
2. Tres lavados de 5 minutos/lavado con TBST (TBS con Tween20 al 0,1 %).
3. Incubación durante 2 horas con 200 ng/pocillo de quimera P-selectina/IgG humana diluida en 100 µL de tampón MOPS pH 7,5 (MOPS 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 2 mM) con BSA al 1 % y Tween20 al 0,05 % siguiendo el protocolo de Leppänen y Cummings (2010), o bien con 100 µL de suero anti-PLA2 diluido 1/100 en TBST.

4. Lavados similares a los anteriores.
5. Incubación durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario: 100 μ L de anti-IgG humana-peroxidasa diluida 1/2.000 en tampón MOPS con BSA y Tween20 ó 100 μ L de anti-IgG de conejo-peroxidasa diluida 1/10.000 en TBST.
6. Lavados similares a los anteriores.
7. Revelado con OPD.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C).

Como controles negativos se incluyeron pocillos en los que se sustituyó la quimera P-selectina/IgG humana por el tampón diluyente y pocillos en los que se sustituyó el suero hiperinmune anti-PLA2 por suero de conejo pre-inmune.

Western blot

Ambas PLA2 recombinantes, la obtenida *in vivo* (1 μ g de proteína purificada) y la obtenida *in vitro* (1 μ L de reacción), se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas se postapizaron con BSA al 2 % en PBS y se lavaron con TPBS. Acto seguido, se incubaron con 2 μ g/mL de quimera diluida en tampón MOPS con BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 % y posteriormente con anti-IgG humana-peroxidasa diluida 1/2.000 en tampón MOPS con BSA y Tween20. En paralelo se llevó a cabo un ensayo control en el que la incubación con la quimera se sustituyó por el tampón diluyente.

Las incubaciones se hicieron a 37 °C durante 1 hora y los lavados entre incubaciones con tampón MOPS con Tween20 al 0,05 %. Finalmente se lavaron 3 veces con el mismo tampón y se revelaron con 4-cl-1-naftol.

OBJETIVO 5.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PROTECTORA EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.

Las proteínas seleccionadas para los ensayos de vacunación de animales fueron todas las reconocidas e identificadas en los microarrays por el suero anti-Om44 (PLA2, 7DB, RP-60S, HSP90 y actina) y por la P-selectina en presencia de CaCl₂ 100 μM y ausencia de CMMs (la PLA2).

A éstas cinco proteínas añadimos otras dos: la apirasa y un ortólogo de la savignygrina de *O. savignyi*, al que denominamos mougrina. Estas dos proteínas resultaron identificadas en la secuenciación de los clones seleccionados al azar en los análisis de calidad de la genoteca de entrada (ver resultados) y decidimos incluirlas en los ensayos de vacunación por ser proteínas inhibitoras de la activación y agregación plaquetaria en otros argásidos (Chmelar et al., 2012) y, por tanto, potencialmente interesantes como dianas para vacunas.

5.1. Clonaje, expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

De todas las proteínas seleccionadas, excepto de la HSP90, conocíamos sus secuencias codificantes completas, obtenidas por secuenciación a partir de los clones correspondientes en el vector pANT7_cGST o pDONR_222. A la HSP90, sin embargo, le faltaba el fragmento 5', por lo que primero fue necesario obtenerlo mediante 5'-RACE.

5.1.1. Obtención de la secuencia codificante completa de la HSP90.

En primer lugar se obtuvo la secuencia del fragmento 5' utilizando el First Choice RLM-RACE kit (Life Technologies), el cual permite la selección y transcripción reversa sólo de los mRNA maduros completos. Para ello se siguió el protocolo indicado por el fabricante utilizando dos cebadores específicos diseñados *ad hoc*, el GSP2-HSP90 (5'-AATAGATGTGCTTCTGGTTTCCTTC) y el GSP3-HSP90 (5'-ATATTTTGCTGAACTGCTCATAGAA).

Una vez secuenciado ese fragmento, la secuencia codificante completa de la HSP90 se amplificó por RT-PCR a partir de RNA de glándulas salivales y se clonó y secuenció en el vector pSC-A siguiendo protocolos similares a los utilizados con la TSGP1 (apartado 1.1.3). Los cebadores utilizados fueron el par Hsp90Kpn55/Hsp90Kpn33 (Tabla X) y las condiciones para la PCR las indicadas en la tabla XI. La construcción resultante, pSC-A-HSP90, fue utilizada como molde para el clonaje posterior en un vector de expresión.

5.1.2. Amplificación de las secuencias de cDNA codificante.

Las secuencias codificantes de estas 7 proteínas (completas o bien truncadas para eliminar el péptido señal) se amplificaron por PCR y se subclonaron en un vector de expresión (pQE-30 o pGEX-4T-1).

Con ese fin, para cada proteína se diseñó una pareja de cebadores específicos que incluían el sitio de corte para la enzima de restricción *KpnI*, *BamHI* (actina) o *EcoRI* (mougrina),

así como nucleótidos adicionales en el extremo 5' para facilitar la acción de las enzimas (Tabla X).

Para facilitar la expresión y purificación de las proteínas 7DB y la apirasa, los cebadores correspondientes amplificaron una versión truncada de las secuencias codificantes.

Como molde para todas estas amplificaciones se utilizaron los cDNAs plasmídicos de los correspondientes clones de la genoteca de entrada o de expresión, salvo para la HSP90, que se amplificó a partir del clon pSCA-HSP90 (Tabla X).

Tabla X. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las proteínas seleccionadas. (t), proteínas de las que se amplificó una versión truncada, sin péptido señal. Los nucleótidos subrayados son el sitio de corte de la enzima de restricción.

Proteína	cDNA molde	Cebador	Secuencia	Enzima	Vector
PLA2	Clones en pANT7_cGST	PLA2_KpnI55	5'-TTCGGTACCATGACTAAAGAAAACCAGACC	KpnI	pQE-30
		PLA2_KpnI33	5'-TTCGGTACCAGTCATTTTGTCTCTTTATTG		
7DB (t)		tr7DB_KpnI55	5'-TTCGGTACCACTTTTCATCATAGAAGATCTTCC		
		7DB_KpnI33	5'-TTCGGTACCTCACGGCGACGCATTGTCCAC		
RP-60S L10		Rib_KpnI55	5'-TTCGGTACCATGGGTCGCCGTCGGCAAG		
		Rib_KpnI3	5'-TTCGGTACCTCAGAGGTCGGTGGCCGCTGT		
Actina	pSC-A-HSP90	BamH1OmAct5	5'-CGCGGATCCATGTGTGACGACGATGTCGC	BamHI	
		BamH1OmAct3	5'-CGCGGATCCTTAGAAGCACTTCTGTGGAC		
HSP90	pSC-A-HSP90	Hsp90Kpn55	5'-TTCGGTACCATGCCAGAAGAAGCTCAAATG	KpnI	
		Hsp90Kpn33	5'-TTCGGTACCTTAGTCTACTTCTCCATGC		
Apirasa (t)	Clones en pDONR_222	trApi55Kpn	5'-TTCGGTACC AAGCCTGCAACGACTCCG	KpnI	
		Api33Kpn	5'-TTCGGTACCTTAGACCCAGATCTCTTGCTT		
Mougrina	Clones en pDONR_222	MougrinEcoRI55	5'-CCGGAATTCATGCAGGCGAAAATCTTGTT	EcoRI	pGEX
		MougrinEcoRI33	5'-CCGGAATTC TTACCATTTTCTCCGCATAG		

La mezcla de reacción en todas estas PCRs fue similar a la utilizada con la lipocalina TSGP1 (apartado 1.1.3.) y las condiciones específicas para cada pareja de cebadores fueron las indicadas en la tabla XI.

Tabla XI. Condiciones para la amplificación por PCR de las distintas proteínas.

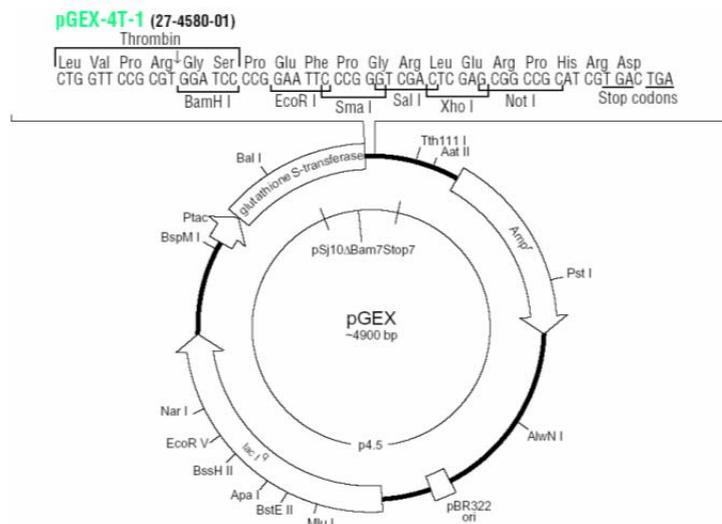
Proteína	Condiciones PCR		
PLA2	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C
7DB	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 66 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C
RP-60S L10	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 66 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 35 ciclos (94 °C 15 s, 72 °C 30 s, 72 °C 90 s)	7 min 72 °C
Actina	2 min 94 °C	35 ciclos (94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C
HSP90	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C
Apirasa	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C
Mougrina	2 min 94 °C	5 ciclos (94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s) + 30 ciclos (94 °C 15 s, 62 °C 30 s, 72 °C 40 s)	7 min 72 °C

En cada amplificación se incluyó un control negativo en el que el cDNA fue sustituido por agua ultra-pura (Milli-Q). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa y se purificaron tal como se ha descrito previamente.

5.1.3. Clonaje en vectores de expresión.

Todas las proteínas se clonaron en el vector pQE-30, salvo la mougrina, que se clonó en el vector pGEX-4T-1 (Amersham) (Tabla X).

Se eligió este vector por la conveniencia de obtener la mougrina recombinante como proteína de fusión con GST para potenciar su inmunogenicidad, la cual supusimos que sería demasiado baja debido a su pequeño tamaño (63 aminoácidos y 42 el péptido maduro). De este modo la GST podría actuar como “carrier” de la mougrina.



Cuadro 8. Mapa del vector de expresión pGEX-4T-1 (Amersham).

En todos estos clonajes se siguió el mismo protocolo general, que se describe brevemente a continuación.

A fin de generar extremos cohesivos, los productos de las PCRs se digirieron con las enzimas indicadas en la tabla X. Todas las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C durante 2 horas y los productos se separaron en geles de agarosa y se purificaron como en ocasiones anteriores.

Los vectores plasmídicos se digirieron con la enzima correspondiente, se desfosforilaron y se purificaron de forma similar a como hemos descrito antes (apartado 1.3.1.). En concreto, se prepararon muestras de pQE-30 digerido con *KpnI*, de pQE-30 digerido con *BamHI* y de pGEX-4T-1 digerido con *EcoRI*.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando los protocolos estándar indicados por el fabricante para el clonaje en pGEX-4T-1 (Amersham) o en pQE-30 (Qiagen). Se utilizó una proporción 5:1 (inserto:vector), con 100 ng de vector, y la enzima T4 DNA ligasa

(Roche). La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a 4 °C. En todos los casos se incluyó una ligación sin inserto que se usó como control negativo.

5.1.4. Transformación de células competentes.

Las construcciones pQE-30-inserto se utilizaron para transformar células *E. coli* M15, y los clones transformantes se verificaron de forma similar a lo explicado para las proteínas recombinantes TSGP1 y enolasa.

La construcción pGEX-4T-1-mougrina se utilizó para transformar células *E. coli* BL21 Codon Plus. El protocolo seguido en esta transformación fue el siguiente:

1. Descongelación en hielo de una alícuota de 50 µL de células *E.coli* BL21 y adición de 10 µL de la reacción de ligación.
2. Incubación de la mezcla en hielo durante 20 minutos.
3. Choque térmico durante 90 segundos a 42 °C e incubación 2 minutos en hielo.
4. Adición de 250 µL de medio LB precalentado a 37 °C e incubación durante 1 hora, en agitación, a 37 °C.
5. Siembra de 25 µL de la transformación en placas de LB-agar con 50 µg/mL de cloranfenicol y 100 µg/mL de ampicilina e incubación toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente, se seleccionaron varias colonias al azar y se incubaron en 5 mL de medio 2xYT (16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl) con 50 µg/mL de cloranfenicol y 100 µg/mL de ampicilina. De cada cultivo se tomó una alícuota para su almacenamiento en glicerol al 15 %, a -80 °C, y el resto del cultivo se utilizó para purificar el DNA plasmídico y secuenciar el inserto a fin de verificar la secuencia, la orientación y el marco de lectura. Los clones correctos se almacenaron a -80 °C.

5.1.5. Expresión y purificación de las proteínas clonadas en pQE-30: PLA2, 7DB, RP-60S, actina, apirasa y HSP90.

La expresión y purificación de estas proteínas se realizó de forma similar a lo descrito para la proteína TSGP1 (apartado 1.3.3.).

Tras la inducción de la expresión con IPTG, las proteínas se expresaron en forma insoluble, por lo que fue necesario solubilizarlas previamente con urea 8 M y realizar su purificación mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes, siguiendo idéntico protocolo al detallado para la TSGP1 (apartado 1.3.4.).

Las proteínas purificadas se dializaron frente a PBS durante 24 horas a 4 °C para retirar el imidazol y su concentración se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

5.1.6. Expresión y purificación de la proteína clonada en pGEX-4T-1: mougrina-GST.

Una alícuota del clon pGEX-mougrina (en células BL21) se inoculó en medio 2xYT suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de cloranfenicol y se incubó a 37 °C y 180 rpm durante toda la noche. A la mañana siguiente el preinóculo se diluyó en un volumen

100 veces superior del mismo medio de cultivo y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una DO de 0,8-1 a 595 nm. En ese momento se indujo la expresión con IPTG 0,1 mM durante 3 horas manteniendo las mismas condiciones de cultivo. Transcurrido ese tiempo las células se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en PBS. A continuación las células se lisaron por sonicación mediante 5 ciclos de 30 segundos. El lisado se incubó con Tritón X-100 (Sigma) a una concentración final del 1 % durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación suave. La muestra se centrifugó a 20.000 rpm durante 30 minutos, recogiendo el sobrenadante y el sedimento por separado. Ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE para comprobar si la proteína de fusión se había producido de forma soluble o insoluble.

La mougrina-GST se expresó 100 % de forma insoluble, por lo que decidimos purificarla directamente a partir del sedimento de la lisis celular mediante electroelución de geles de poliacrilamida.

Para ello, el sedimento de la lisis celular se resolvió en geles preparativos (15 x 19 cm) de poliacrilamida al 12 % que se tiñeron con CuCl_2 0,3 M. La banda correspondiente a la mougrina se cortó del gel y se destiñó con EDTA 0,25 M en Tris 0,25 M (Harlow y Lane, 1988).

La electroelución de la proteína de las bandas de gel se realizó con el modelo 422 Electro-Eluter (BioRad), durante 3 horas en tampón de elución (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %). Pasado este tiempo, se cambió el tampón de elución por el de electrodiálisis (Tris 25 mM, Glicina 192 mM) y se mantuvo durante 2 horas más, con el fin de retirar el SDS de la muestra. Durante todo el proceso se aplicó un voltaje de 10 mA por cada uno de los tubos con muestra. Una vez terminada la elución, se recogieron las muestras de proteína, se determinó su concentración mediante espectrofotometría a 280 nm y se almacenó a -80°C .

5.2. Ensayos de vacunación.

Estos ensayos se llevaron a cabo con las 6 proteínas recombinantes obtenidas en el apartado anterior: PLA2, 7DB, RP-60S, actina, apirasa y mougrina-GST.

Se utilizaron 24 conejos, divididos en 8 grupos de 3 conejos cada uno. Dos grupos se utilizaron como controles y cada uno de los 6 grupos restantes se inmunizó con una proteína recombinante distinta (Tabla XII).

Tabla XII. Protocolo de vacunación de conejos con las proteínas recombinantes.

Grupo	No. conejos por grupo	Proteína	Dosis	Adyuvante		
				1ª	2ª	3ª
1	3	PLA2	200 µg	FCA-FIA-PBS		
2	3	7DB	200 µg	FCA-FIA-PBS		
3	3	RP-60S	200 µg	FCA-FIA-PBS		
4	3	Actina	200 µg	FCA-FIA-PBS		
5	3	Apirasa	200 µg	FCA-FIA-PBS		
6	3	Mougrina-GST	200 µg	FCA-FIA-PBS		
Control 1	3	rGST de <i>S. japonicum</i>	100 µg	FCA-FIA-PBS		
Control 2	3	-	-	FCA-FIA-PBS		

Cada animal recibió tres dosis subcutáneas de 200 µg/dosis, administradas quincenalmente: la primera con el adyuvante completo de Freund (FCA), la segunda con el incompleto (FIA) y la tercera en PBS. Por su parte, los conejos del grupo control 1 recibieron 3 dosis de 100 µg/dosis de GST recombinante de *Schistosoma japonicum* (Sigma), mientras que a los conejos del grupo control 2 se les administró únicamente el adyuvante.

Todos los conejos se sangraron antes de administrar la primera dosis (sueros preinmunes) y a los 7 días de la tercera, inmediatamente antes de practicar las infestaciones con *O. moubata*.

La reactividad de los sueros y el título de anticuerpos frente a la proteína homóloga se determinaron mediante un ensayo de ELISA. La especificidad se comprobó por western blot, enfrentando cada suero con la proteína homóloga y con la saliva de *O. moubata*.

A los 7 días de la tercera dosis de antígeno, todos los conejos recibieron una infestación con 15 hembras, 25 machos y 50 ninfas-3 de *O. moubata*. Los ejemplares se mantuvieron sobre los conejos durante una hora, por ser este tiempo suficiente para que todas las fases evolutivas completen su alimentación (García Varas, 2004).

Una vez transcurrido ese tiempo, los ejemplares se recogieron y se depositaron en la cámara ambiental durante 24 horas para que completaran la emisión del fluido coxal. Acto seguido se pesaron y se distribuyeron en distintos viales: la ninfas-3 de cada conejo juntas, mientras que cada hembra se emparejó con uno o dos machos y se depositó en un vial individual. En estas condiciones se mantuvieron durante 2 meses para, transcurrido ese tiempo, evaluar la supervivencia, la fertilidad de las hembras y la muda de las ninfas-3.

5.3. Parámetros analizados para determinar la acción de la respuesta inmunitaria inducida por las proteínas recombinantes.

El efecto de la respuesta inmunitaria inducida por las recombinantes sobre estos ejemplares se determinó midiendo los siguientes parámetros:

1. Cantidad de sangre ingerida.
2. Fecundidad de las hembras, esto es:
 - i. Número de huevos puestos por cada hembra.
 - ii. Porcentaje de huevos viables: $100 \times \text{número de ninfas-1} / \text{número de huevos}$.
 - iii. Índice de reproducción de las hembras: $\text{número de ninfas-1 por hembra alimentada en el conejo vacunado} / \text{media de ninfas-1 por hembra alimentada en conejos control}$.
3. Porcentaje de muda de las ninfas-3.
4. Porcentaje de mortalidad de los ejemplares a los 2 meses.
5. Índices de supervivencia de cada fase evolutiva: $\text{ejemplares supervivientes alimentados en los conejos vacunados} / \text{media de los ejemplares supervivientes alimentados en los conejos control}$.

Por último, se calculó la eficacia protectora de cada recombinante a partir de los índices de supervivencia y de reproducción de las hembras, por ser estos parámetros los que indican el número de ejemplares de la nueva generación que surge tras la alimentación y, por tanto, los que determinan en mayor medida la evolución del tamaño de las poblaciones del parásito.

- ✓ **Índice de supervivencia de las hembras** = hembras vivas alimentadas en conejos vacunados / media de las hembras supervivientes alimentadas en los conejos control.
- ✓ **Índice de reproducción** = número de ninfas-1 por hembra en conejos vacunados / media de ninfas-1 por hembra alimentada en conejos control.
- ✓ **Eficacia** = $100 \times (1 - \text{índice supervivencia} \times \text{índice de reproducción})$

5.4. Análisis estadístico.

Todos los parámetros analizados en los ejemplares alimentados sobre los hospedadores, tanto vacunados como controles, se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía usando como factor de variación el tratamiento antigénico. En los casos en los que se obtuvieron unos valores significativos, se utilizó el test de la t de Dunnett para realizar comparaciones entre dos grupos (vacunados frente a controles). Las diferencias se consideraron significativas para una probabilidad de error del 5 % ($p < 0,05$). El análisis estadístico se efectuó con el programa SPSSv19.

RESULTADOS

OBJETIVO 1.**CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TSGP1 DE *O. MOUBATA*, PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y ANÁLISIS DE SU UTILIDAD COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.****1.1. Secuencia de cDNA codificante y aminoacídica de TSGP1 de *O. moubata*.**

La secuencia de cDNA codificante de TSGP1 se obtuvo amplificando, en primer lugar, los extremos del correspondiente mRNA mediante 3'- y 5'-RACE. Una vez conocidos éstos, se amplificó el fragmento codificante con cebadores específicos diseñados *ad hoc*, desde el codón de inicio al de terminación, mediante RT-PCR (Figura 1).

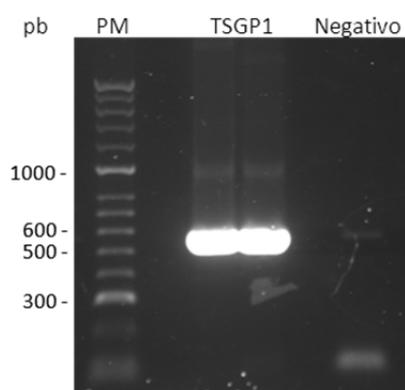


Figura 1. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Producto de la amplificación por RT-PCR del cDNA de TSGP1. PM, marcador de tamaño molecular. Negativo, reacción mezcla de PCR sin DNA. pb, pares de bases.

La molécula de cDNA resultante contenía 597 pb y el análisis de su secuencia por BLAST confirmó su correcta identidad. Esta secuencia se depositó en la base de datos GenBank con el código de acceso HM481418 (Figura 2A).

La secuencia aminoacídica correspondiente, obtenida *in silico*, es una proteína de 198 aminoácidos (aa), con un peso molecular y un punto isoelectrónico teóricos de 21,7 kDa y 5,31, respectivamente. Esta proteína carece de dominios transmembrana y de sitios de anclaje a la membrana tipo glicosil-fosfatidilinositol; la proteína naciente muestra un péptido señal, que comprende los primeros 17 aa del extremo N-terminal, y dos sitios potenciales de N-glicosilación en los residuos de asparagina de las posiciones 97 y 106, respectivamente (Figura 2B).

La proteína madura, sin péptido señal, consta de 181 aa y de un peso molecular y punto isoelectrónico teóricos de 19,8 kDa y 5,02, respectivamente. Su secuencia N-terminal coincide con la del antígeno nativo 20A1, secuenciado por Baranda et al. (2000), excepto en la posición 9 (cisteína en lugar de metionina), y además incluye los dos péptidos internos (EHSCVYILPP y YPYMGGYK) obtenidos por Oleaga et al. (2007) mediante secuenciación *de novo*.

A

```

1  ATGCACCGGCTGCTACTGCTACTCATTGCGTTGTTTTTCGTTTCAGCAGTGCTGAAGAAAAC 60
61  CAGCGTGGGAAGGGATGCTTGGGCTCTACAGCTGCTAGCGTGGCTGTATTTGGAAAAGAT 120
121 GGAAGTGCAGGATCTGCAACTATAGGGTATTCTTACCTTGTGAAGACAACCTATACGGAT 180
181 GAACATTCTTGTGTTTACATTCTTCCACCCCATGGACAAAAGGACAATGAAGGCCGTTAC 240
241 CCTTACTACATGGGATACAAGGATGAGGGTAATCAGTGGGAAGAAGATAAATGGGACGATA 300
301 ACCATCCAGGGCAGCAACATCAGTGACAATGACCCAGATTATGGACAGACTGTAACCACA 360
361 GTGCTATACACTCACCTTGACGGTGGATGTGACGTTACAACCTTCCAAGGGGCAACCGGC 420
421 AACACAATGTAGGAGGACCATATCTTGAGCTGTGGTACCATAGTGGAGCAAGCCAGTTC 480
481 GCCCTTGAATGCTGCAAGGGGAGAATTTGAGAAGCAACTTAAGAATTTCAAGAGCACAGAC 540
541 GTTCGAGAGATTAACCAGGGATGTAACCTATGCTGACGTCATCGAGCAAAAAAGTTGA

```

B

```

1  MHRLLLLLIALFSFSSAEENQRGKGLGSTAASVAVFVKDGSAGSATIGY 50
51  SYLVKTTYTDEHSCVYILPPHGQKDNENGRYPYMGYKDEGNQWKKINGTI 100
101 TIQGSNISDNDPDYQGQTVTTVLYTHLDGGCDVTFQGATGNMNVGGPYLE 150
151 LWYHSGASQFALECKGEFEKQLKNFKSTDVREINQGCNYADVIEQKS

```

Figura 2. (A) Secuencia codificante completa del cDNA de TSGP1 de *O. moubata* desde el codón de inicio hasta el de terminación. **(B)** Secuencia de aminoácidos de la proteína OmTSGP1. Los primeros 17 aminoácidos, marcados en rojo, son el péptido señal. Los aminoácidos subrayados indican las secuencias parciales obtenidas previamente por Baranda et al. (2000), EENQRGKGLGSTAASVAVF, y Oleaga et al. (2007), EHSCVYILPP y YPYMGYK. Los sitios potenciales de N-glicosilación, las asparaginas 97 y 106, se indican en azul.

1.2. Análisis filogenético y estructural de la OmTSGP1.

Para hacer el análisis filogenético se practicó primero una búsqueda por BLASTp en las bases de datos NCBI nr y Uniprot utilizando la secuencia peptídica de la OmTSGP1 madura. Esta búsqueda proporcionó 5 secuencias homólogas con un valor de E inferior 10^{-15} : la TSGP1 de *O. savignyi* ([AAN76828.1](#)) y 4 lipocalinas de *Ornithodoros parkeri*, concretamente, “moubatin 1-like 2” ([ABR23399.1](#)), “moubatin like 3” ([ABR23414.1](#)), “salivary secreted lipocalin” ([ABR23443.1](#)) y “moubatin like 1” ([ABR23347.1](#)). Todas ellas son lipocalinas salivales de argásidos portadoras del motivo de unión a aminas biogénicas (BAB).

Junto a las secuencias anteriores también se incluyeron en el alineamiento y análisis filogenético otras 4 lipocalinas salivales de argásidos que, aunque no fueron recuperadas en el BLASTp con OmTSGP1, también conservan en su secuencia el motivo BAB: monomina ([ABI52634.1](#)), monotonina ([ABI52654.1](#)) y AM-182 ([ABI52694.1](#)) de *A. monolakensis*, así como Arg r 1 ([CAG26895.1](#)) de *Argas reflexus*.

Estas 10 secuencias se alinearon con el programa ClustalW 2.1 y el alineamiento resultante, ajustado manualmente, se muestra en la figura 3.

	1	2	
Omobata.TSGP1	NQRGKGC L --GSTAASVAVFGKDGSAAGSATIGYSYLVKTTYTDEHSC V YI 50		
Osavignyi.TSGP1	--GPDGC V --GSTEAKVAVFEGGNAGSPTIGYSYLVKTTYTDEHAC V YI 46		
Oparkeri.Moubatin_1-like_2	-----AC N T-GPIDATKSIIGPGS-----GKYLLKSTYKDEK L CLYV 37		
Oparkeri.Moubatin-like_3	-----AC N T-GSIDATKSIIGPGK-----GKYLLKSTYKDEK S CLYV 37		
Oparkeri.Saliv_Secr_Lipocalin	-----AC N T-GPFDAKRSIIGPGK-----GEYYLARSTYEQNIS C LYV 37		
Oparkeri.Moubatin-like_1	-----AC V D-GPYSAEKSVFPGS-----GKYLLKSTYKPNEND C VYV 37		
Amonolakensis.Monomine	---QQ Q C D ---TVSAWQSLRGP G T-----GGYYLFKTT E GGKTD C TYV 37		
Areflexus.Arg-r_1	----DD C S--GKTDAWTSIKGP K T-----GGYWLKQT T KTG E NE C TYV 37		
Amonolakensis.Monotonin	---SAP C NFN G PFQAWRSV N G P GS-----GGYYMVK T DPQ T PD C PYV 40		
Amonolakensis.AM-182	---SA Q C D FG G PFQAYKSV N G P GN-----GGYYLRK T TK P GT P EC A YV 40		
	* . * : * * : : * * *		
Omobata.TSGP1	LPPHGQKDN E GRYPYMGYKDEGNQW K INGTIT I QGSN I SDND P -DY G Q 99		
Osavignyi.TSGP1	LPPYGTADASGRYPYRMGYKDSNDQWV K LDG K IKTEG S K I IDND P -EY G D 95		
Oparkeri.Moubatin_1-like_2	EARPQ G T S FPAPYP--FGYK E GD-QWVSK T GT V NGQ G AN I IDND D -E F GE 83		
Oparkeri.Moubatin-like_3	EARPQ G T S FPAY P --FGYK E GD-KWVSK T GT V NGQ G AN I IDK D -E F GE 83		
Oparkeri.Saliv_Secr_Lipocalin	VPP E GT E FP A IY P --FGYK E GN-KWV K NG T V N G E GP N I D S D A-G F GV 83		
Oparkeri.Moubatin-like_1	VPP P K G S Q FP A KY P --FG F K Q SD G T W YSG T GEV N VD G PN I L D K D E-KY G Q 84		
Amonolakensis.Monomine	KG-SNFNDAAQ T ATY T Y T Y G Y K DAS G KL T KT T GT A T A K S D I V V GS D ---- 81		
Areflexus.Arg-r_1	KG-TDFK E NT K T A TY T Y G Y K DAS G KL T KT T GT A T A K S D I V V GS D ---- 81		
Amonolakensis.Monotonin	LVP R TR L TE G DA V E F TY G S L ED G -EL T RR T AT V S G Q S N I V V T G G--D N P 87		
Amonolakensis.AM-182	LVP Q NT L SE G Q S T S F T Y G L Q NG-Q M I Q L T AT V T V NG D K I E V T G AG Q D L S 89		
	* . . . * *		
	3		
Omobata.TSGP1	TVTTVLV T HL D GG CDV TT F Q G AT G NN N V G GP Y LE LW Y H S G AS Q -FA--LE 146		
Osavignyi.TSGP1	TVTTVLV T HL G GG CDV TL F EG Q K Q SK V Q G PF L EL W Y H S G ASE-ES--MR 142		
Oparkeri.Moubatin_1-like_2	TNTTLVYSDYK-V CDV GL F RGD---K V GG P H V EL W K H S D ADE-NSADYK 127		
Oparkeri.Moubatin-like_3	TNTTLVYSDYK-V CDV GL F HGA---K V GG P H V EL W K H S D ADE-NSAE F K 127		
Oparkeri.Saliv_Secr_Lipocalin	TNTTLVYSDYK-E CDV GL F HGE---K V GG P Y V EL W K H S D AKK-GSEGLK 127		
Oparkeri.Moubatin-like_1	TNTTLVYSDYK-D CDV GL F HG---S V GG P H V EL W R H S S ADE-NGDG F K 127		
Amonolakensis.Monomine	-HSEVLVSDGS-T CDV VR-LNG-----Q I EL W I H S S ATS N T G N L NS 119		
Areflexus.Arg-r_1	-TSTVIYTDGK-T CDV VK-HGG-----H T EL W V H S S K T S--GGY N N 117		
Amonolakensis.Monotonin	GT T T L I F SDYQ-T CDV VR G PT G -----G Y EL W V H AD N V H --D S SH G 125		
Amonolakensis.AM-182	TT T VL F SDYR-S CDV MR G PD G -----N Y EL W V H S S A I N--L Q SY G 127		
	: : : : . *** ** * * :		
	13	2	% identidad
Omobata.TSGP1	C CK G E F E K Q L KN F KS--TDVREIN-Q G C N YAD V IE Q KS 181		-
Osavignyi.TSGP1	C CE E E F FR K N L K--EG--TAVR K V N -K N C D Y G D V A--- 171		65
Oparkeri.Moubatin_1-like_2	C CT H RY E E E L Q A Q G K -KS Q VRE I G-K G C D Y P K----- 157		32
Oparkeri.Moubatin-like_3	C CK D VY E E E L K R G KK-QS Q DRE I S-K D C D Y P K----- 157		32
Oparkeri.Saliv_Secr_Lipocalin	C CK Q Y F R K E L E K Q G K S K T D F K R V D -K N C K Y P A----- 158		32
Oparkeri.Moubatin-like_1	C CK E K F E E E L K K Q K -ES D V K D V GG Q K C DY P NT K ---- 160		30
Amonolakensis.Monomine	C CT D K F N Q E K GS R PE-----H V VY R ST C P N LP Q ---- 147		20
Areflexus.Arg-r_1	C CD K K F T E TR G ST P A-----NE V Y K - K C P G M P----- 143		32
Amonolakensis.Monotonin	C CD T K F Y Q V T GG N GI-----R D VY Q ET C P P LP T Q---- 154		17
Amonolakensis.AM-182	C CD T K F A Q V A GG R P I -----H H T W Q T Y C P P LP R Q---- 156		17
	** : : . *		

Figura 3. Alineamiento de OmTSGP1 (HM481814.1) y las lipocalinas de argásidos que conservan el motivo BAB: TSGP1 de *O. savignyi* (AAN76828.1); “moubatin 1-like 2” (ABR23399.1), “moubatin like 3” (ABR23414.1), “salivary secreted lipocalin” (ABR23443.1) y “moubatin like 1” (ABR23347.1) de *O. parkeri*; monomina (ABI52634.1), monotonina (ABI52654.1) y AM-182 (ABI52694.1) de *A. monolakensis* y Arg r 1 (CAG26895.1) de *A. reflexus*. Los aminoácidos conservados se señalan con un asterisco, las sustituciones conservativas con dos puntos y las semi-conservativas con uno. Las 6 cisteínas conservadas se han marcado en rojo y los 3 puentes disulfuro teóricos (predichos a partir de las estructuras de TSGP1 de *O. savignyi* y monomina) se han señalado con pares de números sobre los residuos de cisteína implicados. El motivo BAB se ha destacado en amarillo y muestra un patrón altamente conservado: CDVX₇₋₁₇ELWX₁₂₋₁₅C. Se incluye también el porcentaje de identidad de secuencia primaria entre OmTSGP1 y las otras 9 lipocalinas.

En el alineamiento se observa que estas 10 lipocalinas muestran una identidad de secuencia primaria relativamente baja (entre el 17 % y 32 %), excepto las dos TSGP1 ortólogas (65 %). No obstante, todas ellas conservan un patrón muy similar en el motivo BAB (CDVX₇₋₁₇ELWX₁₂₋₁₅C), así como los seis residuos de cisteína implicados en la formación de los puentes disulfuro que son característicos de las lipocalinas unidoras de aminas biogénicas (Mans et al., 2008).

Partiendo del anterior alineamiento se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias, que mostró que estas proteínas se agrupan en dos clados bien definidos, los cuales se corresponden, respectivamente, con los géneros *Argas* y *Ornithodoros* (Figura 4).

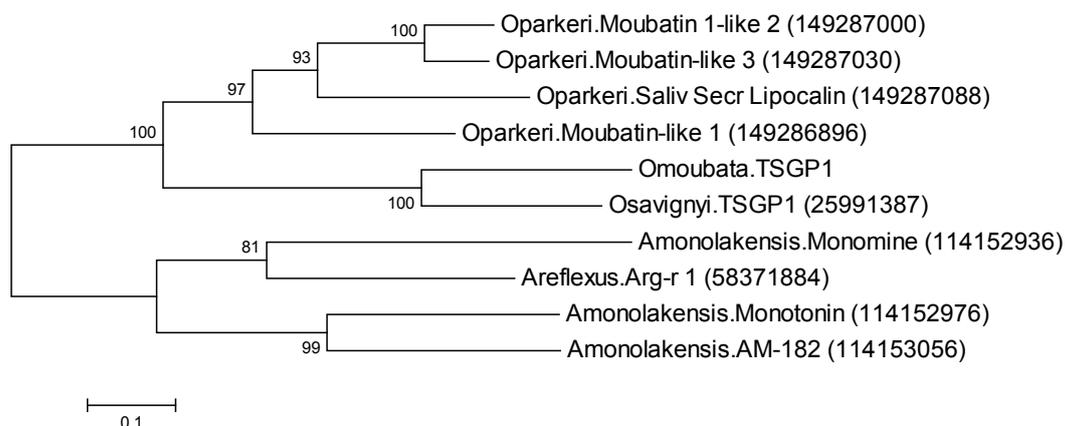


Figura 4. Filograma obtenido a partir del alineamiento múltiple de las 10 lipocalinas incluidas en la figura 3. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Poisson (10.000 bootstraps) y los números en los nodos indican el porcentaje de fiabilidad de las ramificaciones.

Los modelos de estructura secundaria y terciaria de TSGP1 de *O. moubata* y de *O. savignyi* se obtuvieron en el servidor Phyre2 y se compararon entre sí.

El alineamiento de ambas TSGP1 mostró que los residuos conservados se encuentran precisamente en las zonas más ordenadas de ambas moléculas, que son las implicadas en la formación de la estructura secundaria (Figura 5).

En cuanto a los modelos tridimensionales (3D) proporcionados por Phyre2 para ambas TSGP1, el más preciso (100 %) fue el proyectado a partir de la estructura 3D del complejo AM-182/serotonina y en segundo y tercer lugar, respectivamente, los proyectados a partir de los complejos arg-r-1/histamina (100 %) y monomina/histamina (99,9 %).

Los modelos basados en el complejo AM-182/serotonina mostraron que ambas TSGP1 poseen una estructura 3D muy similar entre sí y, a la vez, similar a la estructura 3D típica de las lipocalinas, consistente en una estructura en barril formado por 8 láminas β anti-paralelas y una hélice α , C-terminal, plegada contra el lateral del barril al cual confiere mayor estabilidad (Figura 6).

```

O.moubata_TSGP1  EENQRGKGLGSTAASVAVFGKDGSAIGYSYLVKTTYTDEHSCVYILPPHGQKDNE 60
O.savignyi_TSGP1  ----GPDGCVGSTEAKVAVFGEAGNAGSPTIGYSYLVKTTYTDEHACVYILPPYGTADAS 56
                  .**:* ** *.******:.*.***.*****.***:*****:* * .

O.moubata_TSGP1  GRYPYMGYKDEGNQMKKINGTITIQGSNISDNDPDYGTQVTTVLYTHLDGGCDVTFQG 120
O.savignyi_TSGP1  GRYPYRMGYKDSNDQWVKLDGKIKTEGSKIIDNDPEYGDVTTVLYTHLGGCDVTLFEG 116
                  ***** ***.**:* ** *.*.***:***:***:*****.***** **

O.moubata_TSGP1  ATGMNNVGGPYLELWYHSGASQFALECKKGEFEKQLKNFKSTDVREINQGCNYADVIEQKS 181
O.savignyi_TSGP1  QKQSKVQGPFLLELWYHSGASEESMRCEEFEFRKNLK--EGTAVRKVNKNCDYGDVA---- 171
                  .*.:* **:******: :.***: **.*:** :.* **:*:*.*:***

```

Figura 5. Alineamiento de las TSGP1 de *O. moubata* y *O. savignyi* mostrando la predicción de estructura secundaria. Los aminoácidos conservados se señalan con un asterisco, las sustituciones conservativas con dos puntos y las semi-conservativas con uno. Las hélices α se indican en amarillo y las láminas β en azul. Las cisteínas involucradas en cada uno de los tres puentes disulfuro se han unido mediante una línea.

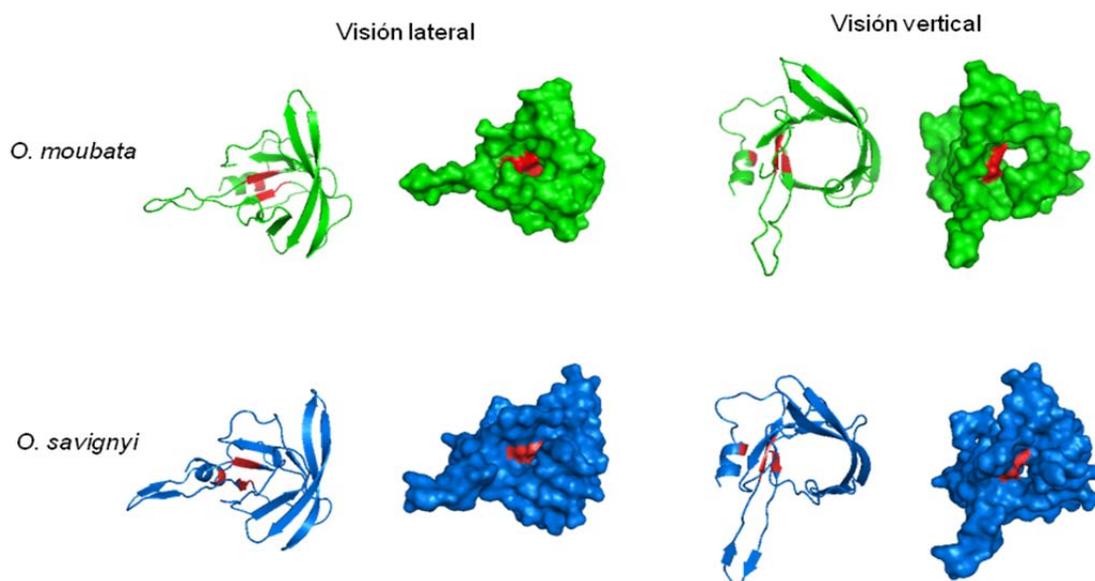


Figura 6. Modelos tridimensionales (de cinta y de predicción de superficie) de la TSGP1 de *O. moubata* y de *O. savignyi* mostrando la estructura en barril β , típica de las lipocalinas. Los aminoácidos que forman el motivo de unión a aminas biogénicas se localizan en el interior del barril y se han coloreado de rojo. Los 4 modelos de la izquierda muestran el barril en visión lateral y los modelos de la derecha lo muestran en visión vertical hacia el interior de la cavidad de unión a aminas biogénicas.

1.3. Expresión y purificación de la proteína OmTSGP1 recombinante truncada, sin péptido señal, en el vector pQE-30.

El vector pQE-30 expresa la proteína recombinante unida a un péptido de 9 aa (His-tag), que incluye 6 histidinas en su extremo amino terminal, de modo que puede purificarse mediante cromatografía de afinidad en resinas cargadas con níquel.

Para los ensayos de utilidad diagnóstica (llevados a cabo por ELISA) se expresó la versión madura de la proteína, sin péptido señal (rtOmTSGP1), en lugar de la proteína completa, porque dicha versión representa mejor al antígeno nativo maduro inoculado al hospedador con la saliva y porque, además, en pruebas previas de expresión y purificación, el rendimiento de la versión truncada fue significativamente mayor que el de la proteína completa.

En las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, la rtOmTSGP1 se expresó 100 % insoluble, por lo que antes de purificarla fue necesario solubilizarla incluyendo urea 8 M en el tampón de lisis, la cual fue retirada progresivamente durante el proceso de purificación.

Una vez purificada, la rtOmTSGP1 migró en los geles de poliacrilamida como una única banda de 21 kDa, en correspondencia con el peso molecular teórico estimado (21,2 kDa) para la proteína de fusión (rtOmTSGP1 + His-tag).

El rendimiento final de la expresión y purificación de esta proteína fue de 3,1 mg de proteína por litro de cultivo, frente los 0,23 mg/L de la proteína completa obtenido en las pruebas previas.

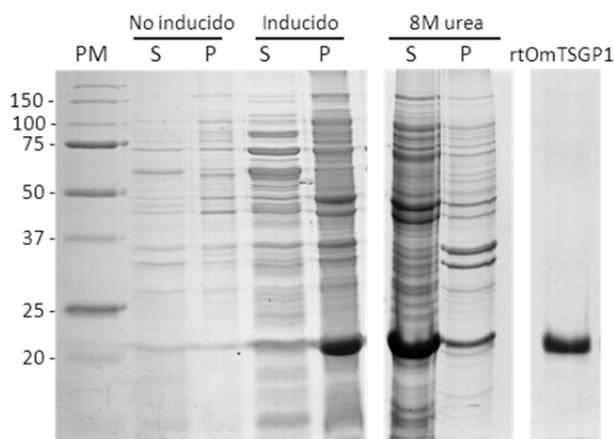


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de Coomassie. Se muestra el sobrenadante (S) y sedimento (P) del lisado celular antes y después de la inducción con IPTG, así como el sobrenadante y sedimento después de solubilizar la muestra con urea 8 M. rtOmTSGP1, proteína recombinante purificada. PM, marcador de pesos moleculares con valores expresados en kDa.

1.4. Utilidad de la rtOmTSGP1 como herramienta diagnóstica.

La especificidad y sensibilidad de la rtOmTSGP1 en la detección de anticuerpos anti-*O. moubata* se comparó con las del SGE enfrentando ambos antígenos por ELISA con un panel de 172 sueros porcinos bien definidos, clasificados en 10 grupos de acuerdo con su origen y especificidad. En concreto, se analizaron 18 sueros positivos anti-*O. moubata* distribuidos en seis grupos de tres sueros por grupo: respuesta primaria, secundaria y residual frente a ninfas-1 de *O. moubata* y respuesta primaria, secundaria y residual frente a adultos de *O. moubata*. El resto fueron 154 sueros negativos anti-*O. moubata* distribuidos en cuatro grupos: 27 sueros frente a *O. erraticus*, 8 sueros frente a otros ectoparásitos, 21 sueros negativos experimentales y 100 sueros de campo negativos.

Las DO obtenidas con los distintos sueros sobre ambos antígenos se transformaron en índices serológicos (IS) y se analizaron mediante las correspondientes curvas ROC (Figura 8 y Tabla 1)

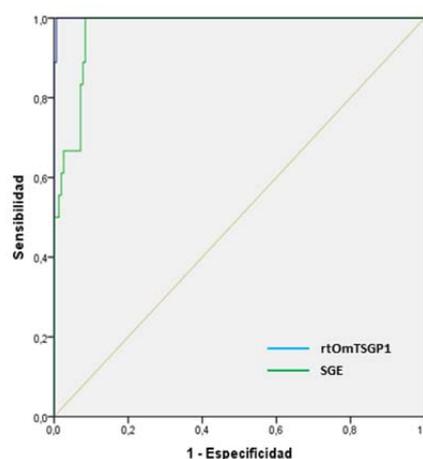


Figura 8. Curvas ROC resultantes del análisis de la eficacia diagnóstica de los antígenos rtOmTSGP1 y SGE para la detección de anticuerpos anti-*O. moubata* mediante ELISA.

Tabla 1. Análisis ROC de la eficacia diagnóstica de los antígenos rtOmTSGP1 y SGE para la detección de anticuerpos anti-*O. moubata*: área bajo la curva \pm error estándar (ABC \pm EE), intervalo de confianza (IC), umbral de positividad/negatividad, sensibilidad, especificidad y eficacia diagnóstica de cada antígeno.

Antígeno	ABC \pm EE	IC (95%)	Umbral (% IS)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Eficacia diagnóstica
rtOmTSGP1	0,998 \pm 0,002	0,000-1,000	7,53	100	99,4	99,70
SGE	0,971 \pm 0,012	0,948-0,999	14,57	100	91,5	95,75

Las curvas resultantes del análisis ROC mostraron un área bajo la curva mayor para la rtOmTSGP1 (0,998) que para el SGE (0,971) y nos permitieron establecer el umbral de positividad/negatividad en 7,53 % para rtOmTSGP1 y 14,57 % para SGE.

Utilizando esos umbrales, todos los sueros del grupo de negativos experimentales (n = 54) resultaron negativos con ambos antígenos. Sin embargo, de los 100 sueros del grupo de negativos de campo, sólo uno resultó positivo frente a rtOmTSGP1 (99 % especificidad en este grupo), mientras que 13 sueros de ellos resultaron positivos frente a SGE (87 % especificidad). En conjunto, el ELISA con rtOmTSGP1 mostró un 100 % de sensibilidad y un 99,4 % de especificidad (99,7 % de eficacia diagnóstica), mientras que el ELISA con SGE mostró un 100 % de sensibilidad y un 91,5 % de especificidad (95,75 % de eficacia diagnóstica).

La tabla 2 muestra la media \pm desviación estándar de los índices serológicos obtenidos con rtOmTSGP1 y con el SGE en los distintos grupos de sueros analizados.

En líneas generales, el SGE proporcionó valores de IS más altos que la rtOmTSGP1 con todos los grupos de sueros excepto con dos, los positivos de respuesta secundaria y de respuesta residual frente a adultos de *O. moubata*.

Las diferencias en el valor de IS con SGE y rtOmTSGP1 fueron muy significativas en todos los grupos de sueros negativos ($p \leq 0,01$) mientras que en los grupos de sueros positivos las diferencias fueron menos significativas ($p \leq 0,05$) o insignificantes.

Por último, cabe destacar que todos los grupos de sueros negativos mostraron una reactividad similar con rtOmTSGP1 (IS medio en torno al 2 %) mientras que su reactividad frente a SGE fue muy variable entre grupos, alcanzándose en alguno de estos grupos, como los sueros anti-ectoparásitos y sueros de campo negativos, un IS medio de hasta el 10 %.

Tabla 2. Índice serológico (media \pm desviación estándar; IS \pm DE) obtenido en los distintos grupos de sueros con los antígenos rtOmTSGP1 y SGE. Para cada grupo de sueros se incluyen: el valor de p resultante de la comparación de los IS entre ambos antígenos y el número de sueros positivos y negativos (+/-) obtenidos con cada antígeno (rtOmTSGP1 y SGE) tras aplicar el umbral de positividad seleccionado e indicado en la tabla 1.

Sueros (n)	rtOmTSGP1		SGE		Valor P
	IS \pm DE	+/-	IS \pm DE	+/-	
Primaria anti-ninfas-1 <i>O. moubata</i> (3)	10,26 \pm 1,01	3/0	17,12 \pm 1,21	3/0	0,022*
Secundaria anti-ninfas-1 <i>O. moubata</i> (3)	53,17 \pm 1,94	3/0	88,75 \pm 7,95	3/0	0,018*
Residual anti-ninfas-1 <i>O. moubata</i> (3)	10,30 \pm 1,31	3/0	18,77 \pm 0,43	3/0	0,012*
Primaria anti-adultos <i>O. moubata</i> (3)	23,79 \pm 1,51	3/0	28,47 \pm 2,98	3/0	0,168
Secundaria anti-adultos <i>O. moubata</i> (3)	95,79 \pm 3,79	3/0	94,75 \pm 5,11	3/0	0,777
Residual anti-adultos <i>O. moubata</i> (3)	38,30 \pm 5,51	3/0	33,14 \pm 3,18	3/0	0,412
Positivos anti-<i>O. moubata</i> (18)	38,60 \pm 30,7	18/0	46,84 \pm 33,40	18/0	0,026*
Anti- <i>O. erraticus</i> (27)	2,84 \pm 1,11	0/27	6,79 \pm 1,53	0/27	0,000**
Anti-ectoparásitos (6)	2,18 \pm 0,72	0/6	10,25 \pm 0,97	0/6	0,000**
Negativos experimentales (21)	1,99 \pm 1,25	0/21	3,60 \pm 1,85	0/21	0,003**
Negativos de campo (100)	1,70 \pm 1,51	1/99	10,14 \pm 6,17	13/87	0,000**
Negativos anti-<i>O. moubata</i> (154)	1,96 \pm 1,44	1/153	8,67 \pm 5,58	13/141	0,000**

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

OBJETIVO 2.

ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE *O. MOUBATA*.

2.1. Obtención de saliva: reproducibilidad y composición de las muestras.

La saliva se obtuvo por separado a partir de distintos lotes de machos y de hembras tras inducir su secreción con pilocarpina o con dopamina.

Con pilocarpina se obtuvieron cantidades de proteína salival muy similares en todos los lotes de garrapatas del mismo sexo. Para las hembras un promedio de 1,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (44 μg por ejemplar) y para los machos un promedio de 0,77 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (31 μg por ejemplar).

La reproducibilidad entre lotes se comprobó analizando por SDS-PAGE la composición de varios lotes de saliva de machos y hembras seleccionados al azar. En dichos lotes se observó que los perfiles de bandas eran prácticamente idénticos entre los procedentes de un mismo sexo, pero notablemente diferentes entre lotes de sexos distintos. En el caso de las hembras, se observaron unas 20 bandas de muy distinta intensidad, con pesos moleculares entre 15 y 150 kDa; las bandas más intensas se encontraban todas entre los 20 y 25 kDa. En la saliva de los machos se pudieron observar hasta 36 bandas, también de intensidad muy variable, y tamaños entre 15 y 300 kDa. De ellas, las más intensas se encontraron a nivel de los 100, 37 y 20-25 kDa (Figura 9A).

Para comprobar si el agente inductor de la secreción influía en la composición de la saliva, varios lotes adicionales de adultos de ambos sexos fueron estimulados con dopamina, observándose que los perfiles de bandas de estas muestras eran básicamente iguales a los de la saliva obtenida con pilocarpina (Figura 9B).

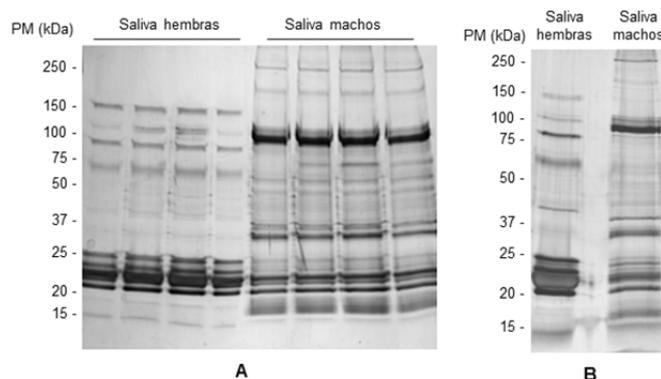


Figura 9. Geles de poliacrilamida en gradiente 5-20 % teñidos con plata. **(A)** Muestras de varios lotes de saliva de hembras y machos obtenidos mediante estimulación con pilocarpina. **(B)** Lotes adicionales de saliva de hembras y machos obtenidos mediante estimulación con dopamina. PM, marcador de pesos moleculares.

La cantidad de proteína salival obtenida con dopamina fue, sin embargo, notablemente inferior a la obtenida con pilocarpina: 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en los lotes de hembras (9,9 μg de proteína por ejemplar) y 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en los lotes de machos (7,5 μg por ejemplar). Puesto que la estimulación con pilocarpina proporcionaba un mayor rendimiento, se utilizó

rutinariamente este procedimiento para obtener la cantidad de proteína salival que consideramos necesaria (al menos unos 3 mg de cada sexo).

2.2. Ecuación de la saliva.

Con objeto de posibilitar la detección e identificación de las proteínas minoritarias, la saliva fue concentrada y ecualizada. En total se ecualizaron unos 2,5 mg de proteína salival de cada sexo, recuperándose 78 μ g de proteína de hembras y 96 μ g de proteína de machos en las correspondientes fracciones de saliva ecualizada. Como era previsible, la ecualización incrementó el número y la intensidad de las bandas en la saliva de machos y en la de hembras, generándose perfiles más complejos que, sin embargo, mantenían las diferencias entre sexos (Figura 10).

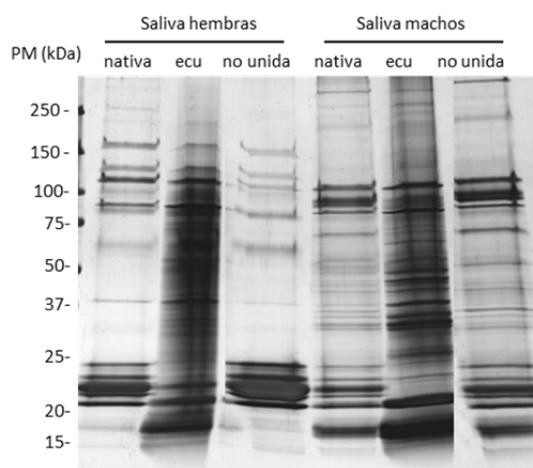


Figura 10. Geles de poliacrilamida en gradiente 5-20 % teñidos con plata. Saliva de hembras y machos antes de la ecualización (**nativa**) y fracciones obtenidas tras la ecualización: saliva ecualizada (**ecu**) y fracción de proteína no retenida por la columna de hexa-péptidos utilizada en la ecualización (**no unida**). PM, marcador de pesos moleculares.

2.3. Análisis proteómico “off-gel”

2.3.1. Número de proteínas identificadas mediante LC-MS/MS en la saliva nativa y ecualizada de ambos sexos.

Tras la digestión con tripsina y la espectrometría de masas LC-MS/MS, las búsquedas mediante Mascot en la base de datos EST_acari recuperaron, en conjunto para las cuatro muestras analizadas (saliva nativa y ecualizada de hembras y de machos), un total de 278 secuencias, 187 de las cuales pudieron ser identificadas. Para las 91 restantes (33 %), el análisis BLAST no encontró homología con ninguna secuencia conocida, por lo que se anotaron como no identificados.

Las búsquedas mediante Protein Pilot en la base de datos NCBIInr proporcionaron 154 identificaciones adicionales. En conjunto, ambos tipos de búsquedas permitieron identificar un total de 341 proteínas. Una vez eliminadas las redundantes, el total de proteínas únicas identificadas en machos y hembras fue de 193.

En la tabla 3 se detallan el número de proteínas identificadas y el número de identificaciones no redundantes para cada una de las muestras de saliva. Las proteínas identificadas simultáneamente en la saliva nativa y ecualizada del mismo sexo (3 en hembras y 11 en machos) se contaron sólo una vez y se anotaron en las muestras de saliva nativa. De este modo, las proteínas anotadas en la correspondiente muestra ecualizada fueron siempre identificaciones adicionales.

Como resultado, identificamos 118 proteínas en la saliva de las hembras (el 69,5 % de ellas después de la ecualización) y 85 proteínas en la saliva de machos (el 40 % después de la ecualización). De acuerdo con estos resultados, la ecualización incrementó el número de proteínas identificadas en un 228 % en las hembras y en un 67 % en los machos.

De las 193 proteínas diferentes identificadas, solo 10 se encontraron simultáneamente en la saliva de machos y hembras, confirmando las diferencias en la composición observadas en el análisis por SDS-PAGE (Figura 9).

Tabla 3. Número de proteínas identificadas en el análisis “off-gel” de la saliva de *O. moubata*.

Base de datos (algoritmo)		Saliva hembras		Saliva machos		Ambos sexos
		Nativa	Ecualizada	Nativa	Ecualizada	Total
EST_acari (Mascot)	Secuencias recuperadas	65	81	77	55	278
	Secuencias no identificadas (%)	37 (57 %)	26 (33 %)	18 (23 %)	10 (18 %)	91 (33 %)
	Proteínas identificadas	28	55	59	45	187
NCBIInr_metazoa (Protein Pilot)	Proteínas identificadas	17	52	45	40	154
	Total proteínas identificadas	45	107	104	85	341
EST_acari + NCBIInr_metazoa	Proteínas no redundantes	36	82	51	34	203
	Proteínas no redundantes en cada sexo		118		85	-
	Total no redundantes		-		-	193

2.3.2. Descripción y clasificación de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de *O. moubata*.

Tras llevar a cabo el análisis bioinformático y la anotación funcional de las proteínas identificadas, dichas proteínas se clasificaron en dos grandes categorías, las secretadas y las intracelulares o “housekeeping”, y dentro de éstas categorías en distintos grupos según su función molecular -real o teórica- o su pertenencia a una determinada familia proteica. Las tablas 4 y 5 muestran, respectivamente, el resultado de dicha clasificación en hembras y machos; la figura 11 resume el contenido de ambas tablas.

Tabla 4. Proteínas identificadas en muestras de saliva nativa y eculizada de **hembras de *Ornithodoros moubata*** mediante el análisis proteómico “off-gel”. Las proteínas se clasificaron como secretadas o intracelulares/housekeeping y, dentro de estas categorías, en distintos grupos de acuerdo con su función o pertenencia a familias proteicas. Dentro de cada grupo, las proteínas se han ordenado en función del “score” asignado por el algoritmo de búsqueda. Los valores de “score” sin decimales corresponden a las identificaciones mediante MASCOT y los valores con decimales a las identificaciones mediante Protein Pilot. **PN**, número de péptidos singulares identificados. **emPAI**, índice de abundancia proteica modificado exponencialmente suministrado por MASCOT. **% emPAI**, abundancia relativa en la muestra calculado dividiendo el valor de emPAI de cada proteína por la suma de todos los valores de emPAI de las proteínas de esa muestra y multiplicando por 100. **PM**, peso molecular en kDa según la predicción en Uniprot (www.uniprot.org). **Signal P**, presencia de señales de secreción clásica. **Secretome P**, predicción de vías de secreción no clásicas. **TMH**, número de hélices transmembrana. **GPIⁿ**, sitios potenciales para anclajes tipo GPI con indicación del residuo aminoacídico implicado. Las proteínas marcadas en azul son las identificadas sólo en la muestra de saliva eculizada. Las proteínas señaladas con un asterisco son las identificadas en ambos sexos. La última columna (**PAGE 1D**) indica las proteínas que también fueron identificadas en el análisis proteómico clásico, a partir de las bandas extraídas de geles 1D (Figura 13).

PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO	ESPECIE	SCORE	PN	emPAI	% emPAI	PM	Signal P	Secretome P	TMH/GPI	PAGE 1D (Fig. 13)
SECRETADAS (25)											
Serina proteasas (3)											
factor D-like protein (serine proteinase)	AAO12856.1	<i>Dermacentor andersoni</i>	89	3	-	-	40,9	sí			
serine proteinase, putative	XP_002409528.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	-	-	26,4			1 TMH	
urokinase-type plasminogen activator	XP_001848040.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,4	1	-	-	28,1	Sí	Sí		
Lipocalinas (3)											
TSGP1 *	ADK94457.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	537	79	3,66	89,92	21,7	Sí	Sí		Sí
TSGP4	AAN76831.1	<i>Ornithodoros savignyi</i>	52	3	0,18	4,42	19,3	Sí	Sí		
moubatin *	AAA29432.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	13.66	13	0,23	5,65	18,8	Sí	Sí		Sí
Inhibidores de proteasas (2)											
thyropin precursor (cistatin)	AAS01022.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	172	12	-	-	7,9	Sí		1 TMH	Sí
collagen alpha-3(VI) chain precursor	NP_990865.1	<i>Gallus gallus</i>	1.35	1	-	-	13,9	Sí			
Superfamilia rica en glicina (2)											
glycine rich secreted salivary gland protein	AAT75325.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	2	-	-	31,7	Sí	Sí		
cement protein	DAA34732.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	51	3	-	-	39,9	Sí	Sí		

Mucinas (2)

proteophosphoglycan, putative	XP_002399267.1	<i>Ixodes scapularis</i>	56	3	-	-	21,9	Sí		
mucin-7, putative	XP_002406133.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	3	-	-	23,6	Sí		

Nucleotidasas (2)

5'-nucleotidase/apyrase	ABS30897.1	<i>Ornithodoros savignyi</i>	4,33	2	-	-	65,1	Sí		Sí
5'-nucleotidase III (subfamily IE hydrolase)	XP_311397.4	<i>Anopheles gambiae</i>	2	1	-	-	34,4			

Relacionadas con la inmunidad (2)

alpha-2-macroglobulin precursor *	AAN10129.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	50,37	21	-	-	165,1	Sí	Sí	1 TMH	Sí
lectin 1 putative immunolectin (C-type lectin)	AAV91436.1	<i>Lonomia obliqua</i>	2	1	-	-	60,3				

Fosfatasas (1)

lysosomal acid phosphatase *	XP_002410320.1	<i>Ixodes scapularis</i>	126	6	-	-	42,3	Sí	Sí		Sí
------------------------------	----------------	--------------------------	-----	---	---	---	------	----	----	--	----

Proteínas secretadas conservadas de función desconocida (8)

hypothetical protein	XP_002399190.1	<i>Ixodes scapularis</i>	67	7	-	-	13,9	Sí			
secreted PAPA repeat protein	DAA34610.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	65	3	-	-	25,8	Sí	Sí	1 TMH	
hypothetical secreted protein 108	DAA34554.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	64	2	-	-	15,2	Sí	Sí	GPI ¹²¹	
secreted salivary gland peptide	XP_002406260.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	2	-	-	25,0				
secreted protein, putative	XP_002408924.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	2	-	-	7,5			2 TMH	
secreted protein, putative	XP_002399632.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	3	-	-	20,6	Sí	Sí		
secreted protein, putative	XP_002402709.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	2	-	-	38,3		Sí		
F-box/LRR-repeat protein, putative	XP_002403227.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	-	-	45,3		Sí		

INTRACELULARES/HOUSEKEEPING (92)**Transducción de señales (14)**

guanylate-binding protein	XP_002408177.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	2	-	-	60,67			2 TMH	
cyclin-dependent kinase-2 interacting protein	XP_002399373.1	<i>Ixodes scapularis</i>	59	6	-	-	24,07				
toll, putative	XP_002406802.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	7	-	-	41,69			1 TMH	
GDP-mannose 4,6-dehydratase	NP_001134845.1	<i>Salmo salar</i>	56	2	-	-	47,65				

hypothetical protein RhoGEF domain	XP_001649435.1	<i>Aedes aegypti</i>	50	3	-	-	205,78		Sí	
phosphoenolpyruvate carboxylase kinase *	XP_002413374.1	<i>Ixodes scapularis</i>	56	2	-	-	61,04			
calumenin, putative	XP_002407941.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	2	-	-	40,12		Sí	
leucine rich repeat C-terminal domain	XP_002133864.1	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	2,31	1	-	-	202,84		Sí	Sí 9 TMH
guanylate cyclase	XP_001663219.1	<i>Aedes aegypti</i>	2	1	-	-	70,17			
mitogen-activated protein kinase 8	NP_571796.1	<i>Danio rerio</i>	2	1	-	-	44,14			
A-kinase anchor protein	AAD39150.1	<i>Rattus norvegicus</i>	1,7	1	-	-	254,35		Sí	
GTPase-activating protein, putative.	XP_002426989.1	<i>Pediculus humanus</i>	1,55	1	-	-	178,86		Sí	
7-transmembrane G-protein-coupled receptor *	XP_002632572.1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1,39	1	-	-	92,86			7 TMH
amyloid beta A4 precursor protein-binding family A	XP_002914782.1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	1,31	1	-	-	37,51		Sí	
Regulación nuclear (13)										
DNA double-strand break repair rad50 ATPase	XP_002407401.1	<i>Ixodes scapularis</i>	63	3	-	-	59,64			
zinc finger CCHC domain-containing protein 4-like	XP_003411427.1	<i>Loxodonta africana</i>	61	4	-	-	59,46			
apoptosis-promoting RNA-binding protein TIA-1	XP_002408889.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	5	-	-	35,47		Sí	
core histone H2A/H2B/H3/H4	XP_002399568.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	2	-	-	15,33			
DNA repair protein RAD51/RHP55, putative	XP_002405184.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	6	-	-	38,31			
hypothetical protein	XP_002108586.1	<i>Trichoplax adhaerens</i>	52	2	-	-	119,74			
cell division cycle 2-like	AAY66874.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	2	-	-	11,33		Sí	
RNA-binding protein musashi *	XP_002412054.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	-	-	28,82		Sí	
histone	XP_002413715.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	3	-	-	24,86		Sí	
recombination activating protein 1 (RAG1)	ABG47733.1	<i>Glyptothorax trilineatus</i>	2,15	1	-	-	43,97			
alphaA-crystallin-binding protein 1	AAA98810.1	<i>Mus musculus</i>	2	1	-	-	288,34		Sí	
TRAP-like (trr-1) kinase	NP_001022032.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1,73	1	-	-	465,55			
suppressor of sable	XP_002099698.1	<i>Drosophila yakuba</i>	1,43	3	-	-	147,23		Sí	
Síntesis, modificación y transporte de proteínas (10)										
glycosyltransferase	XP_002405751.1	<i>Ixodes scapularis</i>	53	4	-	-	40,08			
ATP-dependent RNA helicase DDX56	NP_001231472.1	<i>Sus scrofa</i>	53	2	-	-	61,32			
ribophorin	XP_002409944.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	6	-	-	68,44		Sí	1 TMH

chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	XP_003415199.1	<i>Loxodonta africana</i>	50	2	-	-	60,59		
serine/threonine kinase NLK	XP_001662367.1	<i>Aedes aegypti</i>	50	2	-	-	36,28	Sí	
cyclophilin B precursor	XP_0024110624.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	3	-	-	21,47	Sí	
ADP ribosylation factor 79F *	ABI52727.1	<i>Argas monolakensis</i>	48	2	-	-	20,58		
SH2 domain binding protein (TPR superfamily).	ACY44038.1	<i>Abacion magnum</i>	1,7	1	-	-	19,37		
probable rRNA-processing protein EBP2-like	BAH71299.1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1,6	1	-	-	33,39		Sí
Rab5 GDP/GTP exchange factor	NP_055319.1	<i>Homo sapiens</i>	1,5	1	-	-	79,37		
Transportadores (10)									
vitellogenin *	BAH02666.2	<i>Ornithodoros moubata</i>	735	45	-	-	205,06	Sí	Sí
hemelipoglycoprotein precursor	XP_002411431.1	<i>Ixodes scapularis</i>	65	5	-	-	56,24		
hemelipoglycoprotein precursor	XP_002411435.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	2	-	-	177,66	Sí	Sí
innexin inx3-like	XP_003427733.1	<i>Nasonia vitripennis</i>	52	3	-	-	44,76		4 TMH
nuclear pore complex protein nup98	XP_002415833.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	5	-	-	146,05		Sí
ATP-binding cassette sub-family A member 3-like	XP_001947916.2	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	48	5	-	-	197,53		14 TMH
Sec14p-like lipid-binding domain containing protein	XP_002404368.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	-	-	80,58		
Bestrophin-4	ABG02138.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	1,57	1	-	-	64,06		5 TMH
2-oxoglutarate/malate carrier protein-like	XP_002610854.1	<i>Branchiostoma floridae</i>	1,32	1	-	-	34,32		1 TMH
protein canopy homolog 1 precursor	NP_001088889.1	<i>Xenopus laevis</i>	1,32	1	-	-	20,71	Sí	
Proteínas del citoesqueleto (5)									
actin *	BAE46505.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	87	6	-	-	41,84		Sí
paramyosin, putative	XP_002407400.1	<i>Ixodes scapularis</i>	63	3	-	-	56,83		
microtubule-actin cross-linking factor 1-like	XP_003454660.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	60	2	-	-	855,23		
septin-1-like	XP_003493686.1	<i>Bombus impatiens</i>	59	3	-	-	41,09		
dynein heavy chain, isoform C	NP_001163759.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4	1	-	-	580,46		Sí
Destoxificación (5)									
alcohol dehydrogenase, short chain	XP_002406421.1	<i>Ixodes scapularis</i>	71	5	-	-	25,76		
cytochrome P450	XP_002434947.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	2	-	-	60,22		2 TMH
monooxygenase	XP_002412032.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	3	-	-	65,82		Sí

sulfotransferase, putative	XP_002412156.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	2	-	-	31,23			
short-chain dehydrogenase	EAT45862.1	<i>Aedes aegypti</i>	2	1	-	-	37,61			
Maquinaria del proteasoma (5)										
goliath E3 ubiquitin ligase-like	XP_966546.1	<i>Tribolium castaneum</i>	56	3	-	-	52,08	Sí	Sí	1 TMH
ubiquitin protein ligase	XP_002414996.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	5	-	-	19,72		Sí	
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	XP_002636074.1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	2	1	-	-	46,20		Sí	
F-box and WD domain protein	XP_002406691.1	<i>Ixodes scapularis</i>	1,6	1	-	-	58,09			
E3 ubiquitin-protein ligase hyd	NP_524296.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	1,43	1	-	-	318,88		Sí	
Transcripción (4)										
conserved hypothetical protein	XP_002407059.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	4	-	-	28,36			
PR domain zinc finger protein 2-like	XP_002925632.1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	1,91	1	-	-	186,30			
Elav-like family member 6-like	XP_002919757.1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	1,7	1	-	-	49,89			
chromodomain helicase-DNA-binding protein 3	XP_001846200.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,52	1	-	-	223,88			
Metabolismo energético (4)										
electron transfer flavoprotein subunit alpha	XP_624102.1	<i>Apis mellifera</i>	57	3	-	-	35,38			
cytochrome C oxidase subunit Va	XP_002409979.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	2	-	-	17,46			
phosphorylase kinase gamma subunit	XP_002400416.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	3	-	-	44,78			
acyl-CoA synthetase	XP_002408024.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	3	-	-	47,34			
Metabolismo de nucleótidos y carbohidratos (3)										
glucosamine-fructose-6-P- aminotransferase	XP_765503.1	<i>Theileria parva</i>	49	2	-	-	90,38			
adenine phosphoribosyltransferase isoform b	NP_001025189.1	<i>Homo sapiens</i>	1,87	1	-	-	14,55			
Adenosine/AMP deaminase	AAD52851.1	<i>Glossina morsitans</i>	1,4	1	-	-	58,22	Sí		
Matriz extracelular y adhesión (2)										
ankyrin repeat domain-containing protein	XP_003486678.1	<i>Bombus impatiens</i>	48	4	-	-	23,736			
precollagen-NG	AAM34599.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	2,03	1	-	-	79,251	Sí	Sí	

Conservadas de función desconocida (17)

hypothetical protein	XP_002409579.1	<i>Ixodes scapularis</i>	66	3	-	-	21,07	Sí	
conserved hypothetical protein	XP_002429027.1	<i>Pediculus humanus</i>	60	2	-	-	134,22	Sí	
conserved hypothetical protein	XP_002399363.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	3	-	-	21,58	Sí	
conserved hypothetical protein	XP_002411579.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	3	-	-	66,55		
hypothetical protein	XP_002411365.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	2	-	-	13,18		2 TMH
hypothetical protein	XP_002402844.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	2	-	-	24,48		4 TMH
hypothetical protein	XP_002412482.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	3	-	-	23,48		
hypothetical protein	XP_002401289.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	2	-	-	10,88		
hypothetical protein	XP_002433579.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	2	-	-	12,68		
hypothetical protein	XP_002408728.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	4	-	-	6,24	Sí	
RING finger motif (Zinc finger) containing protein	XP_002405290.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	2	-	-	16,16		
hypothetical protein	XP_002433647.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	3	-	-	12,82		
conserved hypothetical protein	XP_002406269.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	-	-	10,40		
uncharacterized protein	XP_002100206.1	<i>Drosophila yakuba</i>	2,25	1	-	-	89,55	Sí	Sí
retrotransposon-like 1	NP_001127830.4	<i>Sus scrofa</i>	2,04	1	-	-	153,28		1 TMH
acetylcholinesterase, putative	XP_002409706.1	<i>Ixodes scapularis</i>	1,7	1	-	-	51,14		
uncharacterized	XP_002095878.1	<i>Drosophila yakuba</i>	1,31	1	-	-	29,53	Sí	

DEL HOSPEDADOR (1)

serum albumin	NP_001075813.1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	9,47	4	-	-	68,9	Sí	Sí
---------------	----------------	------------------------------	------	---	---	---	------	----	----

Tabla 5. Proteínas identificadas en muestras de saliva nativa y ecualizada de machos de *Ornithodoros moubata* mediante el análisis proteómico “off-gel”. Las proteínas se clasificaron como secretadas o intracelulares/housekeeping y, dentro de estas categorías, en distintos grupos de acuerdo con su función o pertenencia a familias proteicas. Dentro de cada grupo, las proteínas se han ordenado en función del “score” asignado por el algoritmo de búsqueda. Los valores de “score” sin decimales corresponden a las identificaciones mediante MASCOT y los valores con decimales a las identificaciones mediante Protein Pilot. **PN**, número de péptidos singulares identificados. **emPAI**, índice de abundancia proteica modificado exponencialmente suministrado por MASCOT. **% emPAI**, abundancia relativa en la muestra calculado dividiendo el valor de emPAI de cada proteína por la suma de todos los valores de emPAI de las proteínas de esa muestra y multiplicando por 100. **PM**, peso molecular en kDa según la predicción en Uniprot (www.uniprot.org). **Signal P**, presencia de señales de secreción clásica. **Secretome P**, predicción de vías de secreción no clásicas. **TMH**, número de hélices transmembrana. **GPIⁿ**, sitios potenciales para anclajes tipo GPI con indicación del residuo aminoacídico implicado. Las proteínas marcadas en azul son las identificadas sólo en la muestra de saliva ecualizada. Las proteínas señaladas con un asterisco son las identificadas en ambos sexos. La última columna (**PAGE 1D**) indica las proteínas que también fueron identificadas en el análisis proteómico clásico, a partir de las bandas extraídas de geles 1D (Figura 13).

PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO	ESPECIE	SCORE	PN	emPAI	% emPAI	PM	Signal P	Secretome P	TMH/GPI	PAGE 1D (Fig. 13)
SECRETADAS (20)											
Serina proteasas (2)											
trypsin-like serine protease	XP_002413603.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	3	-	-	26,58	Sí			
cationic trypsinogen precursor	AAA30900.1	<i>Canis spp.</i>	1,92	1	-	-	26,17	Sí	Sí		
Otras peptidasas (2)											
similar to ADAM metallopeptidase	XP_002168387.1	<i>Hydra magnipapillata</i>	2	1	-	-	58,10		Sí	2 TMH	
angiotensin-converting enzyme	XP_001659916.1	<i>Aedes aegypti</i>	2	1	-	-	70,14				
Lipocalinas (2)											
TSGP1 *	ADK94457.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	349	43	2,17	29,60	21,71	Sí	Sí		Sí
moubatin *	AAA29432.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	9,65	10	0,1	1,36	18,82	Sí	Sí		Sí
Relacionadas con la inmunidad (2)											
alpha-2-macroglobulin precursor *	AAN10129.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	61	2	-	-	165,07	Sí	Sí	1 TMH	Sí
hemolin, putative	XP_002407721.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	4	-	-	29,79		Sí		
Superfamilia rica en glicina (1)											
structural constituent of cuticle, putative	XP_002410255.1	<i>Ixodes scapularis</i>	69	2	-	-	51,18	Sí	Sí		

Mucinas (1)

mucin/peritrophin-like protein precursor	AAS01023.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	2	1	-	-	19,5	Sí	Sí	Sí
------------------------------------------	------------	-----------------------------	---	---	---	---	------	----	----	----

Inhibidores de proteasas (1)

similar to serine proteinase inhibitor	XP_002199473.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	1,35	1	-	-	43,44			
----------------------------------------	----------------	----------------------------	------	---	---	---	-------	--	--	--

Hidrolasas (1)

epoxide hydrolase 1	XP_001489035.1	<i>Equus caballus</i>	54	2	-	-	52,51	Sí		
---------------------	----------------	-----------------------	----	---	---	---	-------	----	--	--

Fosfatasas (1)

lysosomal acid phosphatase *	XP_002410320.1	<i>Ixodes scapularis</i>	65	3	0,1	1,36	42,33	Sí	Sí	Sí
------------------------------	----------------	--------------------------	----	---	-----	------	-------	----	----	----

Proteínas secretadas conservadas de función desconocida (7)

unknown secreted protein DS-1	AAS94229.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	137	3	-	-	38,8	Sí		
unknown secreted protein PK-26	AAS94230.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	137	3	-	-	39,0	Sí		
conserved hypothetical protein	XP_002404867.1	<i>Ixodes scapularis</i>	91	2	0,11	1,50	18,83	Sí		
fasciclin domain-containing protein	XP_002399918.1	<i>Ixodes scapularis</i>	59	2	-	-	37,56	Sí	Sí	
hypothetical protein	XP_002402150.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	3	-	-	52,04	Sí		5 TMH
secreted salivary gland peptide, putative	XP_002400957.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	2	-	-	16,16	Sí	Sí	6 TMH
salivary gland peptide, putative	XP_002412511.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	2	0,08	1,09	28,94	Sí	Sí	4 TMH

INTRACELULARES/HOUSEKEEPING (63)**Síntesis, modificación y transporte de proteínas (10)**

arginine kinase	NM_001104086.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	213	5	0,29	3,95	39,9 - 61,2			Sí
HSP70 family member	BK007244.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	69	3	-	-	56,19			Sí
protein folding, similar to HSP90	XM_002413104.1	<i>Ixodes scapularis</i>	62	4	-	-	90,28			
methionyl-tRNA synthetase, putative	XM_002407084.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	3	-	-	74,24			
ADP ribosylation factor 79F *	DQ886810.1	<i>Argas monolakensis</i>	60	2	-	-	20,58			
thioredoxin H2 protein, putative	XM_002401871.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	2	-	-	24,14	Sí		Sí
endophilin A, putative	XM_002423258.1	<i>Pediculus humanus</i>	53	2	-	-	40,17		Sí	
3D7 sec-1 family protein	XM_001352180.1	<i>Plasmodium falciparum</i>	51	2	-	-	135,98		Sí	

40S ribosomal protein SA	EF633966.1	<i>Ornithodoros parkeri</i>	48	2	-	-	33,07	Sí	
microtubule affinity-regulating kinase 1	BC072186.1	<i>Xenopus laevis</i>	2	1	-	-	88,62	Sí	
Metabolismo de lípidos, nucleótidos y carbohidratos (8)									
glycogen phosphorylase, putative	XP_002408095.1	<i>Ixodes scapularis</i>	77	2	0,11	1,50	94,28		Sí
triosephosphate isomerase	XP_002411305.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	3	-	-	26,93		
ptm1, putative	XP_002436068.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	5	-	-	52,399	Sí	5 TMH
imidazolone-5-propionate hydrolase	XP_002413459.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	3	-	-	18,12		
glycine/serine hydroxymethyltransferase	XP_002400747.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	4	-	-	51,69		
fatty acyl-CoA elongase, putative	XP_002434209.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	2	-	-	31,81		5 TMH
triosephosphate isomerase	XP_002166707.1	<i>Bombyx mori</i>	2,02	1	-	-	26,78	Sí	
arylformamidase (esterase-lipase)	EEC09597.1	<i>Ixodes scapularis</i>	1,53	1	-	-	31,95		
Metabolismo energético (6)									
GAPDH	ACH88101.1	<i>Dermacentor variabilis</i>	269	15	1,46	19,91	35,95	Sí	Sí
fructose 1,6-bisphosphate aldolase	XP_002411768.1	<i>Ixodes scapularis</i>	255	5	1,71	23,33	39,44	Sí	Sí
enolase	ADD91327.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	250	5	0,56	7,64	46,96		Sí
glyoxylate/hydroxypyruvate reductase	XP_002407150.1	<i>Ixodes scapularis</i>	159	4	0,26	3,54	35,92		
pyruvate kinase	XP_002407464.1	<i>Ixodes scapularis</i>	101	7	0,13	1,77	58,48		Sí
NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa	XP_002424632.1	<i>Pediculus humanus</i>	54	2	-	-	27,25		
Transducción de señales (5)									
seven transmembrane receptor	XP_002436127.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	4	-	-	48,46		6 TMH
phosphoenolpyruvate carboxylase kinase *	XP_002413374.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	4	-	-	61,04		
RAS family protein, putative	XP_002433782.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	2	-	-	20,64		
agouti-related protein	AAG09464.1	<i>Sus scrofa</i>	2	1	-	-	13,20		
7-transmembrane G-protein-coupled receptor *	XP_002632572.1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1,62	1	-	-	37,50		7 TMH
Proteínas del citoesqueleto (3)									
beta-actin	ABP01547.2	<i>Dermacentor variabilis</i>	87	3	0,14	1,91	41,82		Sí
actin *	BAE46505.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	3,89	2	-	-	41,84		Sí

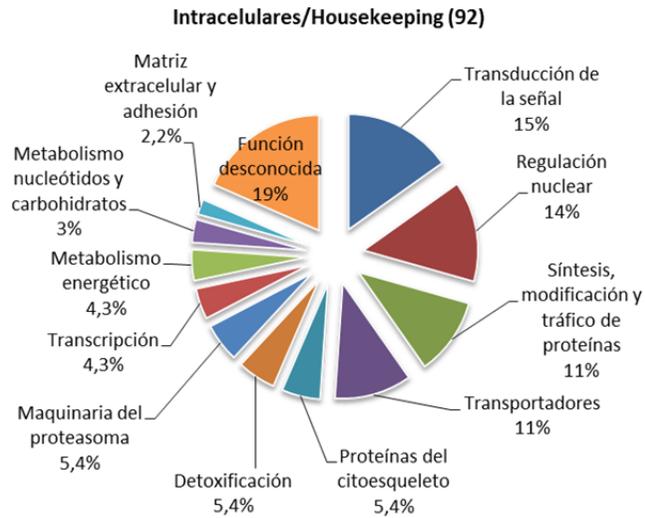
formin 1	NP_989754.1	<i>Gallus gallus</i>	1,43	1	-	-	135,24		Sí
Regulation nuclear (3)									
RNA-binding protein musashi *	XP_002412054.1	<i>Ixodes scapularis</i>	56	3	-	-	28,815		Sí
ATPase involved in DNA replication and repair	XP_002166707.1	<i>Hydra magnipapillata</i>	2	1	-	-	109,034		Sí
DNA polymerase accessory subunit	AAC47536.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	1,4	1	-	-	41,05		
Maquinaria del proteasoma(3)									
ubiquitin C	NP_066289.2	<i>Homo sapiens</i>	68	3	-	-	77,04		
polyubiquitin (WubiG)	ABU40645.1	<i>Triticum aestivum</i>	58	2	-	-	42,55		
COP9 signalosome complex subunit	XP_002423731.1	<i>Pediculus humanus corporis</i>	50	2	-	-	36,13		
Transportadores (3)									
vitellogenin *	BAH02666.2	<i>Ornithodoros moubata</i>	267	9	-	-	205,06	Sí	Sí
ferritin	AAC19132.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	2	1	-	-	19,96		
Sugar phosphate exchanger 2	XP_003493559.1	<i>Bombus impatiens</i>	1,4	1	-	-	56,75		12 TMH
Transcripción (2)									
Insulin protein enhancer protein	XP_002575133.1	<i>Schistosoma mansoni</i>	65	2	-	-	43,83		Sí
isoform CRA_b (DNA integrase)	EAW82317.1	<i>Homo sapiens</i>	1,4	1	-	-	61,82		
Destoxificación (1)									
nicotinate phosphoribosyltransferase	XP_623279.1	<i>Apis mellifera</i>	50	2	-	-	62,17		
Matriz extracelular y adhesión (1)									
opioid-binding protein/cell adhesion molecule	XP_003398771.1	<i>Bombus terrestris</i>	1,7	1	-	-	36,31	Sí	GPI ²⁹⁹
Maquinaria de exportación nuclear (1)									
nucleoporin Nup37, putative	XP_002404500.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	3	-	-	35,72		Sí
Conservadas de función desconocida (17)									
zinc finger protein	NP_001037823.1	<i>Ciona intestinalis</i>	66	3	-	-	146,32		Sí
WD repeat domain 33 (WDR33)	XP_001504985.1	<i>Equus caballus</i>	61	2	-	-	145,15		Sí
conserved hypothetical protein	XP_002408103.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	3	-	-	56,93		Sí
coiled-coil domain containing 55	XP_868363.2	<i>Canis lupus familiaris</i>	58	6	-	-	66,04		Sí

hypothetical protein	XP_002416462.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	3	-	-	8,80		
conserved hypothetical protein	XP_002407001.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	3	-	-	24,12	Sí	
hypothetical protein	XP_002415025.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	3	-	-	16,23		1 TMH
hypothetical protein	XP_002434131.1	<i>Ixodes scapularis</i>	53	3	-	-	13,04	Sí	
conserved hypothetical protein	XP_002409499.1	<i>Ixodes scapularis</i>	53	3	-	-	33,09		
hypothetical protein	XP_002405948.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	3	-	-	7,39		
conserved hypothetical protein	XP_002406615.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	2	-	-	91,12		
conserved hypothetical protein	XP_002404459.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	2	-	-	34,84		
membrane protein, putative	XP_002408075.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	6	-	-	26,35	Sí	2 TMH
hypothetical protein	XP_002403222.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	3	0,11	1,50	11,60		2 TMH
conserved hypothetical protein	XP_001862194.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1,75	1	-	-	128,08	Sí	
hypothetical protein AaeL_AAEL013784	XP_001657022.1	<i>Aedes aegypti</i>	1,72	1	-	-	66,21		1 TMH
RWD domain-containing protein 1	ACQ58081.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	1,71	1	-	-	27,84		

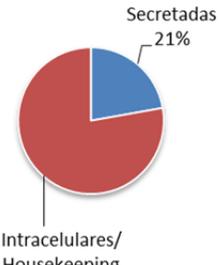
DEL HOSPEDADOR (2)

alpha-hemoglobin	B8K132	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	9,12	5	-	-	15,61		Sí
beta-hemoglobin	K03256.1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	6,72	3	-	-	16,13		Sí

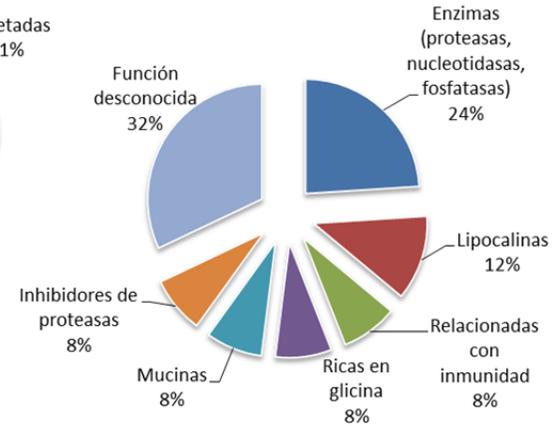
Figura 11 (en la página siguiente). Proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos, clasificadas como secretadas o intracelulares/housekeeping y, dentro de éstas, en grupos según su función y/o familia proteica. En los gráficos correspondientes se indica el porcentaje de proteínas de cada grupo con respecto al número total de proteínas incluidas en cada categoría (entre paréntesis).



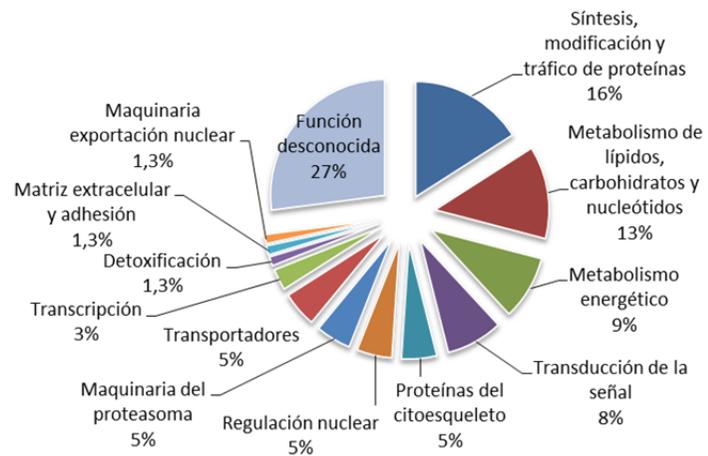
Hembras (117)



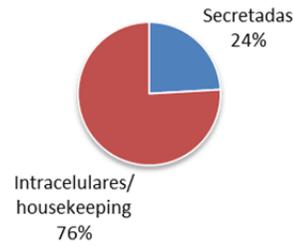
Secretadas (25)



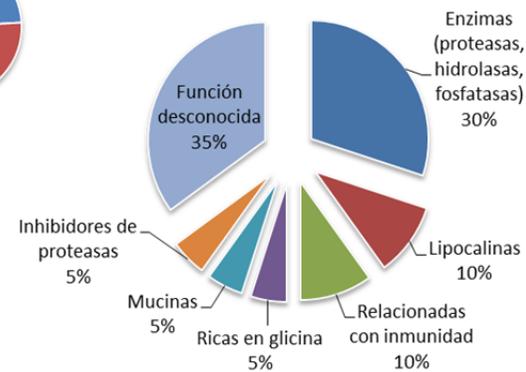
Intracelulares/Housekeeping (63)



Machos (83)



Secretadas (20)



Como se puede observar en las tablas 4 y 5, y en la figura 11, para ambos sexos, menos del 25 % de las proteínas identificadas en la saliva se clasificaron como secretadas, mientras que las restantes (más del 75 %) lo hicieron como intracelulares/housekeeping. El análisis con la herramienta SecretomeP indicó que al menos una tercera parte de estas proteínas intracelulares podrían ser secretadas por vías distintas de las clásicas. Para los dos tercios de proteínas restantes las herramientas bioinformáticas utilizadas no predijeron vías de secreción, a pesar de que todas ellas se encontraron en un fluido secretado como es la saliva.

En relación con la función de las proteínas, **entre las secretadas**, el grupo más numeroso fueron las proteínas de función desconocida (32 % en hembras y 35 % en machos). Las proteínas restantes se distribuyeron en seis grupos funcionales; estos grupos fueron los mismos en los dos sexos y contenían un número similar de proteínas. Los grupos más numerosos fueron las enzimas (24-30 %) y las lipocalinas (10-12 %), seguidos por las proteínas relacionadas con la inmunidad, las proteínas ricas en glicina, las mucinas y, finalmente, los inhibidores de proteasas.

Entre las proteínas incluidas **en la categoría de intracelulares/housekeeping**, el grupo más numeroso en ambos sexos fue también el de las proteínas de función desconocida (19 % en hembras y 27 % en machos). El resto se distribuyeron en 11-12 grupos, los mismos en ambos sexos excepto uno, el denominado de exportación nuclear, que sólo se encontró en machos. Los grupos más numerosos en hembras fueron los de proteínas implicadas en la transducción de la señal (15 %), regulación nuclear (14 %), síntesis de proteínas (11 %) y transportadores (11 %), mientras que los más numerosos en machos fueron los de proteínas que participan en la síntesis proteica (16 %), el metabolismo (13 %), el metabolismo energético (9 %) y la transducción de la señal (8 %). Las proteínas del citoesqueleto fueron el siguiente grupo más numeroso en ambos sexos (5,4 % en hembras y 5 % en machos), siendo la actina la única proteína de este grupo compartida por hembras y machos. El resto de grupos, seis en hembras y siete en machos, sumaron el 25 y 22 % respectivamente, conteniendo sólo una proteína compartida por ambos sexos, el "RNA-binding protein musashi". Además de las proteínas anteriores, también se identificaron tres proteínas de la sangre del hospedador: albúmina en hembras y las cadenas α y β de la hemoglobina en machos. Estas proteínas se han incluido en las tablas 4 y 5 en un grupo aparte, bajo el epígrafe "del hospedador", pero no se han contabilizado en la figura 11.

2.3.3. Abundancia relativa de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de *O. moubata*.

Para esta cuantificación se utilizaron los valores de emPAI proporcionados por el algoritmo Mascot.

El valor de emPAI de una proteína es directamente proporcional a su abundancia en la muestra, por lo que asumimos que las proteínas identificadas en las muestras de saliva nativa a las que el algoritmo no adjudicó un valor de emPAI eran muy minoritarias y, lógicamente, no pudieron incluirse en el cálculo. Tampoco se incluyeron en este cálculo a las proteínas identificadas solamente en las muestras de saliva ecualizada (con o sin valor de emPAI), asumiendo asimismo que eran muy poco abundantes en la muestra nativa.

Para cada proteína incluida en el cómputo se calculó el porcentaje de emPAI (% emPAI) dividiendo el valor de emPAI de esa proteína entre la suma de todos los valores de emPAI de las proteínas de esa muestra (hembras o machos) y multiplicándolo por 100.

De acuerdo con estos % emPAI (Figura 12) las proteínas más abundantes en la saliva de las hembras fueron las lipocalinas, que representaron el 100 % del emPAI contabilizado (Figura 12). Por el contrario, en la saliva de los machos, las proteínas más abundantes fueron las enzimas relacionadas con el metabolismo energético (55,5 %), seguidas de las lipocalinas (30,5 %).

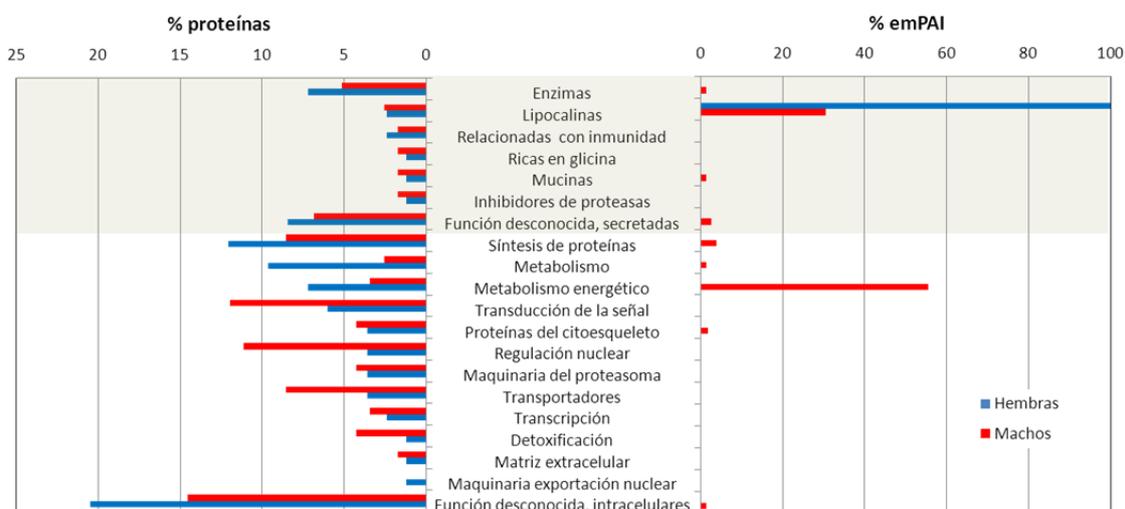


Figura 12. Proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de *O. moubata* clasificadas en grupos según las tablas 4 y 5. Sobre fondo gris se señalan las secretadas y sobre fondo blanco las clasificadas como intracelulares/housekeeping. En el cuadro de la izquierda se muestra el porcentaje de proteínas identificadas en cada grupo (número de proteínas identificadas en cada grupo dividido por el número total de proteínas identificadas en cada sexo y multiplicado por 100). En el cuadro de la derecha se muestra el porcentaje de emPAI de cada grupo como la suma de los porcentajes de emPAI de todas las proteínas de ese grupo.

2.4. Análisis proteómico “in-gel”. Separación de las proteínas mediante SDS-PAGE 1D, identificación por LC-MS/MS y cuantificación relativa de las proteínas identificadas.

Este análisis se hizo como complemento al análisis “off-gel” a fin de: (i) facilitar la identificación de proteínas minoritarias mediante su separación previa en bandas distintas en geles de poliacrilamida, (ii) adquirir información adicional acerca de la movilidad electroforética y tamaño molecular de las proteínas identificadas y (iii), cuantificar la abundancia de dichas proteínas mediante la medida de su señal fluorescente tras teñirlas con Sypro Ruby.

Muestras de saliva nativa (sin eculizar) de hembras y machos se separaron en geles SDS-PAGE 1D y se tiñeron con el colorante fluorescente Sypro Ruby. Estos geles se digitalizaron y analizaron con la aplicación Image Lab software (Bio-Rad), lo que nos permitió medir la

abundancia relativa de las distintas bandas detectadas: 13 en la muestra de hembras y 16 en la de machos. Posteriormente, estas 29 bandas se analizaron por LC-MS/MS para identificar a las proteínas presentes en ellas.

Los resultados de este análisis se recogen en la figura 13 y en las tablas 4 y 5.

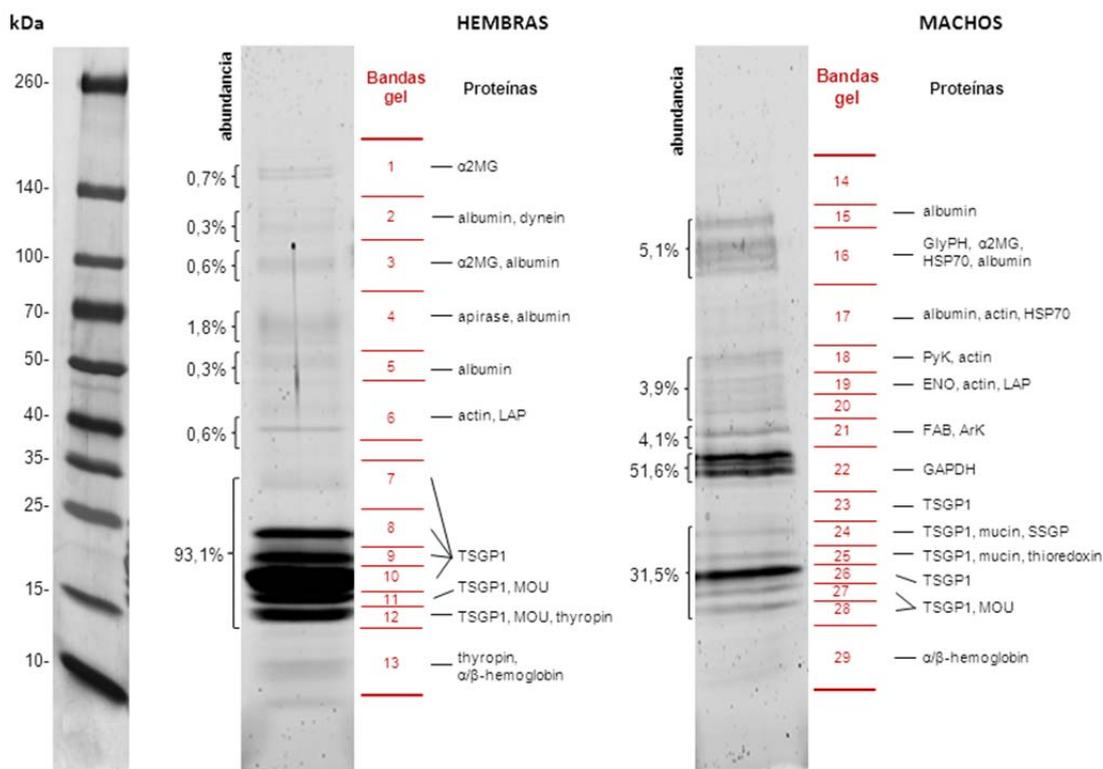


Figura 13. SDS-PAGE teñido con Sypro Ruby de muestras de saliva nativa de machos y hembras. La abundancia relativa (en %) de cada banda o grupo de bandas en las muestras se indica a la izquierda de cada carril. Los geles se cortaron en bandas según el patrón indicado en rojo y las proteínas identificadas en cada banda se anotaron a la derecha de la misma: **α2MG**, alfa-2-macroglobulin; **ArK**, arginine kinase; **ENO**, enolase; **FAB**, fructose 1,6-biphosphate aldolase; **GAPDH**, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; **HSP70**, heat sock protein 70; **LAP**, lysosomal acid phosphatase; **MOU**, moubatin; **PyK**, pyruvate kinase; **SSGP**, secreted salivary gland peptide; **TSGP1**, tick salivary gland protein 1.

En las hembras se identificaron 8 proteínas del parásito y 3 del hospedador (albúmina y hemoglobina α y β). Las 8 proteínas del parásito habían sido ya identificadas en el análisis “off-gel” (Tabla 4): TSGP1, moubatina, actina y dineina en muestras de saliva nativa; α2-macroglobulina, apirasa, thiropina y fosfatasa lisosomal en la saliva ecualizada.

En los machos se identificaron 15 proteínas del parásito y tres del hospedador (albúmina y hemoglobina α y β). Todas las del parásito ya habían sido identificadas en el análisis “off-gel” de la saliva nativa (Tabla 5).

Por tanto, este análisis no aportó nuevas identificaciones pero confirmó las diferencias de composición entre sexos, ya que solo 5 proteínas fueron identificadas simultáneamente en hembras y machos (TSGP1, moubatina, actina, α 2-macroglobulina, fosfatasa lisosomal y actina).

El análisis de la abundancia relativa de las bandas dio resultados similares a los obtenidos mediante la cuantificación relativa basada en el % emPAI. Como se observa en la figura 13, las bandas que contienen lipocalinas representaron hasta el 93,1 % de la masa de proteínas en la saliva de las hembras, mientras que en los machos, las bandas más abundantes fueron aquellas que contenían enzimas involucradas en el metabolismo energético (51,6 %), seguido de las bandas correspondientes a las lipocalinas (31,5 %).

2.5. Detección de actina y enolasa en la saliva de *O. moubata* mediante western blot.

Este experimento se realizó con el fin de confirmar los resultados del análisis proteómico, que señalaban la presencia de actina en la saliva de ambos sexos y de enolasa únicamente en la saliva de los machos.

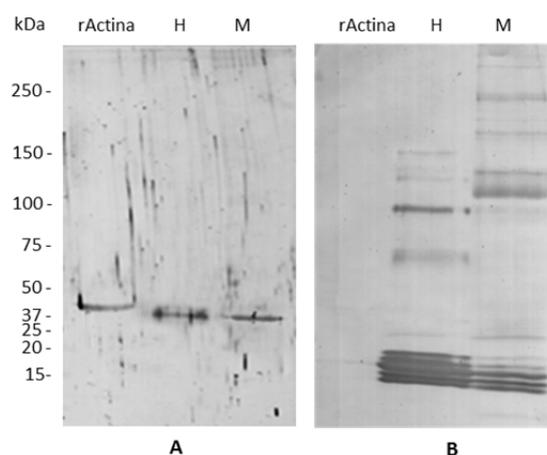


Figura 14. Western blot. Membranas de nitrocelulosa con actina recombinante (rActina) y con saliva nativa de hembras (H) y machos (M) incubadas con: **(A)** suero hiperinmune frente a rActina obtenido en conejo y **(B)** una mezcla de sueros de cerdos sensibilizados frente a saliva de *O. moubata* por infestación natural.

Como se observa en la figura 14A, el suero hiperinmune frente a actina recombinante obtenido en conejo reconoció a la actina recombinante y a la actina nativa, tanto en la saliva de hembras como en la de machos. El tamaño ligeramente superior de la actina recombinante puede atribuirse a la cola de histidina proporcionada por el vector de expresión (pQE-30).

Por el contrario, la mezcla de sueros porcinos anti-*O. moubata*, obtenidos mediante infestación natural de cerdos en trabajos previos, no reconoció ni a la actina recombinante ni a la actina nativa de la saliva, mientras que sí reconoció a las proteínas antigénicas presentes en la saliva (Figura 14B). Esta figura también muestra notables diferencias en el patrón de bandas

antigénicas entre sexos, reforzando los resultados del análisis proteómico. En conjunto, estos resultados confirman la presencia de actina en la saliva de ambos sexos y, además, muestran que esta proteína no es inmunogénica en los contactos naturales cerdo-parásito.

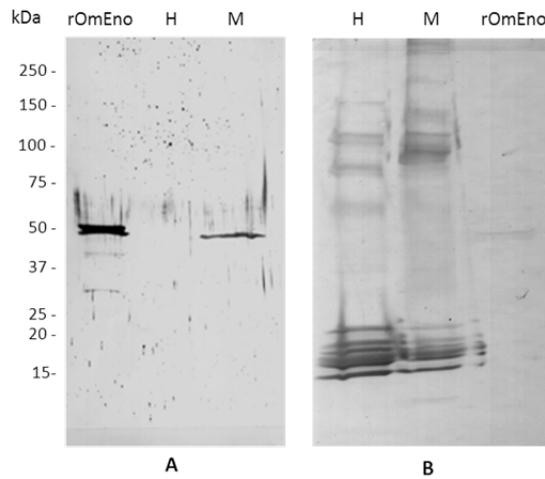


Figura 15. Western blot. Membranas de nitrocelulosa con enolasa recombinante (rOmEno) y con saliva nativa de hembras (H) y machos (M) incubadas con: **(A)** suero hiperinmune frente a rOmEno obtenido en conejo y **(B)** una mezcla de sueros de cerdos sensibilizados frente a saliva de *O. moubata* por infestación natural.

En relación con la enolasa, la figura 15A muestra que el suero hiperinmune anti-enolasa recombinante, obtenido en conejo, reconoce la enolasa recombinante y la banda correspondiente a la enolasa nativa en la saliva de machos, pero no en la de hembras. Como ocurría con la actina, el tamaño ligeramente superior de la proteína recombinante puede atribuirse a la cola de histidina. Por su parte, la mezcla de sueros porcinos anti-*O. moubata* (Figura 15B) no reconoció ni la enolasa recombinante ni la nativa, aunque sí reconoció a las proteínas antigénicas de la saliva, las mismas que en la figura 14. Estos resultados confirman la presencia de enolasa sólo en la saliva de los machos y revelan que dicha enolasa no es inmunogénica en los contactos naturales.

OBJETIVO 3.**CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENOLASA SALIVAL DE *O. MOUBATA*.****3.1. Secuencia codificante (cDNA) y aminoacídica de la enolasa de *O. moubata*.**

La amplificación mediante RT-PCR del cDNA codificante completo de la enolasa de *O. moubata* produjo una molécula de 1302 nucleótidos que fue depositada en la base de datos GenBank con número de acceso GU594041.1.

Este cDNA codifica una proteína de 433 aa, con un peso molecular y punto isoeléctrico teóricos de 46,9 kDa y 6,65, respectivamente. La secuencia de la proteína tiene un 9,5 % de residuos de lisina y no contiene péptido señal, hélices transmembrana, ni sitios de anclaje tipo GPI.

A

```

1  ATGCCTATCACGAAGATTAATGCACGTCAAATTTTTGACAGCAGGGGAAACCCAACCTGTC
61  GAGGTGGACCTGACCACCGATAAAGGTGTTTTTCGTGCCGCGGTGCC'TTCGGGAGCATCG
121 ACTGGAATCCACGAAGCTTTGGAATTGCGTGATGGTGACAAGACGAAGTACATGGGCAAG
181 TCTGTCTTCAAGGCAGTAGACAACATCAACAAAAGTTATTACGCCTGCGCTGATACCAAAG
241 AAATTTGACGTTGCGGATCAGACCGCAATTGATGAGTTCATAATTTCCCTTGATGGAAC
301 GAGAACAAAAGCAAGTTGGGTGCCAATGCTGTCC'TTGGAGTGTCCATGGCAGTTTGCAA
361 GCTGGTGCTGCTCAGAAGGGTGTTCCTTTACCAGCACATGCTGATCTCTCTGGCAAC
421 CACAAGATTCTCTGCTGCTGCTGCTTTAACGTCATCAACGGTGGCAGCCATGCAGGG
481 AATAAGCTGGCCGTCAGGAATTCATGATCTTGCCGACTGGTGTACAAC'TTTCACAGAG
541 GCGATGAAGATGGGATCAGAGACATACCACCATCTCAAGAATGTAATCAAAAAGAGATTC
601 GGACTGGATGCCACTGCCGTCGGTGATGAGGGAGGCTTTGCTCCAAACATCAAGGACAAC
661 AAAGAGGGCCTTGAGCTTATTGTGGAGGCCATTAAAGAAGCCGGATACACTGGGAAGATA
721 GAAATTGGAATGGATGTTGCTGCCTCTGAGTTCACAAAAATGGAAAGTACGACCTGGAC
781 TTCAAGAACCCGAAGTCTGAAGAGAAAAGATCATGTCGATCAGGCTGCTCTGCAAGCCATT
841 TATGAAGTTTTATCAAGGATTATCCCATTTGTGTCCATTGAAGATCCCTTTGAGCAGGAC
901 CACTGGGATGCATGGACCAAATTC AACGCTACGGCTAAGATTCAGATCGTTGGTGATGAC
961 CTGACTGTGACCAACCCGAAGAGGATACAGACTGCAATTGATAAAAAAGCCTGTAACCTGT
1021 TTGCTTCTGAAAGTGAACCAGATTGGCAGCGTTACTGAGGCAATCAGAGCTCACCAGCTT
1081 GCCAAGAAGAATGGCTGGGGTACAAATGGTGTCCACCAGCAGCGGAGAGACTGAAGATTGC
1141 ACCATTGCAGACATTTGTCGTAGGCC'TGGGCACTGGACAAATTAAGACTGGAGCACCTTGC
1201 CGCTCTGAGCGTCTGGCCAAGCACAACCAGCTGCTTCGTATTGAGGAAGAACTCGGCAGC
1261 AAAGCAGTCTTTGCAGGGAAGAA'TTTCAGACACCCCGCTTAA

```

B

```

1  MPITKINARQIFDSRGNPTVEVDLTTDKGVFRAAVPSGASTGIHEALELRDGDKTKYMGK
61  SVFKAVDNINKVITPALIPKKFDVADQTAIDEFIISLDGTENKSKLGANAVLGVSMVAVCK
121 AGAAQKGVPLYQHIAIDLSGNHKILLPVPFNVINGGSHAGNKLAVQEFMILPTGATTFTE
181 AMKMGSETYHHLKNVIKKRFGLDATAVGEDEGGFAPNIKDNKEGLELIVEAIKEAGYTGI
241 EIGMDVAASEFYKNGKYDLDFKNPKSEKDHVDQAALQAIYEGFIKDYPIVSIEDPFEQD
301 HWDATKFNATAKIQIVGDDLTVTNPKRITQTAIDKKACNCLLLKVNQIGSVTEAIRAHL
361 AKKNGWGTMVSHRSGETEDCTIADIVVGLGTGQIKTGAPCRSERLAKHNQLLRIEEELGS
421 KAVFAGKNFRHPA

```

Figura 16. (A) Secuencia codificante completa del cDNA de enolasa de *O. moubata* desde el codón de inicio hasta el de terminación. **(B)** Secuencia de aminoácidos de la proteína OmEnolasa.

3.2. Análisis filogenético de la proteína OmEnolasa.

La secuencia peptídica obtenida tras la traducción *in silico* se utilizó para la búsqueda de ortólogos en la base de datos NCBI nr mediante un análisis BLAST. Las secuencias obtenidas pertenecían a una gran variedad de especies, desde garrapatas a humanos, todas ellas con un valor de E igual a cero.

Entre estas secuencias, seleccionamos y alineamos con la de *O. moubata* (GU594041.1) a las enolasas de varios artrópodos hematófagos, en concreto: 2 garrapatas duras, *Amblyomma maculatum* (AEO34612.1) e *I. scapularis* (XP_002408379.1); 3 mosquitos, *Aedes aegypti* (XP_001653750.1), *Culex quinquefasciatus* (XP_001842618.1) y *Anopheles gambiae* (XP_317672.2); 1 flebotomo, *Lutzomyia longipalpis* (ABV60328.1); 1 mosca tsé-tsé, *Glossina morsitans* (ADD19380.1) y 1 piojo, *Pediculus humanus corporis* (XP_002430191.1). Como grupo externo se incluyó en el alineamiento a la enolasa humana (BAD96912.1) (Figura 17).

Ornithodoros_moubata	MPITKINARQIFDSRGNPTVEVDLTTDKGVFRAAVPSGASTGIHEALELR	50
Amblyomma_maculatum	MPIKRIYARQIFDSRGNPTVEVDLLTEKGLFRAAVPSGASTGIHEALELR	50
Ixodes_scapularis	MPITKIFARQIFDSRGNPTVEVDLTTTEKGLFRAAVPSGASTGIHEALELR	50
Aedes_aegypti	MPFKSIKARQIFDSRGNPTVEVDLVTDLGLFRAAVPSGASTGVHEALELR	50
Culex_quinquefasciatus	MPFKSIKARQIFDSRGNPTVEVDLITDLGLFRAAVPSGASTGVHEALELR	50
Anopheles_gambiae	MPFKSIKARQIFDSRGNPTVEVDLVTDLGLFRAAVPSGASTGVHEALELR	50
Lutzomyia_longipalpis	MVIQKIVARQIFDSRGNPTVEVDLTTNLGMFRAAVPSGASTGVHEALELR	50
Glossina_morsitans	MPIKSIHARQIFDSRGNPTVEVDLSTELGLFRAAVPSGASTGVHEALELR	50
Pediculus_humanus	MGLKSIQARQIFDSRGNPTVEVDLTTDKGLFRAAVPSGASTGIYEALELR	50
Homo_sapiens	MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELR	50
	* : * ** :***** * . * :***** :*****	
Ornithodoros_moubata	DGDKTKYMGKSVFKAVDNINKVITPALIPKKFDVADQTAIDEFIIISLDGT	100
Amblyomma_maculatum	DGDKSKYMGKGVSKAVNNVQVIGPQLIGKGFVDVTDQTKIDEFMLELDGT	100
Ixodes_scapularis	DGDKSMYHGKSVFKAVDNVNVKVIAPQLIAKNFDVREQFQIDEFMIELDGT	100
Aedes_aegypti	DNVKADWHGKGVKAVENINKTIAPAVLNSGLCVTQQKELDELMLKLDGT	100
Culex_quinquefasciatus	DEVKADWHGKGVKAVENINKSIAPAVMASGLCVTQQKEIDELMLKLDGT	100
Anopheles_gambiae	DNEKANWHGKGVKAVENINKIIAPAVLSSNLCVTTQQKELDELMLKLDGT	100
Lutzomyia_longipalpis	DNDKNNYHGKGVKAVENINKIIAPEVLIKSGICVTAQEDMDFMLKLDGT	100
Glossina_morsitans	DKEKNNYHGKSVLKAVCHVNEIIGPELIKANLEVTEQEKIDEFMIKLDGT	100
Pediculus_humanus	DNDKTQYHGKSVSKAVNNINNI IAPPELLKQNF DATQQKEIDEFMIKLDGT	100
Homo_sapiens	DNDKTRYMGKGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLNVTQEKIDKLMIEMDGT	100
	* * : **.* *** :*: * * : : . * :*:*:*:***	
Ornithodoros_moubata	ENKSKLGANAVLGVSMVAVCKAGAAQKGVPLYQHIAADLSGNHKILLPVPFAF	150
Amblyomma_maculatum	ENKGNLGANAILGVSLAVCKAGAAQKGVPLYRHIADLAGNSKVMPVPFAF	150
Ixodes_scapularis	ENKGNLGANAILGVSLAVCRAGAAQKGVVRYRHIADLAGNSKVIILPVPFAF	150
Aedes_aegypti	ENKSKLGANAILGVSLAVCKAGAAKKGIPLYKHIAELSGNGNIIILPVPFAF	150
Culex_quinquefasciatus	ENKSKLGANAILGVSLAVCKAGAAKKGIPLYKHIAELSGNGDIILPVPFAF	150
Anopheles_gambiae	ENKSKLGANAILGVSLAICKAGAAKGVPLYKHIAADLAGNGNIIILPVPFAF	150
Lutzomyia_longipalpis	ENKSKFGANAILGVSLAVCKAGAAKGVPLYQHIANLAGNPNIILPVPFAF	150
Glossina_morsitans	ENKSKYGANAILGISLAVCKAGAAKGNLPLYKHIANLASKIDIIILPVPFAF	150
Pediculus_humanus	DNKSKLGANAILGVSLAVCKAGAAEKGVSLYRHIANLAGNDNIVLPTPAF	150
Homo_sapiens	ENKSKFGANAILGVSLAVCKAGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPFAF	150
	:**.: *****:***:***. :*.:*****: . . :*:***	
Ornithodoros_moubata	NVINGGSHAGNKLAVQEFMILPTGATTFTEAMKMGSEYHHLKKNVIKKRF	200
Amblyomma_maculatum	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTEAMRIGSEVYHHLKSNVIKQKF	200
Ixodes_scapularis	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFSEAMRMGSEVYHHLKKNVIKKR-	199
Aedes_aegypti	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTEAMKIGSEVYHHLKKNVIKAKF	200
Culex_quinquefasciatus	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTEAMKIGTEVYHHLKKNVIKAKF	200
Anopheles_gambiae	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTEAMKIGSEVYHHLKKNVIKAKF	200
Lutzomyia_longipalpis	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGATSFTTEAMKIGSEVYHHLKKNVINNKF	200
Glossina_morsitans	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGASSFTEAMKMGSEVYHHLKKNVINDKF	200

Pediculus_humanus	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGATSFTEAMRMGSEVYHHLKVKVIHAKF	200
Homo_sapiens	NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFREAMRIGAEVYHNLKNVIKERY *****:*****.**:.* **:::*.**:*.*: : *	200
Ornithodoros_moubata	GLDATAVGD EGGFAPNI KDNKEGLELIVEAIKEAGYTGKIEIGMDVAASE	250
Amblyomma_maculatum	GLDATAVGD EGGFAPNI LDNKEALELIKEAISKAGYEGKVEIGMDVAASE	250
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	GLDATAVGD EGGFAPNI LENKEALNLIQDAIAKAGYTGKVEIGMDVAASE	250
Culex_quinquefasciatus	GLDATAVGD EGGFAPNI LENKEALNLIQDAIAKAGYTGKVEIGMDVAASE	250
Anopheles_gambiae	GLDATAVGD EGGFAPNI LENKEALNLIQDAIAKAGYTGKVEIGMDVAASE	250
Lutzomyia_longipalpis	GLDATAVGD EGGFAPNI LNNKDALFLIQDAIAKAGYTGKVEIGMDVAASE	250
Glossina_morsitans	GLDATAVGD EGGFAPNI QSNKEALCLIKDAIELGGYTGKIEIGMDVAASE	250
Pediculus_humanus	GLDATAVGD EGGFAPNI LNNKEALLITEAISKAGYEGKIDIGMDVAASE	250
Homo_sapiens	GKDATNVGD EGGFAPNI LENKEGLELLKTAIGKAGYTDKVVIGMDVAASE * ** * ***** .*:.* *: ** .* *: *****	250
Ornithodoros_moubata	FYKNGKYDLDFKNPKSEKDHVDQAALQAIYEGFIKDYPIVSI EDPF EQD	300
Amblyomma_maculatum	FYKDGKYDLDFKNPNSDPNSYLSREQLKEVYEDYIRSYPIVSI EDPF EQD	300
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	FHKDGKYDLDFKNPNSDKSAWLTPDALEGMYQGF IKDFPIVSI EDPFDQD	300
Culex_quinquefasciatus	FHKDGKYDLDFKNPKSDKSAWLS PDSELEMYQGF IKDFPIVSIEDPFDQD	300
Anopheles_gambiae	FHKEGKYDLDFKNPKSDPSAWLTPDALEQMYQGF IKDFPIVSI EDPFDQD	300
Lutzomyia_longipalpis	FHKDGLYDLDFKNPNSDKSLWLS PKLTEL YMEFVKEFPITSI EDPFD QD	300
Glossina_morsitans	FFKDGQYDLDFKNPSSDKSKWLS PEKLLGLYQ EFINEFPVSI EDAFD QD	300
Pediculus_humanus	FYKNELYNLDFKNPNYDKSQCIDY EKLT ELYMEFLKEFPVSI EDPFD QD	300
Homo_sapiens	FFRS GKYDLDFKSPD -DPSRYISPDQLADLYKSF IKDY PVVSIE DPFD QD *.:. * :*****.* : . : * :* :.:.*:*****.*:**	299
Ornithodoros_moubata	HWD AWTKFN ATAKIQIVGDDLTVTNPKRIQT AIDK KACN LLKVNQIGS	350
Amblyomma_maculatum	DWD AWTALNTAT QIQIVGDDLTVTNPKRIQT AVDK NACN LLKVNQIGS	350
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	HWD AWAKMT ANTSIQIVGDDLTVTNPKRI ATAVEK KACN LLKVNQIGT	350
Culex_quinquefasciatus	HWD AWAKIT ANTTIQIVGDDLTVTNPKRI ATAVEK KACN LLKVNQIGS	350
Anopheles_gambiae	HWD AWSKIT ANTTIQIVGDDLTVTNPKRI ATAVEK KACN LLKVNQIGS	350
Lutzomyia_longipalpis	HWD AWSKMT AGTNIQIVGDDLTVTNPKRI ATAVEK KACN LLKVNQIGT	350
Glossina_morsitans	HWD AWSTIT ANTTKIQIVGDDLTVTNPKRI QTAVEK KACN LLKVNQIGT	350
Pediculus_humanus	HWQ AWSNIT SKANIQIVGDDLTVTNPKRI EMAVK NACN LLKVNQIGT	350
Homo_sapiens	DWG AWQKFT ASAGIQVVGDDLTVTNPKRI AKAVNEK S CNLLKVNQIGS .* ** :.: : ** :***** ***** *.:.:***** *****:	349
Ornithodoros_moubata	VTE AI RAHQ LAKKNG WGTMVSHRSGETEDCTI ADIV VGLGTGQIK TGAPC	400
Amblyomma_maculatum	VTE S IRA HQ LAKKNGWGTMVSHRSGETEDSTI ADIV VGLSTGQIK TGAPC	400
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	VTE S INA HLLAKKNG WGTMVSHRSGETEDTFI ADLV VGLSTGQIK TGAPC	400
Culex_quinquefasciatus	VTE S INA HLLAKKNG WGTMVSHRSGETEDTFI ADLV VGLSTGQIK TGAPC	400
Anopheles_gambiae	VTE S INA HLLAKKNG WGTMVSHRSGETEDTFI ADLV VGLSTGQIK TGAPC	400
Lutzomyia_longipalpis	VTE S IK AHNLAKS NGWGTMVSHRSGETEDTFI ADLV VGLSTGQIK TGAPC	400
Glossina_morsitans	VTE S IK AHLLARE NGWGTMVSHRSGETEDSFI ADLV VGLSTGQIK TGAPC	400
Pediculus_humanus	VTE S IK AHLLAKS NGWGTMVSHRSGETEDSFI ADLV VGLGTGQIK TGAPC	400
Homo_sapiens	VTE S LQ ACKLAQ ANGWGMVSHRSGETEDTFI ADLV VGLCTGQIK TGAPC ***:.* ** :***.***** ***** **:* ** *****	399
		% Identidad
Ornithodoros_moubata	RSERLAKHNQLLRIEELGSKAVFAGKNFRHPA---	433
Amblyomma_maculatum	RSERLCKYNQLLRIEEQLGGNAVYAGKNFRQPL---	433
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	RSERLAKYNQILRIEELGSDAKFAGKNFRHPQ---	433
Culex_quinquefasciatus	RSERLAKYNQILRIEELGSGAKFAGKFRHPQ---	433
Anopheles_gambiae	RSERLAKYNQILRIEELGAGAKFAGKSFRHPQ---	433
Lutzomyia_longipalpis	RSERLAKYNQILRIEELGAGAKFAGKSFRKPKQ---	433
Glossina_morsitans	RSERLAKYNQILRIEELGSTAKYAGKNFRSPLSPK	436
Pediculus_humanus	RSERLAKYNQILRIEELGPNAKYAGKNFRNP----	432
Homo_sapiens	RSERLAKYNQLLRIEELGSKAKFAGRNFRNPLAK-	434
	*****.*:***:*****:* ** :***.* ** *	

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de enolasa de *O. moubata* (GU594041.1), *A. maculatum* (AEO34612.1), *I. scapularis* (XP_002408379.1), *A. aegypti* (XP_001653750.1), *C. quinquefasciatus* (XP_001842618.1), *A. gambiae* (XP_317672.2), *L. longipalpis* (ABV60328.1), *G. morsitans* (ADD19380.1), *P. humanus corporis* (XP_002430191.1) y *Homo sapiens* (BAD96912.1). Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se han marcado con un asterisco, las sustituciones conservativas con dos puntos y las semi-conservativas con un punto. Los 4 residuos involucrados en la unión a metales se muestran en amarillo, los 14 que forman el dominio firma de la enolasa se han subrayado y los 7 que forman el motivo de unión al sustrato se han marcado en rojo. El motivo de asociación a la membrana se ha marcado con un recuadro. Por último, se muestra también el porcentaje de identidad de secuencia entre la enolasa de *O. moubata* y las enolasas del resto de organismos incluidos.

La enolasa de *O. moubata* mostró una identidad de secuencia del 80-82 % con las enolasas de garrapatas duras, entre un 74 y 77 % con las de los insectos, y un 73 % de identidad con la enolasa humana, lo que indica un alto grado de conservación. En la figura 17 se muestran también los siguientes dominios conservados en todas las secuencias: los cuatro aminoácidos involucrados en la unión a Mg^{2+} (S⁴⁰, D²⁵⁴, E²⁴⁹ y D³¹⁹), los siete aminoácidos que participan en la unión al sustrato (2-fosfoglicerato) (H¹⁵⁸, E²¹⁰, K³⁴⁴, HSR³⁷²⁻³⁷⁴ y K³⁹⁵) y los catorce aminoácidos que constituyen el dominio firma de la enolasa en la posición 341-354 (LLLKVNQIGSVTEA).

Por su parte, el filograma derivado del alineamiento anterior (Figura 18) muestra que las secuencias de las enolasas de estos organismos se agrupan en dos clados; el primero con las secuencias de las garrapatas blandas y duras (95 %) y el segundo con las de los insectos (98 %).

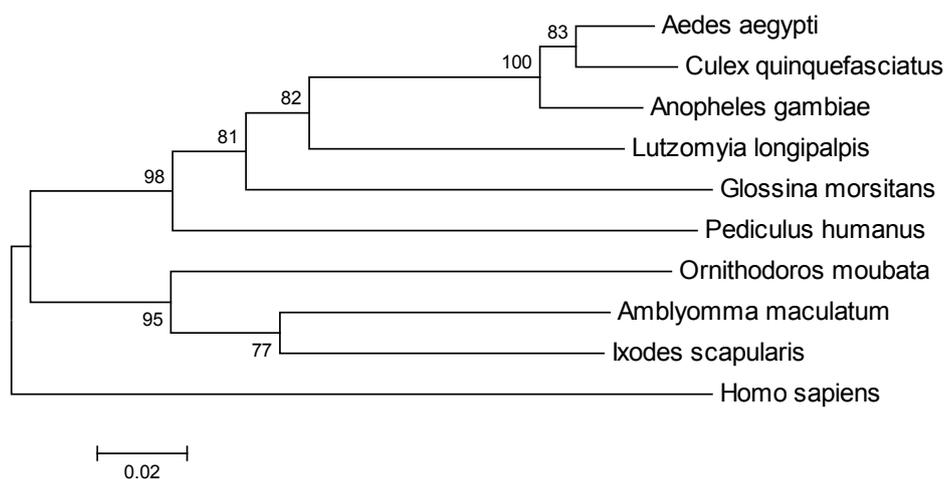


Figura 18. Filograma obtenido a partir del alineamiento múltiple de las 10 enolasas incluidas en la figura 17. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Poisson (10.000 bootstraps) y los números en los nodos indican el porcentaje de fiabilidad de las ramificaciones.

3.3. Expresión y purificación de rOmEno.

El cDNA de la enolasa de *O. moubata* se clonó en el vector de expresión pQE-30. En las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, la rOmEno se expresó al 100 % insoluble, por lo que antes de purificarla fue necesario solubilizarla incluyendo urea 8 M en el tampón de lisis, la cual fue retirada progresivamente durante el proceso de purificación.

Una vez purificada, la proteína recombinante (rOmEno) migró en los geles de poliacrilamida como una única banda de 48,3 kDa en concordancia con el peso molecular teórico estimado (48,9 kDa) para la proteína de fusión (rOmEno + His-tag).

El rendimiento final de la expresión y purificación de esta proteína fue de 5,4 mg/L de cultivo.

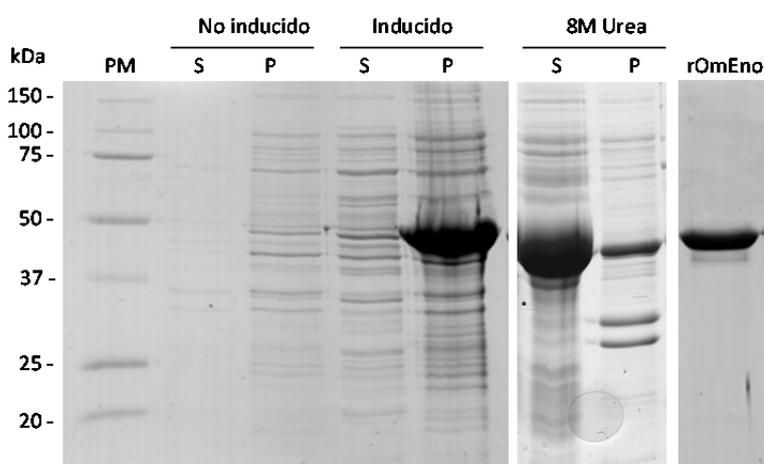


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de Coomassie. Se muestra el sobrenadante (S) y sedimento (P) del lisado celular antes y después de la inducción con IPTG, así como el sobrenadante y sedimento después de solubilizar la muestra con urea 8 M. rOmEno, proteína recombinante purificada. PM, marcador de pesos moleculares con valores expresados en kDa.

3.4. Análisis funcional de la enolasa.

3.4.1. Unión a plasminógeno.

En la figura 20 puede observarse que la rOmEno, la rOmEno tratada con DTT y la saliva unen plasminógeno humano y que dicha unión aumenta al elevar la concentración de plasminógeno en la mezcla de reacción, de forma similar a como lo hace la caseína, que se incluyó en este ensayo como control positivo.

Las proteínas control negativo no fijaron plasminógeno en absoluto (gelatina) o lo hicieron ligeramente (BSA y GGB), considerándose esta reactividad inespecífica.

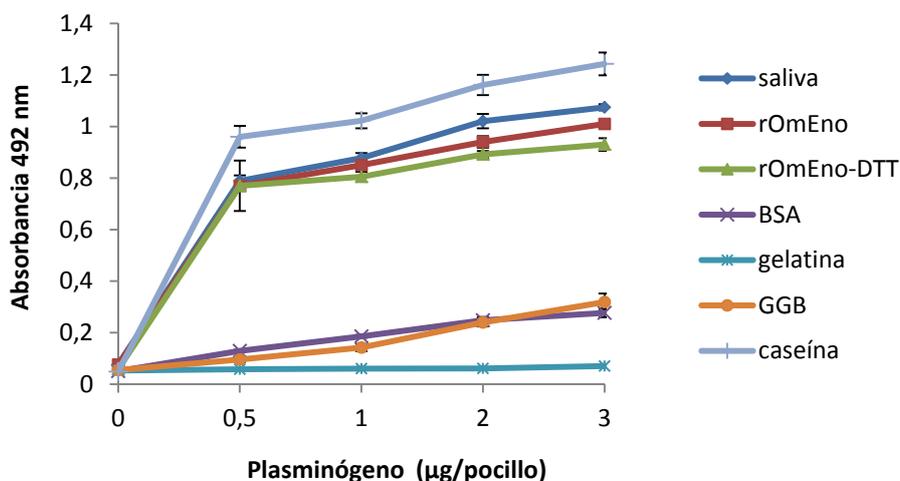


Figura 20. Unión de cantidades crecientes (0-3 µg/pocillo) de plasminógeno a: 2 µg/pocillo de saliva, 1 µg/pocillo de rOmEno, 1 µg/pocillo de rOmEno tratada con DTT y a 1 µg/pocillo de varias proteínas incluidas como control positivo (caseína) o negativo (BSA, gelatina, GGB). En cada punto se representa la media y el error estándar de un ensayo representativo (de un total de 3) con cuatro réplicas de cada condición.

La adición de 40 mM de ácido ϵ -aminocaproico (ϵ ACA) durante la incubación con plasminógeno redujo la unión de éste a la enolasa recombinante en un 71 % y a la saliva en un 46 %, mostrando que en dichas uniones intervienen los residuos de lisina de la proteína receptora (Figura 21).

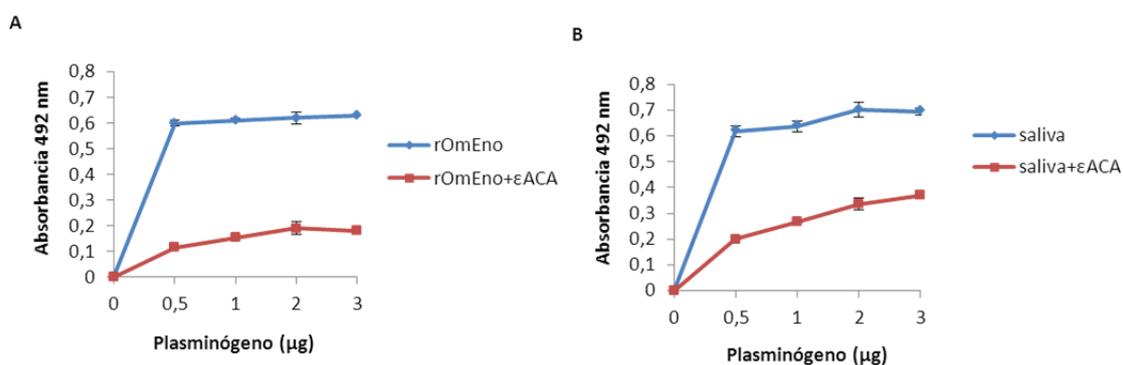


Figura 21. Ensayo de competición con el análogo de lisina (ϵ ACA) en el que se evidencia la participación de los residuos de lisina en la unión del plasminógeno a la enolasa recombinante (A) y a la saliva (B). Cantidades crecientes de plasminógeno (0-3 µg/pocillo) fueron incubadas en pocillos tapizados con 1 µg de rOmEno o 2 µg de saliva, en ausencia o en presencia de ϵ ACA (40 mM). Los datos mostrados representan la unión del plasminógeno a la rOmEno y la saliva tras restar los valores de absorbancia inespecífica de la BSA. En cada punto se representa la media y el error estándar de un ensayo representativo (de un total de 3) con cuatro réplicas de cada condición.

3.4.2. Activación del plasminógeno y generación de plasmina.

Para determinar si la enolasa salival de *O. moubata*, además de fijar plasminógeno, puede iniciar o potenciar su activación generando plasmina, se efectuaron dos tipos de ensayos en los que se midió la actividad amidolítica de la plasmina naciente sobre el sustrato cromogénico S2251.

El primero de los ensayos se realizó en fase líquida (Figura 22). En este experimento se observó una leve producción de plasmina en presencia de rOmEno o saliva de *O. moubata*. No obstante, estos resultados fueron muy variables y no resultaron significativos al compararlos con el control negativo (BSA).

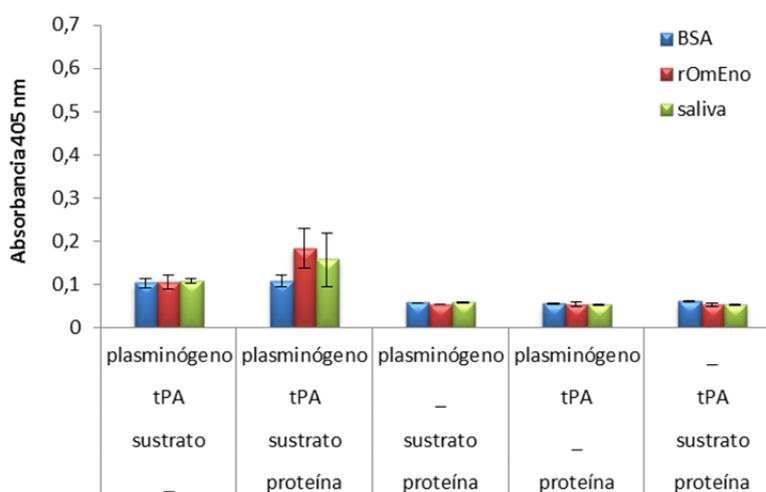


Figura 22. Ensayo de activación de plasminógeno en fase líquida. Cada barra representa la media y el error estándar de un ensayo representativo (de un total de 3) con cuatro réplicas de cada condición.

Como estos resultados no fueron concluyentes, se llevó a cabo un ensayo de activación de plasminógeno en fase sólida, esto es, fijando primero la rOmEno, la saliva y la BSA a la placa de 96 pocillos y posteriormente permitiendo la fijación del plasminógeno a dichas proteínas.

Como muestra la figura 23, el plasminógeno fijado sobre la rOmEno fue consistentemente transformado en plasmina activa cuando se añadía tPA, mientras que en ausencia de tPA no se generaba plasmina.

Los mismos resultados se obtuvieron al sustituir la enolasa recombinante por saliva. Por su parte, en los pocillos tapizados con BSA no se produjo en ningún caso la formación de plasmina activa.

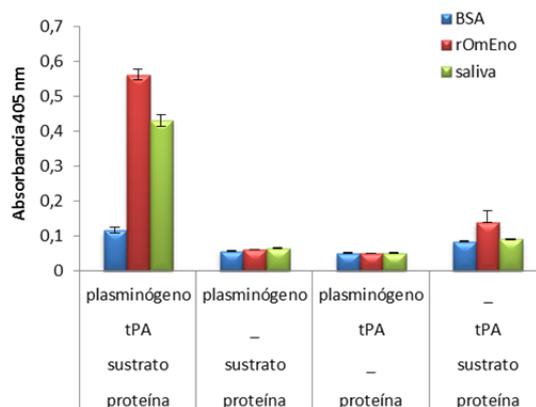


Figura 23. Ensayo de activación de plasminógeno en fase sólida. Cada barra representa la media y el error estándar de un ensayo representativo (de un total de 3) con cuatro réplicas de cada condición.

3.4.3. Unión de enolasa de *O. moubata* a P-selectina.

La capacidad de unión de la enolasa de *O. moubata* a P-selectina se analizó en dos ensayos paralelos: un ELISA y una inmunoprecipitación.

Los resultados del ELISA (Figura 24) muestran que aunque la saliva y el SGE de *O. moubata* sí fijan P-selectina humana, la rOmEno no fue capaz de hacerlo, comportándose de forma idéntica a la BSA, que se incluyó como control negativo.

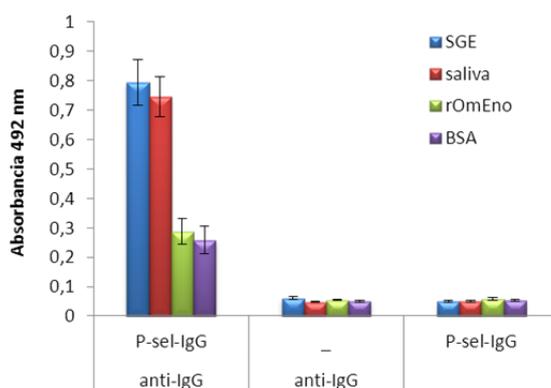


Figura 24. Ensayo de unión a P-selectina. Reactividad del SGE, la saliva, rOmEno y BSA en placa de 96 pocillos después de incubarlos con la quimera P-selectina/IgG humana y anti-IgG humana-peroxidasa. En las reacciones control negativo se omitió la quimera o el anticuerpo secundario. Las barras representan la media y el error estándar de cuatro réplicas de cada condición. El gráfico corresponde a un ensayo representativo de tres.

En cuanto a los resultados de la inmunoprecipitación, éstos mostraron que la proteína salival Om44 es capturada por la quimera P-selectina/IgG humana (Figura 25A), y también que esta proteína no es reconocida por el suero hiperinmune anti-rOmEno obtenido en conejo, a pesar de que este mismo suero sí reconoce tanto a la enolasa recombinante como a la enolasa nativa presente en la saliva y en el sobrenadante de la IP (Figura 25B). El correspondiente suero preinmune no reveló ninguna banda (datos no mostrados).

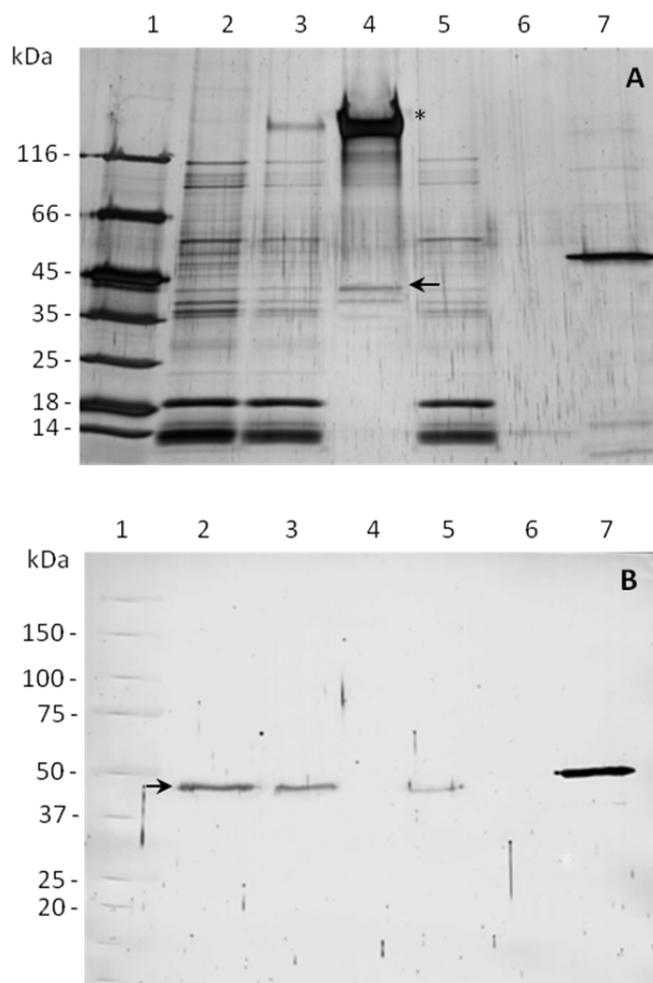


Figura 25. Ensayo de inmunoprecipitación con P-selectina. **(A)** SDS-PAGE 5-20 % teñido con azul de Coomassie. La flecha indica la proteína Om44 inmunoprecipitada y el asterisco la quimera P-selectina/IgG humana. **(B)** Western blot: antígenos reconocidos por el suero hiperinmune anti-rOmEno en los sobrenadantes y sedimentos de la IP. La flecha señala la enolasa nativa en la muestra de saliva. 1, marcador de pesos moleculares; 2, saliva de *O. moubata*; 3 y 4, sobrenadante y sedimento de la IP utilizando resina proteína G-sepharosa 4B sensibilizada con la quimera; 5 y 6, sobrenadante y sedimento de la IP, utilizando resina proteína G-sepharosa 4B sin sensibilizar con la quimera; 7, rOmEno.

3.4.4. Silenciamiento del gen de la enolasa mediante RNA interferente: niveles de mRNA de enolasa y fenotipo observado.

La inyección de dsRNA de enolasa en los ejemplares de *O. moubata* provocó una reducción significativa en los niveles de mRNA de enolasa (38 % en las hembras, 53 % en machos y 61 % en ninfas-5), cuando se compararon con los niveles de mRNA de enolasa en ejemplares similares inyectados con un dsRNA no relacionado (luciferasa) o con el tampón de inyección (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de reducción (media \pm error estándar) del nivel de mRNA de enolasa en ejemplares de *O. moubata* inyectados con dsRNA de enolasa respecto a ejemplares inyectados con dsRNA de luciferasa. El nivel de mRNA de enolasa se midió por qRT-PCR y se normalizó frente al mRNA de actina utilizando el método Ct comparativo.

Tratamiento	% de reducción en el nivel de mRNA de enolasa		
	Hembras	Machos	Ninfas-5
dsRNA de enolasa	38 \pm 14*	53 \pm 3,1*	61 \pm 1,3*

* $p < 0,05$

A los 6 días de la administración del dsRNA, los ejemplares de *O. moubata* se alimentaron sobre conejos midiéndose la cantidad de sangre ingerida, el número de huevos viables depositados por las hembras y las tasas de muda y de mortalidad (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del silenciamiento del gen de enolasa. Media \pm error estándar de los distintos parámetros medidos en hembras, machos y ninfas-5 inyectadas con tampón, dsRNA de luciferasa o dsRNA de enolasa y alimentadas en conejos 6 días después de la inyección. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de reducción en las garrapatas tratadas con dsRNA-enolasa con respecto a las tratadas con dsRNA-luciferasa.

Efecto fenotípico	Fase evolutiva	Tratamiento	Resultado
Sangre ingerida (mg)	Hembras	Tampón	199,4 \pm 22,7
		dsRNA-Luciferasa	203,5 \pm 24,9
		dsRNA-Enolasa	185,9 \pm 21,4 (8,6 %)
	Machos	Tampón	26,3 \pm 3,1
		dsRNA-Luciferasa	25,5 \pm 5,1
		dsRNA-Enolasa	20,7 \pm 3,6 (18,8 %)
	Ninfas-5	Tampón	58,4 \pm 9,4
		dsRNA-Luciferasa	58,9 \pm 9,8
		dsRNA-Enolasa	60,9 \pm 6,7
Nº de huevos/hembra	Hembras	Tampón	116,2 \pm 25,3
		dsRNA-Luciferasa	123,7 \pm 30,4
		dsRNA-Enolasa	95,9 \pm 26,9 (22,7 %)
% viabilidad	Huevos	Tampón	78,4 \pm 7,7
		dsRNA-Luciferasa	83,7 \pm 3,3
		dsRNA-Enolasa	42,5 \pm 9,7 (49,2 %)*

* $p < 0,05$ respecto al grupo tratado con dsRNA de luciferasa.

El tratamiento con dsRNA de enolasa redujo la cantidad de sangre ingerida por las hembras (8,6 %) y por los machos (18,8 %), aunque esta reducción no llegó a ser estadísticamente significativa. También redujo el número de huevos depositados por las hembras (22,7 %) y la viabilidad de los mismos (hasta el 49,2 %), alcanzando en este segundo parámetro significación estadística ($p < 0,05$) respecto al grupo tratado con dsRNA de luciferasa. Las garrapatas inyectadas con dsRNA de enolasa sobrevivieron y mudaron en igual medida que las inyectadas con tampón o dsRNA de luciferasa, lo que significa que el silenciamiento del gen de la enolasa no redujo la supervivencia de ninguna de estas fases evolutivas ni tampoco afectó a la tasa de muda de las ninfas-5

3.5. Capacidad protectora de la enolasa recombinante (rOmEno) frente a *O. moubata*.

Los sueros de los 3 animales vacunados con rOmEno presentaron altos títulos de IgG anti-enolasa (1/12.800) y reconocieron específicamente a la enolasa recombinante y a la nativa presente en la saliva (Figuras 15A y 25B). El suero de los 3 conejos control (tratados sólo con el adyuvante) no reaccionó ni con la proteína recombinante ni con la saliva.

El efecto protector de la vacuna se evaluó mediante la infestación de cada conejo con 15 hembras, 25 machos, 100 ninfas-4, 100 ninfas-3 y 100 ninfas-2 de *O. moubata* y la evaluación en esos ejemplares del tiempo de alimentación, la cantidad de sangre ingerida, el número de huevos viables depositados por las hembras, las tasas de muda de las fases inmaduras y las tasas de mortalidad de todos los ejemplares (Tabla 8).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos vacunado y control, en ninguna de las fases evolutivas, en el tiempo de alimentación ni en la cantidad de sangre ingerida.

Las hembras alimentadas sobre los conejos vacunados depositaron un 18,1 % menos de huevos que las alimentadas sobre los conejos control, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística.

La mortalidad a los dos meses post-infestación en los machos, hembras y ninfas-2 fue similar en el grupo vacunado y en el control, pero alcanzó valores significativamente superiores en las ninfas-4 y la ninfas-3 alimentadas en el grupo vacunado (20,5 % y 16,5 %), respecto a las alimentadas en el grupo control (1,5 % y 0 %).

Las tasas de muda de los inmaduros supervivientes fueron superiores al 88 % en todos los grupos y no se observaron diferencias significativas en este parámetro respecto al grupo control.

Tabla 8. Media \pm error estándar de los parámetros medidos en los ejemplares de *O. moubata* alimentados sobre los conejos control (n=3) y vacunados con rOmEno (n=3). El número entre paréntesis indica el porcentaje de reducción en las garrapatas alimentadas en los conejos vacunados comparadas con el grupo control.

Efecto fenotípico	Fase evolutiva	Grupo	Resultado
Sangre ingerida (mg)	Machos	Control	23,8 \pm 0,4
		rOmEno	24,20 \pm 1,0
	Hembras	Control	217,6 \pm 6,5
		rOmEno	204,7 \pm 7,1 (5,6 %)
	Ninfas-4	Control	40,1 \pm 0,3
		rOmEno	47,9 \pm 0,3
Ninfas-3	Control	14,7 \pm 0,2	
	rOmEno	17,7 \pm 0,1	
Ninfas-2	Control	6,7 \pm 0,1	
	rOmEno	6,3 \pm 0,1 (5,9 %)	
Nº huevos/hembra	Hembras	Control	172 \pm 17,8
		rOmEno	141 \pm 18,8 (18,1 %)
% Viabilidad	Huevos	Control	83,4 \pm 3,4
		rOmEno	82,3 \pm 5,9
% Muda	Ninfas-4	Control	94,5 \pm 6,7
		rOmEno	88,3 \pm 6,1
	Ninfas-3	Control	98,4 \pm 2,3
		rOmEno	93,5 \pm 2,5
	Ninfas-2	Control	97,3 \pm 2,9
		rOmEno	96,7 \pm 4,7
% Mortalidad	Machos	Control	4,4 \pm 0,1
		rOmEno	3,9 \pm 1,0
	Hembras	Control	13,3 \pm 2,4
		rOmEno	17,4 \pm 1,1
	Ninfas-4	Control	1,5 \pm 0,1
		rOmEno	20,5 \pm 0,9*
Ninfas-3	Control	0 \pm 0	
	rOmEno	16,5 \pm 1,6*	
Ninfas-2	Control	1,5 \pm 0,1	
	rOmEno	2,5 \pm 0,1	

* $p < 0,05$ con respecto al grupo control.

OBJETIVO 4.

PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE UNA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE *O. MOUBATA*.

4.1. Calidad y representatividad de las genotecas de entrada y de expresión.

Partiendo de 2 µg de mRNA poliA+ y utilizando el kit CloneMiner II (Invitrogen) se sintetizó primero la genoteca de entrada en el vector pDONR222, la cual fue posteriormente amplificada y transferida al vector pANT7_cGST obteniendo así la genoteca de expresión.

La genoteca de entrada mostró un título de 5×10^6 unidades formadoras de colonias (CFUs) y un 92 % de clones recombinantes (22 clones de los 24 analizados al azar). De estos recombinantes, más del 90 % contenían insertos con un tamaño entre 250 y 1500 pb. Por su parte, la genoteca de expresión presentó un título de 2×10^7 CFUs y un 83 % de clones recombinantes (20 clones de los 24 analizados), todos ellos con insertos de tamaño superior a 250 pb (Figura 26). Por tanto, ambas genotecas superaron los parámetros de calidad mínimos indicados por el fabricante del kit.

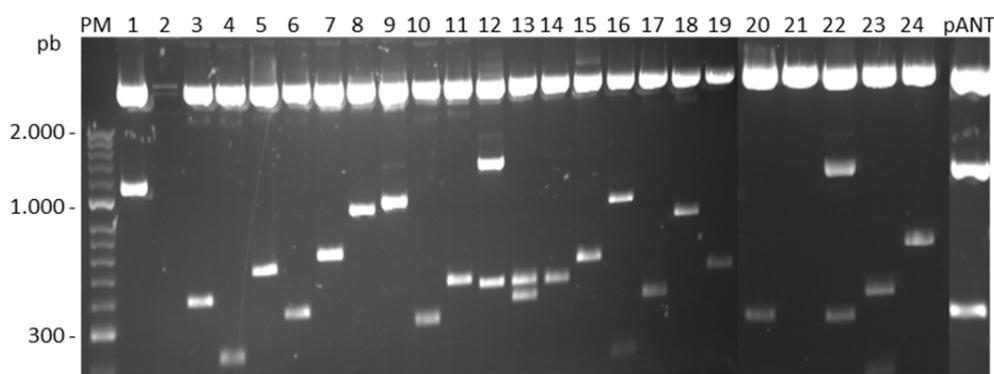


Figura 26. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Digestión con la enzima *Bsr*GI del DNA plasmídico de 24 clones seleccionados al azar. Los clones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23 y 24 contienen inserto y este es de un tamaño superior a 250 pb. pANT, vector pANT7_cGST digerido con *Bsr*GI en el que se observan las tres bandas previstas de 4.200, 1.200 y 402 pb.

Los 42 clones recombinantes analizados (22 de la genoteca de entrada y 20 de la de expresión) fueron secuenciados y las secuencias resultantes se compararon por BLASTn en las bases de datos NCBI nr para su identificación. De este modo se identificaron 31 de los 42 clones (el 73,8 %); el resto (26,2 %) no mostraron homología con secuencias conocidas y, por tanto, no pudieron ser identificados con certeza.

Todos los clones identificados contenían proteínas de garrapata y para al menos 21 de ellas (el 68 %) está descrito que se expresan en las glándulas salivales/saliva (Tabla 9).

Tabla 9. Proteínas identificadas tras secuenciar los insertos de los clones seleccionados al azar durante las pruebas de control de calidad de la genotecas. Las proteínas marcadas en azul han sido identificadas en la saliva o en las glándulas salivales de alguna especie de garrapata.

Número de acceso	Proteína	Homología de Especie
DQ066326.1	40S ribosomal protein S7-like	<i>Ixodes scapularis</i>
EF633877.1	clone OP-177 truncated salivary lipocalin	<i>Ornithodoros parkeri</i>
EF633975.1	clone op-new-118 ribosomal protein L19	<i>Ornithodoros parkeri</i>
EF633982.1	clone op-new-471 putative RNA-binding protein	<i>Ornithodoros parkeri</i>
EU016369.1	apyrase isoform 2	<i>Ornithodoros savignyi</i>
EU574814.1	clone OC-20 BTSP	<i>Ornithodoros coriaceus</i>
XM_002411102.1	translation elongation factor EF-1 alpha/Tu	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002413194.1	coatomer gamma subunit	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002434317.1	ribosome maturation protein SBDS	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002436156.1	exocyst complex component	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002436237.1	ribosomal protein L13A	<i>Ixodes scapularis</i>
AF452886.1	savignygrin	<i>Ornithodoros savignyi</i>
AF452888.1	TSGP1 lipocalin	<i>Ornithodoros savignyi</i>
BK007772.1	Bax-mediated apoptosis inhibitor TEGT/BI-1	<i>Amblyomma variegatum</i>
EF633864.1	clone OP-151 60S ribosomal protein L126	<i>Ornithodoros parkeri</i>
EF633962.1	clone OP-80 60s ribosomal protein L10	<i>Ornithodoros parkeri</i>
EU574815.1	clone OC-21 BTSP	<i>Ornithodoros coriaceus</i>
FJ196395.1	ribosomal protein P0	<i>Rhipicephalus microplus</i>
XM_002400854.1	syntaxin	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002407062.1	processing peptidase beta subunit	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002413641.1	matricellular protein osteonectin/SPARC/BM-40	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002434617.1	fructose-1,6-bisphosphatase	<i>Ixodes scapularis</i>
AB208021.1	actin	<i>Ornithodoros moubata</i>
EF633856.1	clone OP-14 40S ribosomal protein S14	<i>Ornithodoros parkeri</i>
XM_002407668.1	single-stranded DNA binding protein P9	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002416449.1	NADH:ubiquinone oxidoreductase, NDUFA9	<i>Ixodes scapularis</i>
EF633878.1	clone OP-178 ribosomal protein S18	<i>Ornithodoros parkeri</i>
XM_002399968.1	elongation factor 1 beta/delta chain	<i>Ixodes scapularis</i>
XM_002400474.1	thioredoxin-dependent peroxide reductase	<i>Ixodes scapularis</i>
L04129.1	moubatin	<i>Ornithodoros moubata</i>
XM_002415046.1	pre-mRNA splicing factor Syf1	<i>Ixodes scapularis</i>

Los resultados anteriores indicaban que las genotecas no sólo cumplían con los parámetros de calidad sino que, además, mostraban una buena representatividad del órgano de partida (las glándulas salivales), por lo que procedimos a construir los microarrays de proteínas a partir de la genoteca de expresión.

4.2. Control de calidad y reproducibilidad de la impresión del DNA.

Para la construcción de los microarrays se seleccionaron al azar 480 colonias de la genoteca (el equivalente a 5 placas de 96 pocillos). Las colonias se cultivaron y se purificó y cuantificó su DNA plasmídico, que fue posteriormente utilizado para la impresión de los microarrays.

Para 300 de estos clones se obtuvieron más de 15 μg de DNA y para la mayor parte de los 180 clones restantes se obtuvieron entre 10 y 15 μg de DNA. Como se muestra más adelante, esta cantidad resultó ser un parámetro de importancia crítica en el proceso de impresión de los microarrays de DNA en los portaobjetos y en su posterior expresión *in situ*.

Tras la impresión del DNA, y antes de proceder a la expresión *in situ*, se llevaron a cabo controles de calidad y reproducibilidad mediante la tinción con PicoGreen de tres portaobjetos de cada lote.

La tinción produjo una señal positiva (superior a la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar) en el 74 % de los clones (350 de 480 clones). Estos clones fueron, mayoritariamente, aquellos para los que se obtuvieron más de 15 μg de DNA plasmídico. No se observó señal de PicoGreen en los clones para los que se había obtenido -y utilizado en la impresión- menos de 10 μg de DNA plasmídico (Figuras 27A y 28).

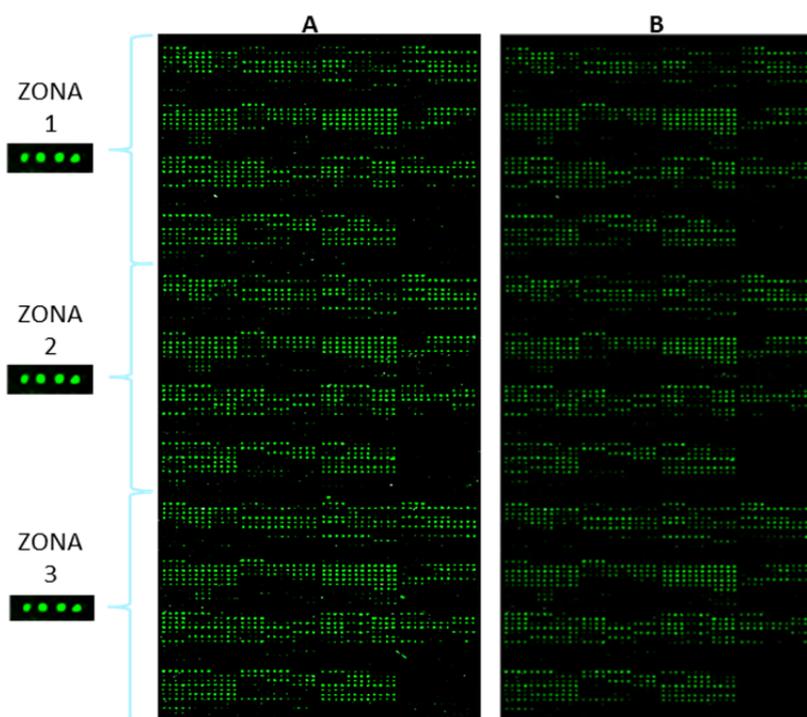


Figura 27. Imágenes de los microarrays. El DNA de cada clon se imprimió por cuadruplicado (en fila) y el conjunto de los 480 clones se imprimió tres veces en cada portaobjetos de modo que cada porta contenía tres réplicas del microarray (zonas 1-3). **(A)** Tinción del DNA con PicoGreen. **(B)** Detección de GST con un anticuerpo anti-GST después de la expresión *in situ* de las proteínas.

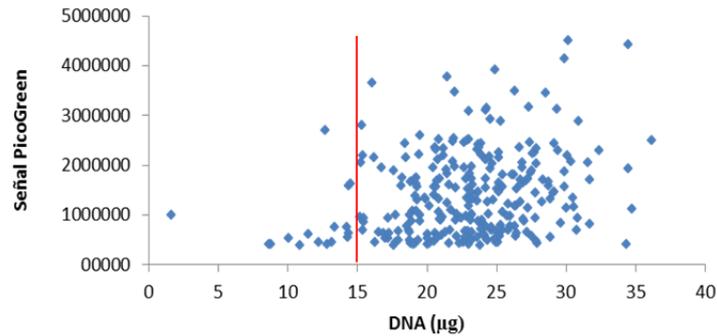


Figura 28. Relación entre la señal normalizada de PicoGreen (respecto a la señal de la mezcla de reacción sin DNA) y la cantidad de DNA utilizada para la impresión. La línea vertical señala la cantidad de DNA mínima para garantizar una señal de PicoGreen detectable (15 µg).

La tinción con PicoGreen evidenció una buena reproducibilidad intra-array ($R^2=0,8535$), al comparar la señal de un mismo clon en las tres zonas de un mismo porta, descartando así sesgos zonales (Figura 29A); también evidenció una buena reproducibilidad inter-array ($R^2=0,8210$), cuando se compararon las señales entre portas de un mismo lote de impresión (Figura 29B).

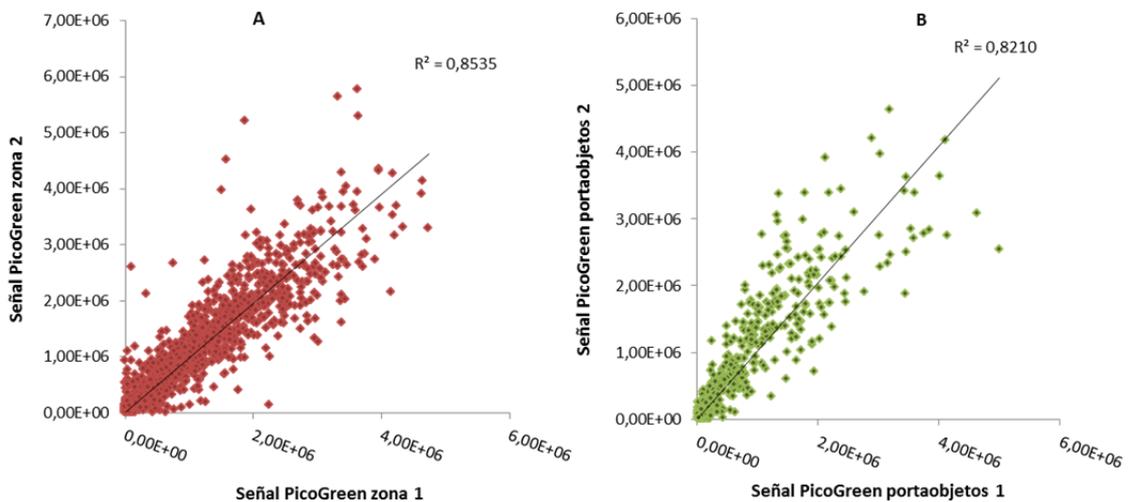


Figura 29. Análisis de la reproducibilidad de la impresión de DNA. **(A)** Reproducibilidad intra-microarray: correlación entre las señales de PicoGreen de los mismos clones imprimidos en distintas zonas de un mismo porta. **(B)** Reproducibilidad inter-microarray: correlación entre las señales de PicoGreen de los mismos clones imprimidos en portas distintos.

4.3. Control de calidad de la expresión de proteínas.

Una vez comprobada la calidad y reproducibilidad de la impresión del DNA se llevó a cabo la reacción IVTT con sistemas libres de células y se verificó la correcta expresión de las proteínas mediante la detección de la marca de GST con un anticuerpo anti-GST.

Se detectó señal positiva (superior o igual a la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar) en el 70 % de los clones imprimidos en el array. Estos clones positivos coincidieron mayoritariamente con los positivos con PicoGreen, es decir, los imprimidos partiendo de cantidades de DNA superiores a 15 μg (Figuras 28B y 30A).

El análisis de reproducibilidad también mostró que la expresión de las proteínas era uniforme y reproducible entre los microarrays de distintos lotes de impresión ($0,90 \geq R^2 \geq 0,5$) (Figura 30B).

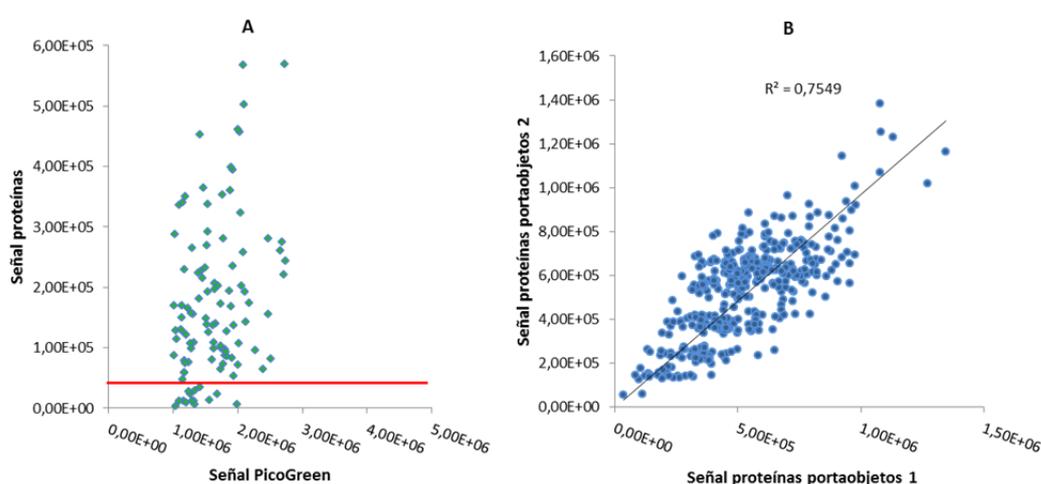


Figura 30. Análisis de la reproducibilidad de la expresión de proteínas. **(A)** Relación entre la señal normalizada de GST y la señal de PicoGreen. La línea roja indica el umbral de positividad (media más 3 veces la desviación estándar de los controles negativos). **(B)** Reproducibilidad inter-microarray: correlación entre las señales de GST de los mismos clones imprimidos en portas de distintos lotes.

4.4. Análisis de los microarrays con sondas específicas.

Una vez verificada la correcta expresión de las proteínas, los microarrays se analizaron con el suero hiperinmune anti-Om44 y con la quimera recombinante P-selectina/IgG humana.

4.4.1. Ensayo con el suero anti-Om44.

De acuerdo con nuestros trabajos previos, este suero reconoce al menos dos proteínas de *O. moubata*, la actina y la proteína salival Om44.

En el análisis de los microarrays, el suero anti-Om44 reconoció a 8 clones, de los cuales 5 pudieron ser identificados: fosfolipasa A₂ (PLA2), un miembro de la familia 7DB (7DB), la riboproteína 60S L10 (RP-60S), la proteína de choque térmico 90 (HSP90) y la actina (Figura 31).

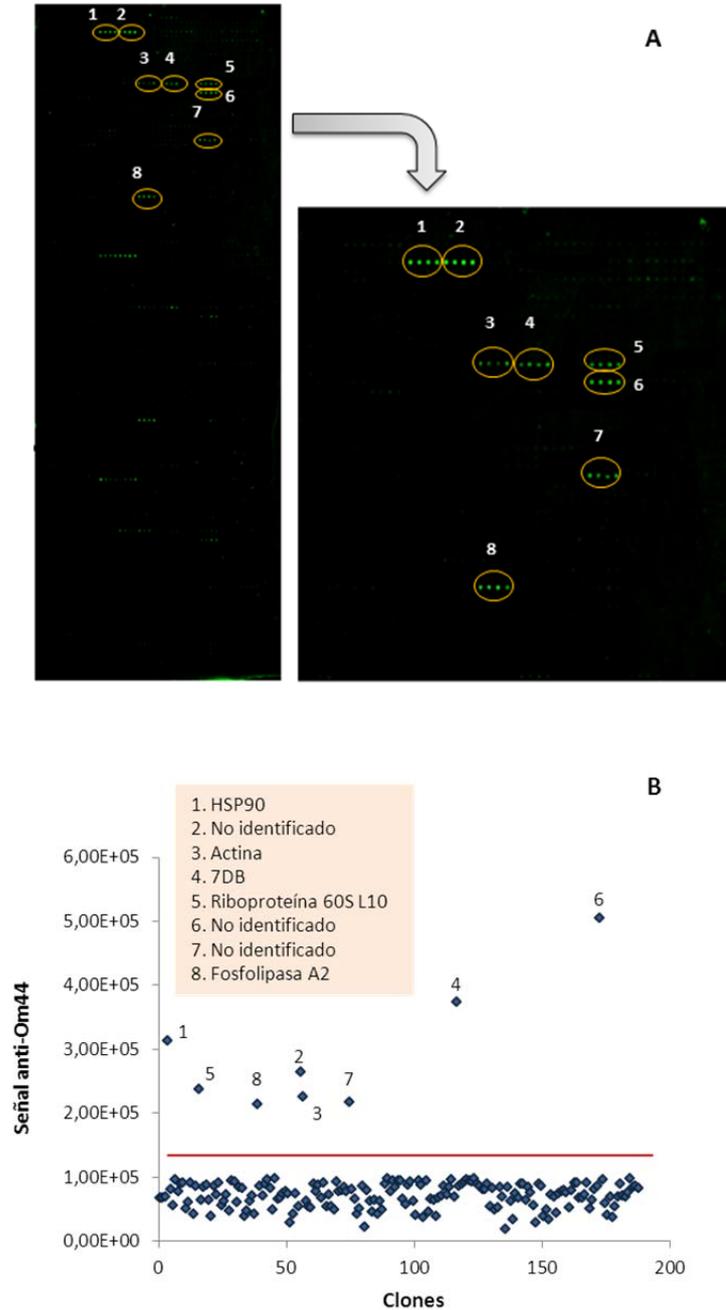


Figura 31. Detección e identificación de los clones reconocidos por el suero anti-Om44. **(A)** Imágenes del microarray, portaobjetos completo y tercio superior ampliado, mostrando los spots replicados de los 8 clones reconocidos por el suero anti-Om44. **(B)** Señal anti-Om44 de los clones reconocidos y no reconocidos por el suero. Los clones positivos superaron claramente el umbral de positividad (línea roja), calculado como la media de los controles negativos más tres veces la desviación estándar.

4.4.2. Ensayo con la quimera recombinante P-selectina/IgG humana.

Este análisis se llevó a cabo a fin de identificar posibles ligandos de P-selectina. Con este propósito se hicieron dos tipos de análisis en condiciones distintas.

En el primer análisis, un lote de microarrays producidos en condiciones estándar (sin membranas microsomales caninas, CMMs), se incubaron con la quimera en presencia de baja concentración de Ca^{2+} (100 μM); en el segundo análisis los microarrays fueron producidos en presencia de CMMs para permitir la modificación postransduccional de las proteínas y se incubaron con la quimera en alta concentración de Ca^{2+} (2 mM).

En el análisis en condiciones estándar la quimera reconoció tres clones. Después de la secuenciación, sólo se pudo identificar uno, que resultó ser la PLA2 (Figura 32A), la cual, como acabamos de ver, también fue reconocida por el suero anti-Om44.

En el segundo análisis la quimera reconoció 6 clones, de los cuales pudieron identificarse 3: factor de elongación EF-1 α /Tu, proteína ribosomal 40S S7 y una proteína hipotética de *I. scapularis* (Figura 32B).

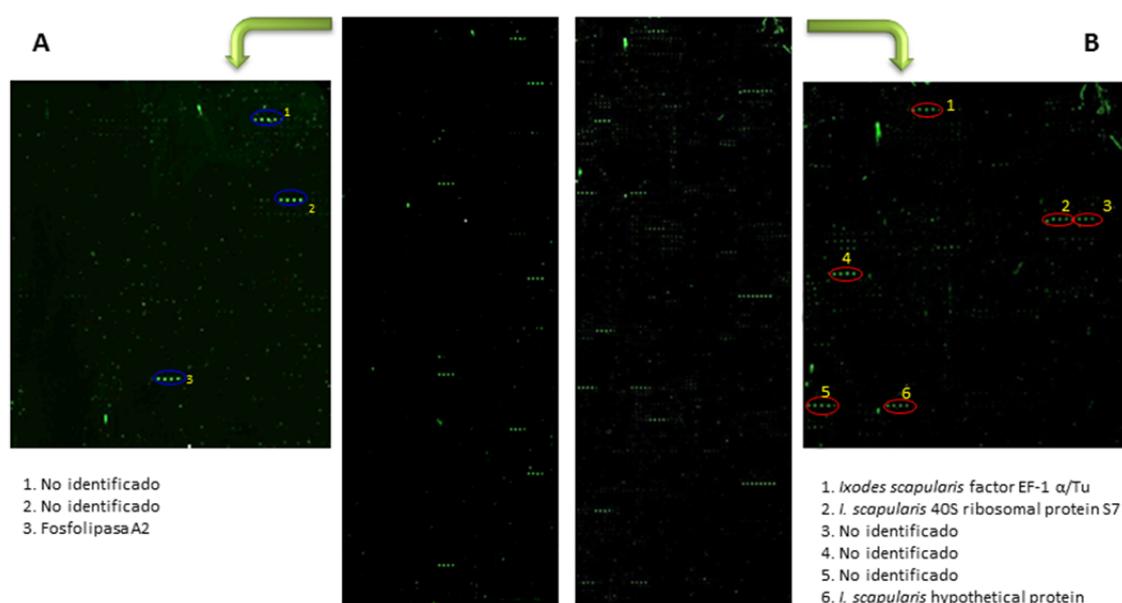


Figura 32. Detección e identificación de clones que interactuaron con la quimera P-selectina/IgG humana. **(A)** Microarray producido en ausencia de CMMs: portaobjetos completo y tercio superior ampliado, mostrando los spots replicados de los 3 clones que se unieron a la quimera en presencia de 100 μM de Ca^{2+} . **(B)** Microarray producido en presencia de CMMs: portaobjetos completo y tercio superior ampliado, mostrando los spots replicados de los 6 clones que se unieron a la quimera en presencia de 2 mM de Ca^{2+} .

4.5. Confirmación de los resultados del análisis de los microarrays.

4.5.1. Proteínas reconocidas por el suero anti-Om44.

De las 5 proteínas reconocidas e identificadas por este suero en los microarrays, 4 pudieron ser obtenidas de forma recombinante en células de *E. coli*: PLA2, 7DB, RP-60S y actina (ver más adelante apartado 5.2.; Figura 38).

Estas cuatro proteínas fueron enfrentadas por western blot con el suero anti-Om44, el cual reconoció a tres de ellas (RP-60S, PLA2 y actina), confirmando en buena medida los resultados del análisis de los microarrays, aunque no reconoció a la proteína 7DB (Figura 33). Cabe señalar que el suero reconoció claramente dos bandas de unos 35 y 68 kDa en el carril de PLA2.

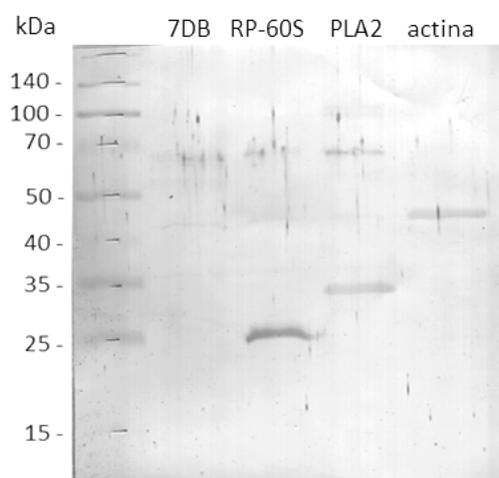


Figura 33. Western blot. Proteínas recombinantes obtenidas en *E. coli* (7DB, RP-60S, PLA2 y actina) incubadas con suero anti-Om44 y con el correspondiente anti-IgG de conejo-peroxidasa.

4.5.2. Reconocimiento de la fosfolipasa A2 por la quimera P-selectina/IgG humana.

La quimera reconoció un total de 9 clones en los análisis de los microarrays, de los cuales pudieron identificarse cuatro: PLA2, factor de elongación EF-1 α /Tu, proteína ribosomal 40S S7 y una proteína hipotética de *I. scapularis*.

Como la PLA2 también fue reconocida por el suero anti-Om44, esta proteína adquirió un interés especial por ser, en principio, la identidad más probable para el antígeno Om44.

Para confirmar que la PLA2 era realmente un ligando de P-selectina produjimos dos versiones recombinantes de esta proteína y enfrentamos a ambas, por ELISA y western blot, con la quimera P-selectina/IgG humana. Las dos recombinantes se obtuvieron fusionadas a una cola de residuos de histidina (His-tag) para facilitar su purificación y/o captura: una se produjo *in vivo* en *E. coli* (ver apartado 5.2.) y la otra *in vitro* tal como se detallaba en el apartado 4.4.2. de Material y Métodos.

La expresión de la PLA2 *in vitro* se confirmó enfrentando alícuotas (2 μ L) de la reacción IVTT por western blot con un anticuerpo anti-His-tag marcado y con un suero hiperinmune anti-PLA2 obtenido en conejo (ver obtención más adelante, apartado 5.3.). Como muestra la figura 34, ambos sueros reconocieron una banda del tamaño esperado confirmando la presencia de cantidades detectables de PLA2.

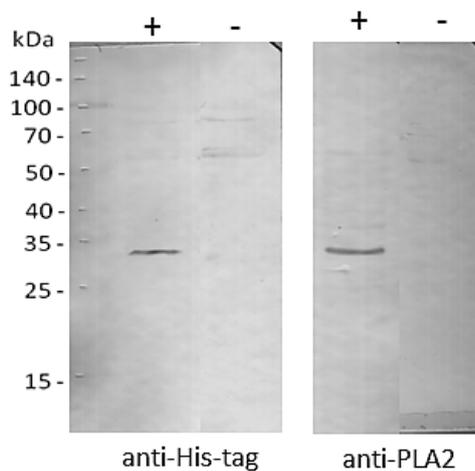


Figura 34. PLA2 expresada *in vitro* enfrentada por western blot con el anticuerpo anti-His-tag y con el suero anti-PLA2 obtenido en conejo. (+) Reacción IVTT con la construcción pT7CFE1-CHis-PLA2. (-) Reacción IVTT con el vector de expresión sin inserto (pT7CFE1-CHis).

Unión de P-selectina a las PLA2 recombinantes en ELISA.

Las dos versiones recombinantes de PLA2, la obtenida *in vivo* -previamente purificada- y la obtenida *in vitro* -sin purificación previa-, se capturaron sobre una placa de ELISA tapizada con un anticuerpo monoclonal anti-His-tag y, acto seguido, se verificó su captura incubando la placa con el suero hiperinmune anti-PLA2 (Figura 35).

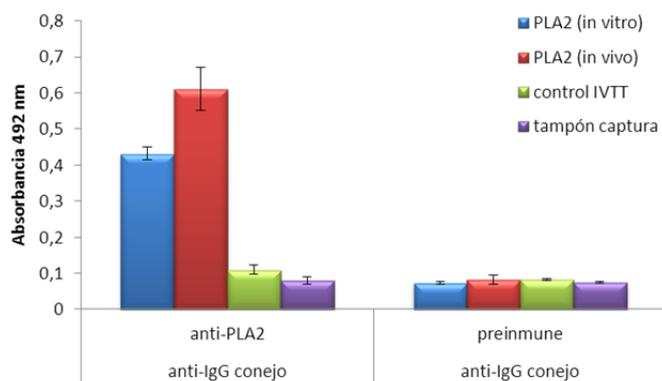


Figura 35. ELISA. PLA2 recombinantes, obtenidas *in vitro* e *in vivo*, enfrentadas con el suero anti-PLA2 obtenido en conejo y con el suero previo no inmune del mismo conejo. Control IVTT: reacción IVTT con el vector pT7CFE1-CHis, sin inserto, usada como control negativo. Tampón de captura: tampón en el que se diluyeron las recombinantes en el paso de fijación al monoclonal anti-His-tag, que también fue incluido como control negativo. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres ensayos idénticos en los que cada condición se analizó en pocillos duplicados.

Una vez verificada la captura de ambas versiones recombinantes de PLA2, unas placas similares fueron incubadas con la quimera P-sel/IgG humana o con el tampón en el que ésta iba diluida (MOPS) y con el anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa.

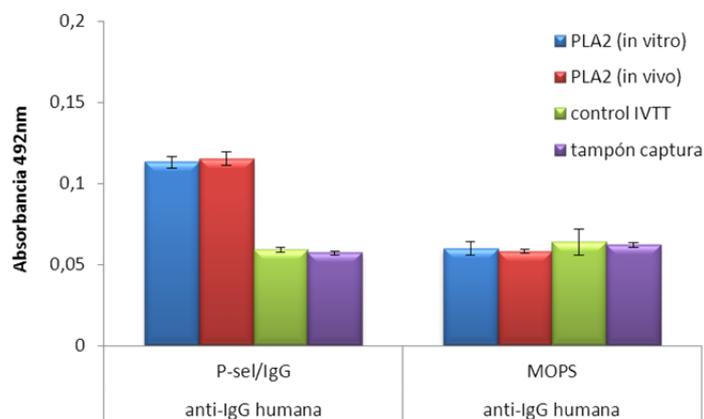


Figura 36. ELISA. PLA2 recombinantes, obtenidas *in vitro* e *in vivo*, enfrentadas con la quimera P-sel/IgG humana o con el tampón diluyente (MOPS). Control IVTT: reacción IVTT con el vector pT7CFE1-CHis, sin inserto, usada como control negativo. Tampón de captura: tampón en el que se diluyeron las recombinantes en el paso de fijación al monoclonal anti-His-tag, que también fue incluido como control negativo. Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres ensayos idénticos en los que cada condición se analizó en pocillos duplicados.

Como muestra la figura 36, ambas recombinantes se unieron a la quimera, aunque débilmente, confirmando los resultados del análisis de los microarrays y la capacidad de la PLA2 para actuar como ligando de P-selectina.

Unión de P-selectina a las PLA2 recombinantes en western blot.

Por último, ambas PLA2 recombinantes, la obtenida *in vivo* purificada (1 µg) y la obtenida *in vitro* (1 µL de reacción), se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, incubándolas posteriormente con la quimera P-selectina/IgG-humana o con el tampón diluyente (MOPS).

La quimera se unió a ambas recombinantes: claramente a la PLA2 purificada obtenida *in vivo* y, débilmente, a la PLA2 obtenida *in vitro*; la banda de esta última, aunque ténue, es perceptible en su carril correspondiente pero no en el carril control negativo (reacción IVTT) (Figura 37). En las membranas incubadas sólo con el tampón MOPS no se reveló ninguna banda al nivel de la PLA2.

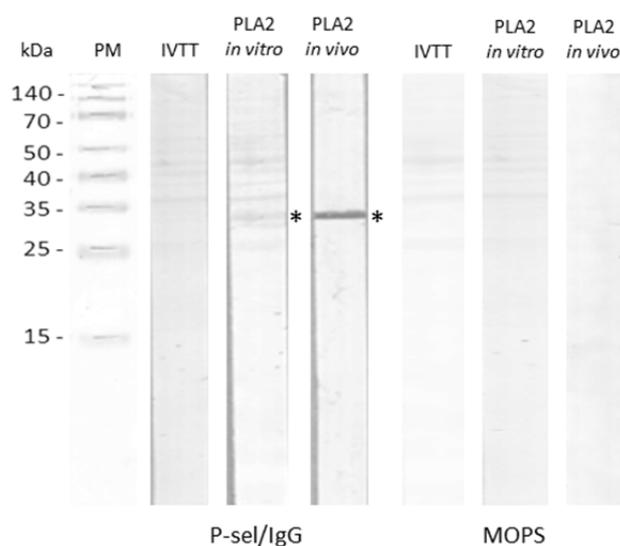


Figura 37. Western blot. PLA2 recombinantes obtenidas *in vitro* (sin purificar) e *in vivo* (purificada previamente) enfrentadas con la quimera P-selectina/IgG humana o con el tampón diluyente (MOPS). PM: marcador de pesos moleculares. IVTT: reacción *in vitro* con el vector pT7CFE1-CHis, sin inserto, usada como control negativo. Los asteriscos señalan las bandas correspondientes a la PLA2.

OBJETIVO 5.**PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PROTECTORA EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.**

Las proteínas seleccionadas para los ensayos de vacunación de animales fueron las reconocidas e identificadas en el análisis de los microarrays con el suero anti-Om44 (PLA2, 7DB, RP-60S, HSP90 y actina) y con la P-selectina/IgG (PLA2). A estas cinco proteínas añadimos otras dos, la apirasa y un ortólogo de la savignyigrina de *O. savignyi*, al que denominamos mougrina, las cuales habían sido identificadas en la genoteca de entrada durante las pruebas de control de calidad (Tabla 9).

5.1. Secuencias de cDNA codificante y de aminoácidos de las proteínas seleccionadas.

Excepto para la HSP90, las secuencias completas de cDNA codificante de estas proteínas se obtuvieron mediante la secuenciación de los clones correspondientes en los vectores pANT7_cGST o pDONR_222. La secuencia de la HSP90 clonada en pANT7_cGST estaba truncada en el extremo 5', de modo que se completó mediante 5'-RACE.

Todas estas secuencias, excepto la de la actina que ya lo estaba, fueron depositadas en la base de datos GenBank. La tabla 10 recoge el tamaño y el número de acceso de dichas secuencias y la tabla 11 muestra las secuencias nucleotídicas específicas.

Tabla 10. Tamaño en pares de bases (pb) de los cDNAs correspondientes y números de acceso en la base de datos GenBank.

cDNA	Nº acceso (GenBank)	Tamaño (pb)
PLA2	KC908103.1	816
7DB	KC908104.1	342
RP- 60S	KC908109.1	624
HSP90	KC908107.1	1692
Apirasa	KC908110.1	1755
Mougrina	KC908105.1	192

Tabla 11. Secuencias codificantes completas (cDNAs) de PLA2, 7DB, RP-60S, HSP90, apirasa y mougrina.

Secuencia	
PLA2	1 ATGACTAAAGAAAACCAGACCTTGGTGGAGCAGTACTTGAAGTGCGAAGACCTCGGCAAC 61 AGTGTGAGGGAAAAATGATGTCTTTGTTAGATAGATTTGGCTCTGCAGTGACGCTCGCG 121 ACTGGAAATACATTCGCCCACACAGAACAGATAGATGTCTGGGATGAATATGTTTCGAAAC 181 TGTACGTGGCATCCACTCATGATGCGTACCCCAAGGGATGTTCTACTCCTAAGATGGAAT 241 AAGAACGGAGACTATATATATCCAGGGACTAAATGGTGTGGAGCTGGGAATAAGTCAGAA 301 AGGACTGGTGATTATGGCACTAACAACGAAACCGATAAATGCTGCGAAGCTCATGACAAC 361 GCCACGGATTATATGCTTTCAAGAAAGCTATAATGCGAACCCGACTATGTGGAACCCCAAA 421 TACTATACTGTAACCAACTGCGCCGATGACGCGAAGCTCTTCGACTGTCTCCTGAAGGCA 481 AATACGAGCCGATCCCTCGAGTTCGGACAAGCATTTTTTCGATGCATTACAGGTTCCCTGC 541 TTCGTAATACGTACAAAAGGGACTGCCAAAGCTGGTGGGACGGCTTTCCTACAGATAT 601 CCNCCGAAGTGTAAGCCCTGGAATAAAACGGCGGAAAAGAAATTGGACCCTAATTGATCCA 661 CCAAATTTCTATTATACCTTCTCGAGAGTGAACCAATAACGACACATATGAAGCTGCTAAT 721 GACATCTATTCCTGGAAGGAGTCTGCAAACTTGATGAGTCAATTGAACTGCTGGAATTAC 781 ACCTGGTTGAATTCCTCAATAAAGACGACAAAATGA
7DB	1 ATGCATCTGCTTTCCTTGGGTCTTTGGCCCTCTTTTATGGAGTATTGCAACTTTCATC 61 ATAGAAGATCTTCCCGGGATTCTAAACGGCACAGGTGAAGATTACGAGGATTACGACTAC 121 GGTCCTCAAAGAACCTCAGAGTGCAGACACGCGTCCGACGCTGCCACGCTGCGAGGATCTAAT 181 GAAACATACACGTGTTCTCATCTTTGCTCGACTAGCGGTTATGCAAATGAAGAGGACGGA 241 AAGTGGTGCACGACTACAACCATTACCCAGACATCCACGTACGATGAGTGGGTTAACGGA 301 ACATGTGCTAACGGCACTTTCGCTGACAAATGCGTTCGCCGTGA
RP-60S	1 ATGGGTGCGCGTCCGGCAAGATGTTACCGTTACTGCAAGAATAAACCATATCCGAAGTCT 61 CGCTTCTGTGCGTGGTGTGCCAGATCCGAAGATCCGTATCTTCGATCTCGGTCGCAAGAAG 121 GCCCGTGTAGATGAGTTTCCGCTCTGCGTGCATCTCATCTCCAAGGAGTTCGAACAGATC 181 TCCTCCGAGGCCCTGGAAGCTGGTTCGATCTGCGCCAACAAGTATCTGGTGAAGACTTGC 241 GGCAAGGACGCTTCCACTTGCGAATGCGGTTGCACCCCTTCCACGTAATTCGAATCAAC 301 AAAATGTTGCTCTGTGCTGGAGCTGATAGGCTCCAAACGGGGATGCGTGGTGTCTTTCGGA 361 AAGCCGACGGGACCGTGGCCGGGTGCACATTGGGCAGAAGATAATGTCCTGCGCTGTT 421 AAGGAGCAGCACAAGGAGAAGCTCATCGAGGCACTGCGTAGGGCAAAGTTCAAGTTTCCT 481 GGCCGTGAGAAGGTTTGCCTCTCGAAGAAGTGGGGCTTACCAGGTTGGGACGCGCAGCG 541 ACTACGAGGAAATGCGTGTGACGGGACGGCTGAAAACCCGATCGGTGCGTACTGCCACT 601 ACTACAGCGGCCACGGACCTCTGA
HSP90	1 ATGCCAGAAGAAGCTCAAATGGAGGAAAACAGGCGAGGTGGAGACCTTTCGCTTCCAAGCT 61 GAGATTGCTCAGCTTATGAGCCTCATCATCAATACATTCTACTCGAACAAAGAAATATTC 121 CTTCCGGGAATTGATTTCAAACCTCCTCGGACGCCTTAGACAAAGATCAGATACGAGTCCCTG 181 ACCGAGCCCACGAAGTTGGATGCCAGAAAGAGCTTTTCATCAAGATCATCCCAACCGC 241 GATGACCCGTACCCTGACCATCATCGACACTGGTATCGGCATGACAAAAGCCGATCTTATT 301 AACAACTTGGGTACGATAGCGAAGTCTGGCACAAGGCTTTTCATGGAAGCTCTGCAGGCT 361 GGTGCTGACATCAGTATGATCGGTGAGTTCGGTGTGGCTTCTACTCGGCCTACTTGGTC 421 GCTGACAAGGTTACCGTCACTTCAAAGCACAATGATGATGAGCAGTACACGTGGGAGTCT 481 GCTGCTGGTGGCTCCTTACCATCCGTGCTGATAACACCGAGCCCTCGGACGCGGTACG 541 AAGATCGTCTCCACTTGAAGGAAGATCAGACGGAGTATCTTGGAGAACGTCGTGTCAAG 601 GAGGTTGTAAGAAGCATTCCAGTTCATCGGCTACCCCATCAAACCTTCTCGTCCAGAAA 661 GAGCGTGAGAAGGAGGTGTCTGATGACGAGGAGGAGAAGAAAAGGAAGAGAAGAAA 721 GAGGAAGATGACGAGAAGGAAAAGCCAAAGATTGAGGATGTAGATGAAGAGGATGATAAA 781 GACAAGGGAAAAGAAAAGAAAGATCAAGGAGAAGTACTCCGAGGATGAAGAGCTCAAC 841 AAGACAAAGCCATTGGATGCGCAACCCGACGACATCTCTCAGGAGGATGATGAGAG 901 TTCTACAAGTCTCTTACGAATGACTGGGAAGACCCTTGGCTGTCAAGCATTTCTCCGTT 961 GAGGACAGCTGGAATTCCTGCTCTGCTCTTCCGTTCCCAAGCGCGCACCCCTTCGATCTC 1021 TTCGAGAACAGAAAGCAGAAAATAACATCAAGTTGTATGTGAGGAGGATTCATCATG 1081 GACAACTGTGAGGACCTCATTCGAGTACCTTAACTTCATTAAGGGTGTGGTGGACTCT 1141 GAGGACTTGGCCCTCAACATATCGCGTGAATGCTGCAGCAGAATAAGATCCTTAAAGTC 1201 ATCAGGAAGAATTTGGTCAAGAAGTGCCTGGAGCTCTTTGACACTGTGCTGAGGACAGG 1261 GAAATGTACAAGAAATCTATGAGCAGTTCAGCAAAAATATGAAGCTCGGCATTCACGAG 1321 GACTCCAGAACAGGAAGAAGTTGGCCGAATTTCTCCGCTACTACAGCTTCTCTGTT 1381 GATGAGATGTGCTCCCTGAAGGACTATGTCTCCCGCATGAAGGAAAACCGAAGCACATC 1441 TATTTCAATTACTGGTGAATCCAAGGAACAGGTGGCAAACCTGCTTTGCTGAGGAGGAT 1501 CGCCAGCGAGGCTTCGAAGTCACTTACATGATCGAGCCATTGATGAATACTGCGTCCAG 1561 CAGCTGAAGGAGTACGACGCAAAACCCCTGGTGTCTGTCAAAAAGGAAGAACTCGAGCTC 1621 CCGGAGGATGATGCTGAGAAGAAGAGGCAGGAAGAAAACAGCAGAAGTTTGAAGACTTGT 1681 GCAAGGTCATGA
Apirasa	1 ATGCTAAAACACTTTTTCTCGCCTTCTCTCTTCTTGGCTGTCTCTAATGCTAAGCCT 61 GCAACGACTCCGAACCGAAATGCCCGAAGAAGGCGCGGATGGTTTCACTTTGACCATA 121 CTTATACGAATGATATTCACAGTCACTTTGACGAGAGCAATCAATGGGGAGGTCATGCG 181 GTGCCGAAGAACAACAAGACGGACCACTGCGTTCGCTGGCGTCACTCGGCTCGAACACTG 241 GTGAAAAGATGAAAAGAAATACCCCTAAGGCCCTCTTTCATGAACCTGGGGATTTCTAC 301 CAAGGCAGTGTTTGGTATACGGTTCTCAAGGACAGAATAGTCTCTGCGGTGATGAAAGAA 361 CTGAAATATAACGCTGTCTCCCTTGGAAAACACGAGTTCGACGACGGCCAGACGGTCTG

	<p>421 GCTCCCTTTCTGGGTAATATGTCGGAAGCCGGTGTCAAGGTGATCGCAACCAATGTCGAC 481 ACCAAGGATGAACCGATATTAAGGACAAGGTCTTATTGAAATCGCACACATTCTGCGTG 541 GAAGGGAGACGAGTAGGTGTGATTGGAGCTGTCACTGAAGAAACACGAACCATCGCAAAA 601 CCTGGAAATGCATTAATCAAGGATGTGATCCCGTCCCTCCAAGAAGAAGCGAAAAGACTC 661 AAGGCAAAAGGTGTAGAGATCATCGTAACGATCACACACACTGGGTACGATGTGGACCT 721 TATATCGTGGGGAATATTACCGAGTTGGACATCTTGGTAGGGGGGCATACAAACACCTTT 781 CTGTACAACGGTACACCCCTACGAAGGACAAGGTGGAAGGGCAATATCCAACGTGGTG 841 GAAAGACCAGACGGCTCACGAGGGTTGATTGTACAGGACTTTTGGTTCGGAAAGTATCTA 901 GGATTCTCCAGGTTACATTCGACAGCAAAGGAAATGTTAACAGTTGGCAAGGAAATCCT 961 ATATTGTGAATCACTCGTACGAAGAAGACGAGAGCATGAAGAAACCTTGGAACCATTC 1021 AGAGAGATCGTTAACGAGGCCGGCAGGCGCCAATCGGCAGCTCGAAAGTCGTGCTTTCC 1081 GCGGATAACAAAACCTGCGCGCTAAACGAATGTAACATGATGAACATGGTCACAGATCTA 1141 TTCCTTGCTTATTATGCGGATCAAGACTCCCCGAAAACCATGTGGTCTAATGTGGCTGCT 1201 GCCGTTGTCAACTCCGGATTGCGCGAGGTCGTCGCTTCCCTAAAAGCGACAAACTCACTATG 1261 TTCGACATCATGAGGGCTCTCCCATACGAAAGCAGCCTTGTGCTTCTCACACTAAAGGGC 1321 ACTGACCTTCGCAAGATGTTGAGCATTTCAGTGGCACAATTACGGTAACAGCCGACCCA 1381 AGAGGTGAATTCCTCGCAGTGTGAGGAATGAAAGTTAAGTACGACCTTAAGAAGCCAGCA 1441 AACAAAAGGGTTGTGTACCTCCGGATTCTTTGCACACAATGCGTCGTTCCCGGTACGAA 1501 GTCGTGAAAAATAACCAGACATACAAGATAGCCACAACACTAGCTACATTGCAAAACGGTGGC 1561 GACGTTTTGAGTTGACAAAGAAGTCATCAAGGAAACGAAAGGTGTTGTGACAGCGAA 1621 GTGTATCTGCCATATATCATGAAGATGTCACCCCTGAAGACAGCAGTCGAAGGACGCATC 1681 TTCATCCGCAATTACCCCAAACAGCCATTAGCAGCAGATATGACATGAGCTGGAAGCAA 1741 GAGATCTGGGTCTAA</p>
Mougrina	<p>1 ATGCAGGCGAAAATCTTGGTCTTTCGCTTTTGTGCTTCTCAGCGTCGCTGTTCTTGACATC 61 GGATATGTGACGAATGCAACGAAACACCCATGTATAGGTGCTCTGGCGATGAAGACAGA 121 ATATCTGGTTGGACATACGATCATCTGCTCTGAAAATGACTGCAGGAGACTATGCGGA 181 GAAAATGGTAA</p>

Las secuencias peptídicas correspondientes, obtenidas con la aplicación “Translate” (Tabla 12), se sometieron a un análisis bioinformático básico con el fin de calcular su punto isoeléctrico y peso molecular teóricos, comprobar la presencia de motivos conservados, péptido señal, señales de secreción, hélices transmembrana o sitios de anclaje tipo GPI (Tabla 13).

Los resultados de este análisis indicaron que las proteínas 7DB, apirasa y mougrina contienen péptido señal y además, que la 7DB, la apirasa y la PLA2 contienen señales de secreción distintas de las clásicas. Sólo la mougrina contiene hélices transmembrana y ninguna de ellas presenta sitios de anclaje a la membrana tipo GPI.

Tabla 12. Secuencias aminoacídicas deducidas para las proteínas PLA2, 7DB, RP-60S, HSP90, apirasa y mougrina de *O. moubata*.

Secuencia	
PLA2	1 MTKENQTLVEQYLKCEDLGNVSEVGKMMSLDRFGSAVTLATGNTFATQNQIDAADAEYVRN 61 CTWHPLMMRTPRDVLLLRWNKNGDYIYPGKWCAGNKSERTGDYGTNNETDKCCEAHDN 121 ATDYMLSRSYANRMTWNPYYTNTNCADDAKLFDCLLKANTSGSLEFGQAFFDALQVPC 181 FANTYKRDCQSWWDGFAYRYPKCKPWNKTAENWTLIDPPNFYFTFLRVNHNDTYEAAN 241 DIYSWKEVCKLDES LNCWNYTWLNSSIKTTK
7DB	1 MHLISFGSLALFYGVFATFIIEDLPGILNGTGEDYEDYDYGPKNLTECDHASRPLPGSN 61 ETYTCSHLCTSGYANEEDGKWCTTTTITQTSTYDEWVNGTCRNGTCVTNASP
RP-60S	1 MRRPARCYRCKNKYPKSRFCRGVDPDKIRIFDLGRKKARVDFPLCVHLISKEFEQI 61 SSEALEAGRICANKYLKTKCGKDAFHLRMLRHPFHVIRINKMLSCAGADRLQTMGRGAF 121 KPQGTVARVHIGQKIMSVRVKEQHKENVI EALRRAKFKFPGRQKVCLSKKWGFTKVGTPA 181 TTRKCVLTGRLKTRSVRTATTTAATDL
HSP90	1 MPEEAQMEETGEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESL 61 TEPTKLDQAQKELFIKIIPNRDRDRLTIIDTIGIMTKADLNNLGTIAKSGTKAFMEALQA 121 GADISMIQFGVGFYSAYLVADKVTVTSKHNDDEQYTWESAAGGSFTIRADNTEPLGRGT 181 KIVLHLKEDQTEYLEERRVKEVVKKHSQFIGYPIKLLVQKEREKEVSDDEEEEEKKEKK 241 EEDDEEGKPKIEDVDEDEDKDKGKKKKIKIKEYSEDEELNKTKPIWMRNPDDISQEEYGE 301 FYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFPKRAPFDLLENRQKNNIKLYVRRVIM 361 DNCEDLIPEYLNFIKGVVDEDLPLNISREMLQQNKILKVIKKNLVKKCLELFDTVADR 421 EMYKKFYEQFSKNMKGIHEDSQNRKLAFLRYTSSSGDEMCSLKDYVSRMKENQKHI 481 YFITGESKEQVANSAFVERVQRQGFVYIYMIPIDEYCVQQLKEYDGKTLVSVTKELEL 541 PEDDAEKKRQEENSRLRTCARS
Apirasa	1 MLKHFFLAFSLLLAVSNAKPAATPKPKCPKAPDGFLLTILHTNDIHSDFESNQWGGPC 61 VPKNKTDHCVAGVTRLATLVKKMKKEYPKALFMNAGDFYQGSVWYTVLKDRIVSAVMKE 121 LKYNAVSLGNHEFDGPDGLAPFLGNMSEAGVKVIATNVDTKDEPIKDKVLLKSHTFCV 181 EGRRVGVIGAVTEETRTIAKPGNALIKDVIPLSQEEAKRLKAKGVEIIVTITHTGYDVP 241 YIVGNITELDILVGGHTNTFLYNGTPTTKDKVEGQYPTVVERPDGSRGLIVQDFWFGKYL 301 GFLQVTFDSKGNVNSWQGNP I FVNHSYEEDESMKKPLEPFREIVNEAGRRI GSSKVVLS 361 ADNKTCLNECNMNMVTDSEFLAYYADQDSEPTMWSNVAAAVVNSGFARSSLPKSDKLT 421 FDIRALPYESSLVVLTLLKGTDLRKMFEHSAQFTVTADPRGEFLAVSGMKVKYDLKKA 481 NKRVVYLRILCTQCVVPRYEVVKNQTYKIATTSYIANGGDGFEFDKEVIKTKGVVDSE 541 VYLPYIMKMSPLKTAVEGRIFIRNYPKPAISSRYDMSWKQELIW
Mougrina	1 MQAKILVFAFVLLSVAVLAYGYVDECNETPMYRCPGDEDRISGWTYDHSSENDCCRLLCG 61 EKW

Tabla 13. Datos relativos al número de aminoácidos (aa), punto isoeléctrico (pI) y peso molecular en kDa (PM), presencia/ausencia de péptido señal, hélices transmembrana, señales de secreción no clásicas y sitios de anclaje tipo GPI de las proteínas PLA2, 7DB, RP-60S, HSP90, apirasa y mougrina de *O. moubata*.

Proteína	aa	pI	PM	Péptido señal	Hélices transmembrana	Señales secreción no clásicas	GPI
PLA2	271	5,71	31,44	No	No	Si	No
7DB	113	4,22	12,38	Si	No	Si	No
RP-60S	207	10,66	23,56	No	No	No	No
HSP90	563	5,03	65,73	No	No	No	No
Apirasa	584	8,69	65,23	Si	No	Si	No
Mougrina	63	4,64	7,21	Si	Si	No	No

5.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

5.2.1. Expresión y purificación de las proteínas clonadas en pQE-30: PLA2, 7DB, RP-60S, actina, apirasa y HSP90.

El cDNA codificante de estas proteínas se clonó en el vector de expresión pQE-30. En el caso de la 7DB y la apirasa, se expresaron versiones truncadas, sin péptido señal, por ser más parecidas que las proteínas completas a los péptidos nativos maduros inoculados al hospedador con la saliva.

En las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, tras la inducción con IPTG, todas estas proteínas, excepto la HSP90, se expresaron en forma insoluble, por lo que fue necesario solubilizarlas con urea 8 M para purificarlas, retirándose la urea posteriormente durante el proceso de purificación.

Por su parte, la HSP90 no pudo ser obtenida. Durante su inducción con IPTG la densidad óptica del cultivo disminuyó en lugar de aumentar y no se recuperó nada de esta proteína a partir del lisado celular.

En la figura 38 se muestran los resultados de la expresión y purificación de 7DB, RP-60S, actina y apirasa, así como la prueba de expresión de HSP90.

Todas las proteínas purificadas migraron en los geles de poliacrilamida como una única banda, con un peso molecular estimado que coincidía con la predicción teórica excepto la 7DB, cuyo peso molecular estimado en los geles (24 kDa) era el doble que la predicción teórica (12,5 kDa). Ante esta discrepancia, la banda correspondiente se analizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la comparación en las bases de datos confirmó la identidad de la recombinante como un miembro de la familia 7DB.

El rendimiento final de la expresión y purificación de cada una de estas proteínas se indica en la tabla 14.

Tabla 14. Rendimiento de la producción de las recombinantes expresadas en pQE-30.

Proteína	Rendimiento (mg/L)
PLA2	17,4
7DB	13
RP- 60S	19
Actina	2,5
Apirasa	18

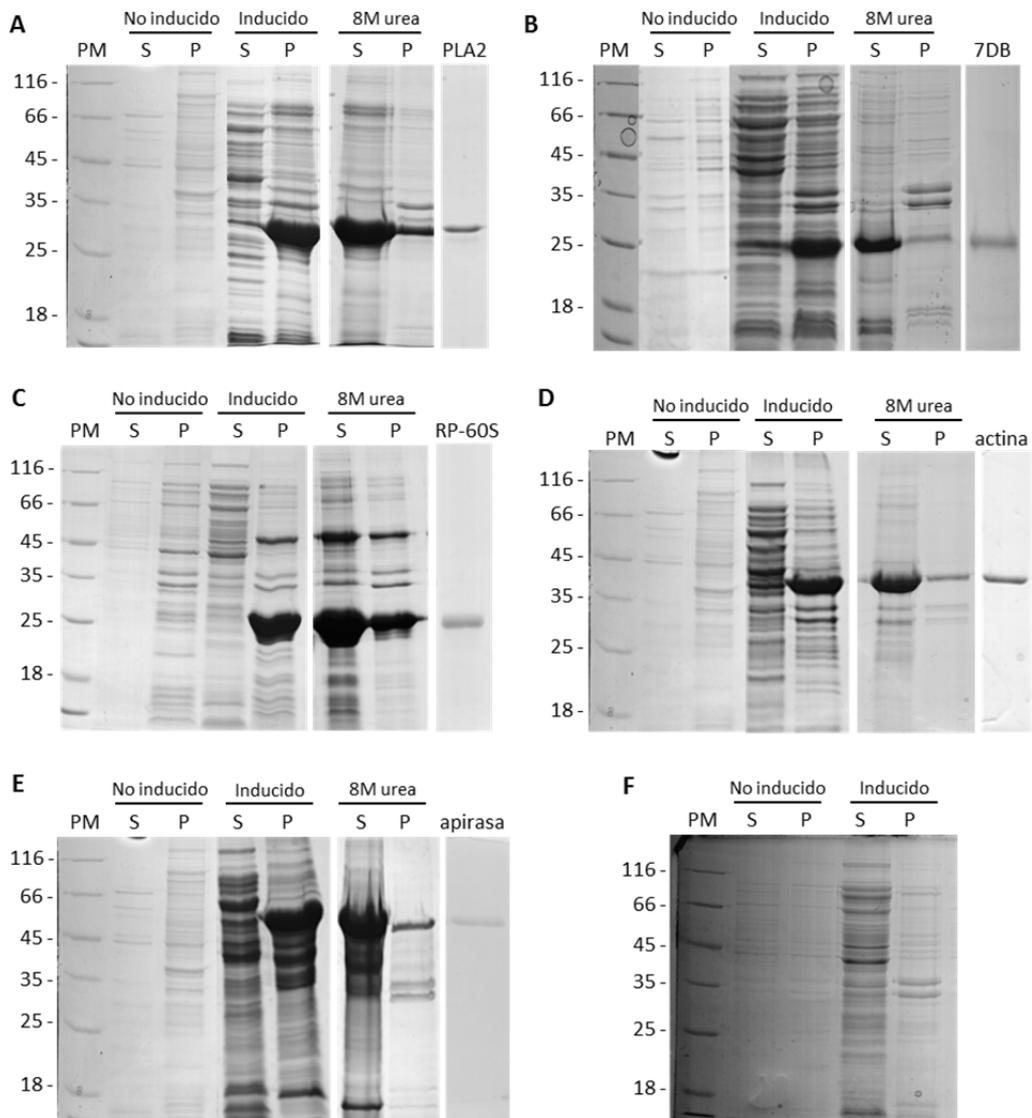


Figura 38. Expresión y purificación de: **(A)** PLA2; **(B)** 7DB; **(C)** RP-60S; **(D)** Actina; **(E)** Apirasa y **(F)** HSP90. Geles de poliacrilamida al 12 % teñidos con azul de Coomassie. Sobrenadantes (S) y sedimentos (P) de los lisados celulares antes y después de la inducción con IPTG, así como de los sobrenadantes y sedimentos después de la solubilización con urea 8 M. El último carril de cada imagen, salvo el F, muestra la proteína recombinante purificada. PM, marcador de pesos moleculares, valores expresados en kDa.

5.2.2. Expresión y purificación de mougrina-GST.

Por su pequeño tamaño, la mougrina se clonó en el vector pGEX-4T-1 para obtenerla como proteína de fusión con GST a fin de potenciar su inmunogenicidad.

En las condiciones utilizadas para la expresión de la proteína, la mougrina-GST se expresó de forma insoluble, por lo que se purificó directamente a partir del sedimento de la lisis celular mediante electroelución de geles de poliacrilamida.

La proteína purificada migró en los geles de poliacrilamida como una única banda de 35 kDa, de acuerdo con la predicción teórica (7,21 kDa para la mougrina y 35 kDa para la proteína de fusión con GST). El rendimiento final de la purificación de esta proteína fue de 24 mg de proteína por litro de cultivo.

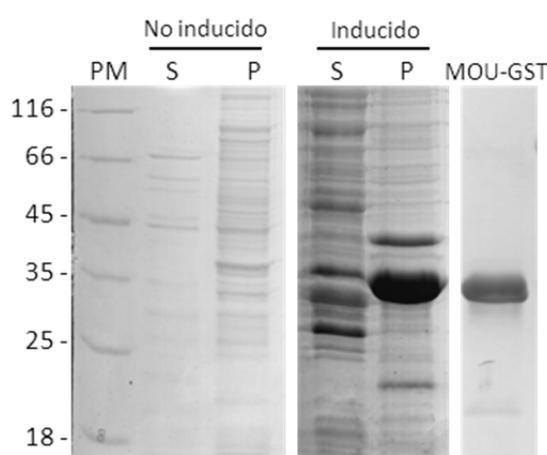


Figura 39. Expresión y purificación de mougrina-GST. Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul de Coomassie. Sobrenadante (S) y sedimento (P) del lisado celular antes y después de la inducción con IPTG. MOU-GST, proteína de fusión con GST purificada mediante electroelución. PM, marcador de pesos moleculares, valores expresados en kDa.

5.3. Ensayos de vacunación. Valor protector frente a *O. moubata*.

5.3.1. Título y especificidad de los sueros hiperinmunes.

Todos los sueros de los animales inmunizados presentaron alta reactividad frente a la proteína homóloga (DO > 1 y título superior a 1/12.800), excepto los conejos vacunados con la RP-60S, que presentaron DOs en torno a 0,4 y títulos de 1/1.600 (Figura 40A).

Además, todos estos sueros reaccionaron con la saliva con una intensidad media (DO entre 0,25 y 0,5) salvo los de los conejos vacunados con 7DB y RP-60S, que presentaron una reactividad baja (DO < 0,2), apenas el doble que la del correspondiente suero preinmune (Figura 40B).

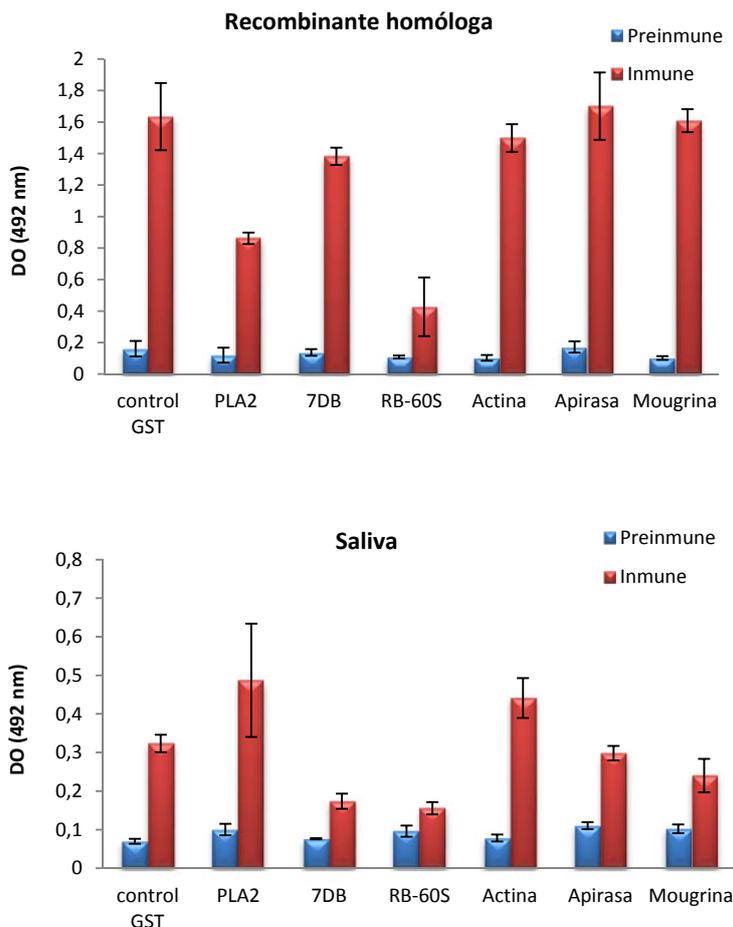


Figura 40. ELISA. Niveles séricos de IgG total (DO media y desviación estándar) en los conejos vacunados con cada una de las proteínas recombinantes: **(A)** frente a la proteína recombinante homóloga y **(B)** frente a la saliva.

La especificidad de los sueros se comprobó por western blot, enfrentando cada suero con la proteína homóloga y con la saliva de *O. moubata*.

Como se observa en la figura 41A, todos los sueros hiperinmunes reconocieron a su proteína homóloga. En el caso de la PLA2, los sueros revelaron hasta tres bandas, de unos 38, 68 y 100 kDa.

En la saliva (Figura 41B), los sueros anti-PLA2, anti-actina, anti-apirasa y anti-GST-mougrina, reconocieron específicamente a su proteína homóloga nativa. En el caso de los sueros anti-PLA2 ésta fue una banda de unos 68 kDa y, en el caso de la GST-mougrina, una banda próxima al tamaño de la GST. Los sueros anti-7DB y anti-RP-60S no revelaron ninguna banda en la saliva.

Por su parte, los sueros preinmunes no reaccionaron con ninguna de las proteínas recombinantes ni con ningún componente de la saliva (datos no mostrados).

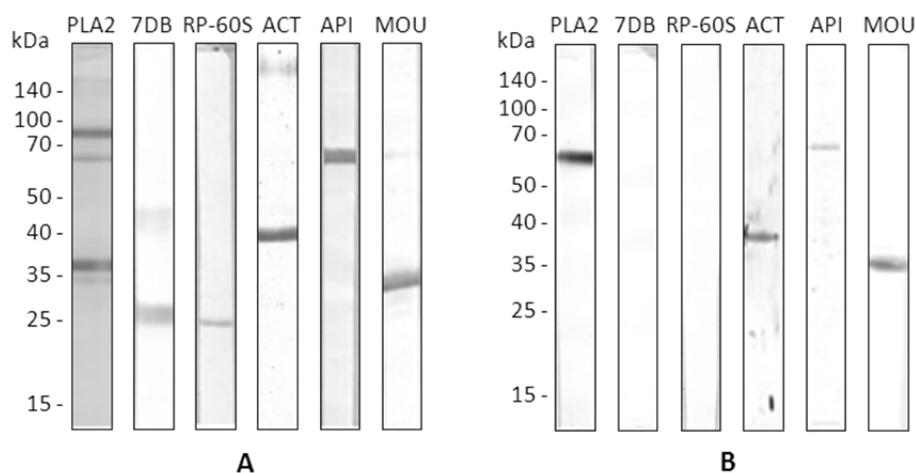


Figura 41. Western blot. Antígenos reconocidos por los sueros de los conejos vacunados con las recombinantes PLA2, 7DB, RP-60S, actina (ACT), apirasa (API) y mougrina-GST (MOU): **(A)** sobre la proteína recombinante homóloga y **(B)** sobre la saliva de *O. moubata*.

5.3.2. Acción de la respuesta inmunitaria inducida por las proteínas recombinantes sobre los parásitos.

Los ejemplares alimentados sobre los grupos control 1 (vacunados con GST) y control 2 (tratados sólo con el adyuvante) no experimentaron ningún efecto adverso, de modo que los parámetros medidos en ellos fueron prácticamente idénticos en ambos grupos. En consecuencia fueron reunidos en un único grupo control para facilitar las comparaciones posteriores.

El efecto de la respuesta inmunitaria inducida por las recombinantes sobre las garrapatas alimentadas en los otros grupos de conejos fue la siguiente:

Tiempo de alimentación. No se observaron diferencias en el tiempo de alimentación, ni en el número de ejemplares alimentados y desprendidos en una hora, entre los grupos vacunados y el control en ninguna de las fases evolutivas.

Cantidad de sangre ingerida. Se observó una reducción significativa, respecto al grupo control, en la cantidad de sangre ingerida por las hembras y las ninfas-3 alimentadas sobre los conejos de todos los grupos vacunados, así como en la sangre ingerida por los machos alimentados sobre los conejos vacunados con actina, apirasa y mougrina.

Para todas las fases evolutivas, la mayor reducción en la ingesta se observó en el grupo vacunado con apirasa (Tabla 15).

Tabla 15. Cantidad de sangre ingerida (mg) por los ejemplares de *O. moubata* alimentados sobre los conejos control o vacunados con las diferentes proteínas recombinantes (media \pm desviación estándar). Porcentaje de reducción en la cantidad de sangre ingerida respecto al grupo control (media por grupo).

	Machos		Hembras		Ninfas-3	
	mg sangre	% reducción	mg sangre	% reducción	mg sangre	% reducción
Control	28,1 \pm 4,3	-	233,1 \pm 16,5	-	26,3 \pm 3,1	-
PLA2	27,2 \pm 3,2	3,2 \pm 11,6	186,4 \pm 19,2**	20,1 \pm 8,5**	21,6 \pm 2,5**	18,1 \pm 10**
7DB	27,2 \pm 6,5	3,1 \pm 24,1	173,3 \pm 26,4**	25,6 \pm 11,8**	21,5 \pm 0,9**	18,6 \pm 3,6**
RP-60S	25,3 \pm 0,3	10,2 \pm 1,0	204,4 \pm 14,5**	12,3 \pm 6,4**	21,4 \pm 1,6**	18,8 \pm 6,4**
Actina	23,6 \pm 4,7*	16,0 \pm 6,6**	190,5 \pm 29,6**	18,3 \pm 13**	21,8 \pm 0,7**	17,4 \pm 2,8**
Apirasa	19,6 \pm 1,3**	30,5 \pm 4,8**	172,2 \pm 5,7**	26,1 \pm 2,5**	15,9 \pm 2,1**	39,7 \pm 8**
Mougrina	19,7 \pm 2,7**	30,0 \pm 9,7**	185,4 \pm 18,2**	20,45 \pm 8**	19,9 \pm 4,3**	24,2 \pm 16,6**

* $p < 0,05$ respecto al grupo control

** $p < 0,01$ respecto al grupo control

Fecundidad de las hembras. Se analizó contabilizando el número de huevos depositados y el número de ninfas-1 emergentes por cada hembra. Con estos datos se calcularon el % de huevos viables y el índice de reproducción (ninfas-1 por hembra / número medio de ninfas-1 por hembra en el grupo control) (Tabla 16). En todos los grupos vacunados se observaron reducciones en el número de huevos depositados y de ninfas-1 emergentes. La reducción en el número de ninfas-1 fue significativa para 7DB ($p < 0,05$) y muy significativa para PLA2, apirasa y mougrina ($p < 0,01$). Esto se tradujo en descensos igualmente significativos en el índice de reproducción de las hembras alimentadas en los conejos vacunados con PLA2, apirasa y mougrina.

Tabla 16. Número y viabilidad (%) de los huevos depositados por cada hembra de las alimentadas sobre los conejos control o vacunados con las diferentes proteínas recombinantes (media \pm desviación estándar). Número de ninfas-1 e índice de reproducción respecto al control (ninfas-1/media de ninfas-1 en el grupo control).

	Nº huevos / hembra	% viabilidad	Nº ninfas-1 / hembra	Índice de reproducción
Control	209,3 \pm 14,9	90,4 \pm 4	189,1 \pm 14,3	1,00 \pm 0,07
PLA2	160,5 \pm 36,8**	91,4 \pm 2,3	146,3 \pm 32**	0,77 \pm 0,17**
7DB	192,9 \pm 5,9	87,5 \pm 3,8	168,9 \pm 10,1*	0,88 \pm 0,05*
RP-60S	181,7 \pm 2*	94,6 \pm 1,8	171,9 \pm 5	0,90 \pm 0,03
Actina	194,8 \pm 13,6	91,6 \pm 2,1	178,3 \pm 8,5	0,93 \pm 0,04
Apirasa	153,6 \pm 6,1**	91,3 \pm 2,9	140,3 \pm 8,6**	0,74 \pm 0,04**
Mougrina	142,5 \pm 8,9**	87,4 \pm 7,9	116,9 \pm 25,2**	0,61 \pm 0,13**

* $p < 0,05$ respecto al grupo control

** $p < 0,01$ respecto al grupo control

Tasa de muda de las ninfas-3. No se registraron diferencias significativas en la tasa de muda de las ninfas-3 entre los grupos vacunados y el grupo control, observándose que todas las ninfas supervivientes mudaron con normalidad (resultados no mostrados).

Porcentaje de mortalidad e índice de supervivencia. Las mayores tasas de mortalidad se registraron en los ejemplares alimentados sobre los conejos vacunados con PLA2 (en todas las fases evolutivas), siendo significativamente superiores a las registradas en el grupo control ($p < 0,01$) (Tabla 17).

La apirasa en machos y la RP-60S y la actina en hembras y ninfas-3 también provocaron mortalidades significativas ($p < 0,05$).

Tabla 17. Mortalidad (%) de los ejemplares de *O. moubata*, alimentados sobre los conejos control o vacunados con las diferentes proteínas recombinantes (media \pm desviación estándar). Índice de supervivencia respecto al control: número de supervivientes/media de supervivientes en el grupo control (media \pm desviación estándar).

	Machos		Hembras		Ninfas-3	
	% mortalidad	Índice de supervivencia	% mortalidad	Índice de supervivencia	% mortalidad	Índice de supervivencia
Control	4,3 \pm 3,6	1,00 \pm 0,04	5 \pm 3	1,00 \pm 0,03	2,7 \pm 3,4	1,00 \pm 0,03
PLA2	18,6 \pm 3,9**	0,85 \pm 0,04**	31,6 \pm 21,1**	0,72 \pm 0,22**	11,3 \pm 7,9**	0,92 \pm 0,08**
7DB	8 \pm 0	0,96 \pm 0	4,4 \pm 3,3	1,00 \pm 0,35	6 \pm 2,9	0,97 \pm 0,03
RP-60S	10,7 \pm 3,9	0,93 \pm 0,04	15,6 \pm 11,7*	0,89 \pm 0,12*	12 \pm 1,7**	0,91 \pm 0,02**
Actina	2,7 \pm 3,9	1,02 \pm 0,04	15,6 \pm 8,6*	0,89 \pm 0,09*	6,7 \pm 0,9*	0,97 \pm 0,01*
Apirasa	16 \pm 4,4**	0,88 \pm 0,21**	2,2 \pm 3,2	1,03 \pm 0,03	4 \pm 0	0,99 \pm 0,00
Mougrina	5,3 \pm 3,9	0,99 \pm 0,04	8,9 \pm 3,2	0,96 \pm 0,03	2,7 \pm 3,9	1,00 \pm 0,04

* $p < 0,05$ respecto al grupo control

** $p < 0,01$ respecto al grupo control

Eficacia protectora. Por último, la eficacia protectora de cada una de las proteínas recombinantes se calculó a partir de los índices de supervivencia y reproducción de las hembras, por ser estos parámetros los que determinan en mayor medida la evolución del tamaño de las poblaciones del parásito (Tabla 18).

Según este índice, la recombinante más eficaz fue la PLA2 (44,5 %), seguida por la mougrina (41,4 %) y la apirasa (23,8 %). Las proteínas menos eficaces fueron la RP-60S, actina y 7DB, todas ellas con eficacias inferiores al 20 %, aunque estadísticamente significativas.

Tabla 18. Protección obtenida con las distintas proteínas recombinantes. Calculado en función del número de hembras supervivientes que realizaron la puesta (índice de supervivencia) y del número de ninfas-1 producidas por dichas hembras supervivientes (índice de reproducción): $100 \times (1 - \text{índice de supervivencia de las hembras} \times \text{índice de reproducción})$.

	Índice de supervivencia	Índice de reproducción	% eficacia protectora
PLA2	0,72	0,77	44,5**
7DB	1,00	0,88	12,0*
RP-60S	0,89	0,90	19,9**
Actina	0,89	0,93	17,3**
Apirasa	1,03	0,74	23,8**
Mougrina	0,96	0,61	41,4**

* $p < 0,05$ respecto al grupo control

** $p < 0,01$ respecto al grupo control

DISCUSIÓN

La capacidad de los Organismos e Instituciones encargados de velar por la salud pública, para evaluar y predecir los riesgos asociados a los patógenos transmitidos por garrapatas depende, en buena medida, del conocimiento preciso tanto de la abundancia y distribución de las poblaciones de garrapatas que actúan como vectores, como de la evolución de dichas poblaciones a lo largo del tiempo, haciendo necesaria una vigilancia epidemiológica constante.

En relación con las especies del género *Ornithodoros*, su estilo de vida endófilo/nidícola y su alimentación rápida hacen que la vigilancia epidemiológica basada en la búsqueda directa de los parásitos en el terreno sea impracticable en estudios a gran escala y han estimulado el desarrollo de métodos serológicos de detección indirecta.

Estos métodos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a las proteínas salivales de la garrapata en el suero de los hospedadores (animales y personas) presentes en el área de estudio y han demostrado su utilidad en la localización de poblaciones de *O. erraticus* en el sur de Europa (Oleaga-Pérez et al., 1994) y de *O. moubata* en Madagascar (Ravaomanana et al., 2011), señalando, al mismo tiempo, la conveniencia de utilizar antígenos salivales recombinantes en lugar de extractos salivales (SGE).

La aplicación de estos métodos para la localización precisa de *O. moubata* en África en el entorno doméstico y peridoméstico puede ayudar a identificar zonas de riesgo de transmisión de Peste porcina africana y de Fiebre recurrente humana, contribuyendo a evitar la expansión de estas enfermedades hacia zonas adyacentes (Cutler et al., 2009; Penrith et al., 2013).

Por todo ello, el primero de los objetivos de la presente tesis doctoral fue el desarrollo de un antígeno recombinante para el diagnóstico serológico de los parasitismos por *O. moubata* que permita la localización de poblaciones de esta garrapata de una forma rápida, sensible y fiable, evitando los inconvenientes derivados del uso de extractos antigénicos de composición compleja y poco conocida, como el SGE.

CLONAJE Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE TSGP1 DE *O. MOUBATA*. PRODUCCIÓN EN FORMA RECOMBINANTE Y ANÁLISIS DE SU UTILIDAD COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.

La elección de TSGP1 como antígeno diagnóstico se basó en nuestros resultados previos, los cuales señalaban al antígeno salival 20A1 como el mejor candidato (Baranda et al., 2000), el cual fue posteriormente identificado como un ortólogo de la lipocalina TSGP1 de *O. savignyi* (Oleaga et al., 2007).

En consecuencia, procedimos a la obtención de la secuencia de cDNA de la TSGP1 en *O. moubata* y de la correspondiente secuencia de aminoácidos. Una vez obtenidas, comprobamos primero que la proteína madura, sin el péptido señal, coincidía en peso molecular, punto isoeléctrico y secuencia N-terminal con las del antígeno 20A1 purificado por

Baranda et al. (2000) e incluía a los dos péptidos internos obtenidos por Oleaga et al. (2007), demostrando que, tal como habíamos anticipado, dicho antígeno era una isoforma de TSGP1.

A continuación llevamos a cabo una búsqueda por BLASTp utilizando la secuencia de aminoácidos de la OmTSGP1 y seguidamente un análisis filogenético de las proteínas recuperadas en dicha búsqueda. Estos análisis confirmaron que OmTSGP1 es un ortólogo de la TSGP1 de *O. savignyi* (con un 65 % de identidad de secuencia) y demostraron que pertenece al grupo de las lipocalinas que unen aminas biogénicas de argáidos definido por Mans et al. (2008b), las cuales se caracterizan por conservar un patrón de aminoácidos prácticamente idéntico en el motivo de unión a aminas biogénicas (Figuras 3 y 4), a pesar de que en conjunto, y salvo ambas TSGP1, estas proteínas presentan entre sí una identidad de secuencia que cabe calificar de baja (entre el 32 % y el 17 %).

El análisis filogenético también puso de manifiesto que todas estas lipocalinas se agrupan en dos clados bien definidos, los cuales se corresponden, respectivamente, con los géneros *Argas* y *Ornithodoros*. Según Mans et al. (2008b) y Mans y Ribeiro (2008), esto sugiere que ambos clados son grupos ortólogos con un origen monofilético y que, tras la divergencia de ambos géneros, fenómenos repetidos de duplicación génica pudieron dar origen a varios grupos de genes parálogos y familias proteicas multigénicas con función redundante. Esto podría explicar el origen de las 18 isoformas de TSGP1 detectadas por Oleaga et al. (2007) en el SGE de *O. moubata*.

Llama la atención que tres de las proteínas identificadas en el análisis BLASTp (pertenecientes a *O. parkeri*) están anotadas como “moubatin-like” (Francischetti et al., 2008a), lo cual puede generar cierta confusión en cuanto a su posible función. Cabe señalar, no obstante, que la búsqueda por BLASTp utilizando cualquiera de esas tres secuencias de *O. parkeri* recuperó siempre a la TSGP1 (de *O. moubata* o de *O. savignyi*) como mejor coincidencia en especies distintas de *O. parkeri*, lo que sugiere que la relación filogenética y funcional de estas “moubatin-like proteins” con TSGP1 es más estrecha que con la propia moubatina, en concordancia con el hecho de que todas ellas conserven un motivo BAB casi idéntico (Mans et al., 2008b).

Por su parte, el análisis comparativo de las estructuras secundaria y terciaria de las dos TSGP1 de *O. moubata* y *O. savignyi* mostró que éstas eran muy similares entre sí (Figuras 5 y 6) y, a la vez, prácticamente idénticas (100 % de precisión) a las de las tres lipocalinas del mismo grupo funcional, todas del género *Argas*, que sirvieron de referencia para el modelado tridimensional de las TSGP1 (las lipocalinas AM-182, arg-r-1 y monomina).

De estos resultados cabe deducir que la TSGP1 de *O. moubata* tiene una función biológica similar a la TSGP1 de *O. savignyi*, esto es, la unión a histamina y serotonina y su retirada de la lesión de alimentación evitando el edema y el prurito inducido por estos mediadores, algo que parece ser crucial para que estas garrapatas puedan completar la toma de sangre (Francischetti et al., 2008a; Mans et al., 2008b). Es más, la gran abundancia de TSGP1 observada por Oleaga et al. (2007) en el SGE (> 90 %) y en la saliva en el presente trabajo (90 % en hembras y 31,5 % en machos, Figuras 12 y 13), junto con las 18 isoformas de

TSGP1 expresadas por sus glándulas salivales, sugieren que la TSGP1 es el principal secuestrador de histamina y serotonina de *O. moubata*. Dicha abundancia y la redundancia funcional proporcionada por la multiplicación de isoformas de TSGP1 parecen ser necesarias para la retirada efectiva de la histamina y serotonina que pueden acumularse en el sitio de alimentación (Mans et al., 2008b; Ribeiro y Arcà, 2009). De este modo, la garrapata podría utilizar diferentes isoformas de TSGP1 a medida que éstas son neutralizadas por el sistema inmunitario del hospedador. Así, cada individuo no expresaría simultáneamente todas las isoformas, sino una o algunas de ellas. Esta estrategia evasiva se ha demostrado ya en otras garrapatas, como, por ejemplo, en relación con las proteínas de la familia IxAC de *I. ricinus*, que actúan como inhibidores de la vía alternativa del complemento (Couvreur et al., 2008).

Tras haber analizado la estructura molecular de la OmTSGP1 y anotado su previsible función biológica en la interfase garrapata-hospedador, pasamos a producirla en forma recombinante para evaluar su eficacia diagnóstica en comparación con el SGE. Para ello se expresó una versión truncada de la misma, sin péptido señal (rtOmTSGP1), en lugar de la proteína completa, porque la versión truncada es más similar al antígeno nativo maduro inoculado al hospedador con la saliva y porque se obtuvo un mayor rendimiento en proteína en las pruebas previas de expresión y purificación de ambas versiones.

La sensibilidad y especificidad de rtOmTSGP1 en la detección de anticuerpos anti-*O. moubata* se compararon por ELISA con las del SGE, enfrentado ambos antígenos con una colección de 172 sueros porcinos bien definidos, clasificados de acuerdo con su origen y especificidad.

Tras someter los resultados del ELISA a un análisis ROC y establecer los correspondientes umbrales de positividad/negatividad (Figura 8; Tablas 1 y 2), dicho análisis mostró que la reactividad del SGE era mayor o igual a la de rtOmTSGP1 con todos los grupos de sueros, incluidos los cuatro grupos de sueros negativos. Esto es lógico si tenemos en cuenta que utilizando el SGE como antígeno se pueden detectar anticuerpos frente a otras proteínas salivales y no sólo los específicos frente a TSGP1. En cualquier caso, ambos antígenos mostraron una sensibilidad del 100 % pudiendo detectar IgG anti-*O. moubata* en cerdos desde los 7 días después de la primera picadura hasta, al menos, dos meses y medio después del último contacto cerdo-garrapata.

La especificidad de la rtOmTSGP1 se comparó con la del SGE analizando la reactividad de ambos antígenos con todos los sueros negativos, tanto los de cerdos infestados experimentalmente con *O. erraticus* y otros ectoparásitos diferentes de *O. moubata*, como los de cerdos procedentes de explotaciones en extensivo de la provincia de Salamanca, los cuales, por su modo de vida, libre en el campo, estuvieron expuestos a una gran variedad de ectoparásitos, pero no a *O. moubata*, ya que esta especie no se encuentra presente en España. Los resultados mostraron una notable diferencia de especificidad entre ambos antígenos con los sueros negativos de campo, entre los cuales, utilizando el SGE, obtuvimos un 13 % de falsos positivos frente al 1 % de la rtOmTSGP1 (Tabla 2). Además, la rtOmTSGP1 mostró una reactividad muy baja con todos los sueros negativos, experimentales y de campo (1,96 % de índice serológico medio), en comparación con la del SGE (8,67 % de índice serológico medio),

mejorando así la discriminación entre sueros negativos y positivos. Este hecho es particularmente importante en la detección de sueros positivos con baja reactividad, que con el SGE podrían llegar a pasar desapercibidos. En conjunto, la rtOmTSGP1 mostró una especificidad del 99,4 %, mientras que la del SGE fue del 91,5 %, comparable al 90 % de especificidad estimada por Oleaga-Pérez et al. (1994) para el extracto equivalente de *O. erraticus*.

En definitiva, los resultados muestran que el antígeno recombinante rtOmTSGP1 posee una mayor eficacia diagnóstica (99,70 %) que el SGE (95,75 %) en la detección por ELISA de anticuerpos anti-*O. moubata* (Tabla 1). Esta mayor eficacia diagnóstica, unida a su composición bien definida y a la facilidad de producción en grandes cantidades, lo convierten en una herramienta útil para detectar, de forma específica, rápida y fiable a los animales expuestos a *O. moubata* y localizar así poblaciones de esta garrapata en muestreos epidemiológicos en el entorno sinantrópico. Esto puede contribuir al diseño y adopción de estrategias específicas para el control eficaz de esta garrapata y de las enfermedades que trasmite.

Estos resultados han permitido obtener la patente del antígeno recombinante rtOmTSGP1 (ES2388026), el cual se está aplicando actualmente en varios países africanos, con objeto de detectar a los animales (cerdos domésticos, facocheros y potamóqueros) expuestos a *O. moubata* y evaluar el papel de esta garrapata en la epizootiología de la Peste porcina africana en las zonas endémicas examinadas.

El segundo objetivo general de esta tesis doctoral fue la identificación de antígenos protectores para el desarrollo de vacunas frente a *O. moubata* como método de control. Este objetivo se abordó a través de los objetivos específicos 2 al 5 indicados en la introducción.

ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE *O. MOUBATA*.

Debido a que la saliva de las garrapatas, por su contenido en proteínas antihemostáticas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, puede ser una fuente de antígenos potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas anti-garrapata (Maritz-Olivier et al., 2007; Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Wikel, 2013), y teniendo en cuenta que la composición de la saliva de *O. moubata* se desconoce casi por completo, consideramos conveniente llevar a cabo un análisis proteómico de la misma.

Para ello se recogieron muestras de saliva de ejemplares estimulados con pilocarpina o con dopamina evitando su contaminación con otros fluidos, como el fluido coxal, que algunos ejemplares también emitieron. La saliva de las hembras y de los machos se recogió por separado debido a las evidencias previamente obtenidas que sugerían que su composición puede diferir entre sexos. Como muestran los resultados de la figura 9, el análisis comparativo de varios lotes de saliva de ambos sexos, obtenidos tanto con pilocarpina como con dopamina, demostró la reproducibilidad de ambos protocolos usados para inducir la salivación, y la

reproducibilidad de la composición de la saliva entre lotes del mismo sexo, y confirmó las diferencias previamente observadas en la composición de la saliva entre sexos (Figura 9).

Tras obtener la cantidad de saliva de cada sexo que consideramos necesaria para nuestras pruebas, ecualizamos ambas muestras para facilitar la identificación de las proteínas minoritarias. La necesidad de ecualizar la saliva fue asumida basándonos en nuestra experiencia previa con el SGE, en el cual, la gran abundancia de la lipocalina TSGP1 dificultaba la detección de las proteínas menos abundantes (Oleaga et al., 2007; Pérez-Sánchez et al., 2010b). De hecho, y como pudimos comprobar tras los análisis proteómicos de dicha saliva, la TSGP1 fue la proteína mayoritaria en la saliva no ecualizada de hembras, y la segunda, después de la GAPDH, en la saliva no ecualizada de machos (Figuras 12 y 13). De modo que, tal como habíamos supuesto, cuando la ecualización retiró el “exceso” de TSGP1 y otras proteínas mayoritarias, el número de nuevas proteínas identificadas en las muestras ecualizadas aumentó de forma muy significativa, particularmente en las hembras, en las que el porcentaje de nuevas identificaciones (228 %) prácticamente triplicó al de los machos (67 %) (Figura 10, Tabla 3).

En conjunto se identificaron 193 proteínas diferentes en la saliva de *O. moubata* (entre machos y hembras) evidenciando una amplia y compleja composición, comparable a la complejidad observada en los sialomas de argásidos e ixódidos descritos por otros autores (Francischetti et al., 2008a, 2008b, 2009; Karim et al., 2011; Ribeiro et al., 2011). Cuando efectuamos el análisis de la identidad, posibles funciones y clasificación de estas proteínas, surgieron varias cuestiones controvertidas que comentamos seguidamente.

En primer lugar, esperábamos identificar a la mayoría, si no todas, de las proteínas de la saliva de *O. moubata* que ya han sido caracterizadas y se encuentran depositadas en las bases de datos, incluyendo algunos agentes antihemostáticos y antiinflamatorios bien conocidos como ornitorina, TAP y OmCl (Waxman et al., 1990; van de Locht et al., 1996; Roversi et al., 2007), los cuales, sin embargo no fueron detectados en nuestros análisis. Aunque asumimos que estas proteínas se encontrarían en la saliva en concentraciones fisiológicamente relevantes, el hecho de no haberlas identificado en las muestras de saliva nativa lo atribuimos a la gran abundancia de proteínas como la TSGP1, que, como ocurrió con el SGE, pudo dificultar la detección de las proteínas menos representadas. No obstante, esto no explicaría por qué no se detectaron las proteínas mencionadas en las muestras ecualizadas, en las cuales, teóricamente y de acuerdo con los inventores (Righetti et al., 2006) y los fabricantes del kit utilizado para la ecualización (ProteoMiner; Bio-Rad), éstas se encontrarían en un estrecho rango de concentraciones, previsiblemente superiores al umbral de sensibilidad del procedimiento proteómico utilizado en el análisis (LC-MS/MS). Como posibles explicaciones cabe sugerir: (i) que algunas proteínas pudieron perderse durante el proceso previo de liofilización y diálisis; (ii) el hecho de que para la ecualización se utilizó una cantidad de proteína (3 mg) por debajo de la recomendada por el fabricante (10 mg), pudiendo no alcanzarse el umbral de sensibilidad con algunas proteínas y (iii) el hecho demostrado por algunos autores (Keidel et al., 2010) de que las proteínas de la muestra pueden ser retenidas por las microesferas del kit ProteoMiner mayoritariamente a través de interacciones

hidrofóbicas inespecíficas y en menor medida como consecuencia de la unión específica y saturable a los hexapéptidos, lo que habría provocado la pérdida de las proteínas más hidrofílicas, como, por ejemplo, las tres anteriormente mencionadas.

En segundo lugar, entre las proteínas identificadas encontramos un porcentaje de proteínas intracelulares (77,5 %) bastante superior al encontrado por otros autores en sialomas de garrapatas blandas, en los que las proteínas intracelulares representan el 60 % (Francischetti et al., 2008a, 2008b; Mans et al., 2008a). Este hecho resulta aún más llamativo si tenemos en cuenta que tales sialomas se obtuvieron a partir del tejido glandular completo y nuestro estudio se llevó a cabo en un fluido secretado, en el que cabría esperar una mayor proporción de proteínas secretadas. Además, en la fracción de proteínas secretadas encontramos a muy pocas de las conocidas por estar abundantemente representadas en los sialomas de otros argásidos; por ejemplo, identificamos unas pocas lipocalinas para las cuales existen secuencias en las bases de datos, pero no encontramos “basic tail proteins”, ni inhibidores de proteasas tipo Kunitz, ni metaloproteasas. Una posible explicación para la ausencia de identificación de este tipo de proteínas pudo ser la elevada diversidad de secuencias que se observa dentro de las principales familias de proteínas secretadas en los sialomas de garrapata (van de Loch et al., 1996; Francischetti et al., 2008a, 2008b, 2009; Karim et al., 2011; Ribeiro et al., 2011), lo que, junto al escaso número de proteínas y ESTs específicas de *O. moubata* depositadas en las bases de datos (128 y 95 respectivamente en el momento en el que se realizó este estudio), pudo dar lugar a una falta de secuencias diana específicas que permitieran la identificación por comparación. El 33 % de secuencias no identificadas en las búsquedas por Mascot (Tabla 1) parece apoyar esta explicación. En ese caso, la baja proporción de proteínas secretadas que hemos encontrado podría resultar más aparente que real y debe ser tomada con cautela.

Por otra parte, la presencia de proteínas intracelulares en la saliva no es algo nuevo ni resultó inesperado (Mulenga et al., 2003; Francischetti et al., 2009; Dai et al., 2010). Está bien documentado que algunas proteínas intracelulares pueden ser secretadas por vías no convencionales al medio extracelular, donde desempeñan funciones adicionales, no siempre relacionadas con su función intracelular (Radisky et al., 2009). De hecho, y tal como sugieren otros autores, la presencia de proteínas intracelulares/housekeeping en la saliva de las garrapatas puede conducir a la identificación de nuevas familias de proteínas secretadas y de nuevas funciones para ellas, las cuales, previsiblemente, serán distintas a las que desempeñan en el medio intracelular y estarán relacionadas con la regulación de las relaciones con el hospedador (Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Chmelar et al., 2012).

El análisis de las secuencias de dichas proteínas intracelulares/housekeeping con la herramienta SecretomeP indicó que al menos una tercera parte de ellas podrían haber sido secretadas por vías no clásicas. Sin embargo, para los dos tercios de proteínas intracelulares restantes las herramientas bioinformáticas utilizadas no predijeron ningún mecanismo de secreción. Dentro de este segundo grupo de proteínas encontramos varias, como la actina, enolasa, FBA, HSP70 y 90, histonas, PyK, fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa y ubiquitina C (Tablas 4 y 5), para las cuales, en otros organismos, se ha observado que son secretadas en

exosomas (Lakkaraju y Rodríguez-Boulan, 2008; Simons y Raposo, 2009; Mathivanan et al., 2010; Raimondo et al., 2011; Ludwig y Giebel, 2012). Por tanto, el hallazgo en la saliva de *O. moubata* de dichas proteínas sugiere que quizá esta especie también utiliza exosomas u otro tipo de microvesículas como mecanismo de secreción de moléculas a la interfase garrapata-hospedador. Adicionalmente, existen evidencias de secreción apocrina por parte de las células de las glándulas salivales de los argásidos (Ribeiro et al., 2011), lo que puede elevar el número de proteínas intracelulares presentes en su saliva, aunque este tipo de secreción resulta inespecífica y no dirigida.

En conjunto, los mecanismos que acabamos de mencionar pueden justificar la presencia en la saliva de *O. moubata* de un mayor número de proteínas intracelulares que de proteínas secretadas. Sin embargo, cuando procedimos a la cuantificación relativa de las proteínas identificadas observamos la situación inversa, esto es, que la abundancia relativa de las proteínas secretadas por vías clásicas (péptido señal) fue mucho más alta que la de las proteínas intracelulares secretadas por vías no clásicas, al menos en la saliva de las hembras (Figuras 12 y 13). Esto sugiere un tipo de secreción específica (o dirigida) para las primeras, que fueron mayoritariamente lipocalinas (TSGP1, TSGP4, moubatina) con funciones relevantes en la alimentación de la garrapata, e inespecífica para las segundas, planteando dudas acerca de si dichas proteínas tendrían realmente una función biológica en la interfase garrapata-hospedador durante el proceso de alimentación.

En la saliva de los machos, por el contrario, las proteínas intracelulares secretadas por vías no clásicas fueron más abundantes que las secretadas por la vía clásica. En concreto, un grupo de enzimas involucradas en el metabolismo energético, como la GAPDH, FBA, enolasa y PyK, alcanzaron conjuntamente un 60 % de abundancia, frente al 31,5 % de la TSGP1 (Figura 13). Esto implicaría que estas proteínas habrían sido secretadas a la saliva de manera específica y, de acuerdo con Ribeiro et al. (2011), cabe esperar para ellas una probable función extracelular como antihemostáticos, antiinflamatorios o inmunomoduladores, haciendo necesaria su caracterización funcional en este medio extracelular; caracterización que efectuamos para una de ellas (la enolasa) y que comentamos más adelante.

La tercera observación controvertida fue la gran diferencia en la composición de la saliva entre hembras y machos, ya que, de acuerdo con nuestros resultados, sólo el 5,2 % de las proteínas identificadas están presentes en ambos sexos (Tablas 4 y 5; Figuras 9 y 13). La interpretación de estas diferencias debe hacerse con reserva, puesto que, como ya hemos comentado, en este estudio no se ha podido identificar el 33 % de las proteínas salivales detectadas y, si estas proteínas las compartiesen ambos sexos, entonces la diferencia entre ellos podría ser menor de lo que indican nuestros actuales resultados, aunque dicha diferencia seguiría siendo real.

Esta diferencia entre sexos resultó inesperada por varias razones. Como se ha explicado en la introducción, en los ixódidos, ambos sexos se alimentan de forma distinta y sus glándulas salivales difieren anatómica y funcionalmente (Bowman et al., 2008), expresando distintos genes de forma diferencial durante su largo proceso de alimentación (Bior et al., 2002; Packila y Guilfoile, 2002; Aljamali et al., 2009b); esto justifica las diferencias en la

composición salival entre sexos que se han observado en las especies de esta familia y sus diferentes efectos sobre la respuesta inmunitaria de hospedador (Hajnicka et al., 2005). Un ejemplo notable de estas diferencias son las IGBPs, que son secretadas únicamente por los machos y cuya función biológica también hemos comentado en la introducción (Wang y Nuttall, 1994; Wang et al., 1998).

A diferencia de los ixódidos, en los argásidos en general y en *O. moubata* en particular ambos sexos se alimentan de forma similar, esto es, ingieren cantidades de sangre equivalentes en relación a su peso y lo hacen durante un periodo de tiempo similar, normalmente inferior a una hora (García-Varas et al., 2010). Esto implica que ambos sexos están obligados a superar las mismas respuestas defensivas del hospedador para completar la toma de sangre, por lo que cabría esperar que ambos sexos secretasen a su saliva las mismas moléculas antihemostáticas. Sin embargo, nuestros resultados indican claramente que el repertorio de proteínas salivales inoculadas al hospedador por hembras y machos es distinto, planteando un doble interrogante acerca de cómo se origina esa diferencia y cuál puede ser el significado biológico de la misma.

Aunque los estudios histológicos y ultraestructurales clásicos de las glándulas salivales de los argásidos (efectuados con *Argas persicus*, *Argas arboreus* y *O. moubata*) no han mostrado diferencias entre sexos (Roshdy, 1972; Roshdy y Coons, 1975; Coons y Roshdy, 1981; El Shoura, 1985), en un trabajo más reciente, Mans et al. (2004) mostraron que las glándulas salivales de *O. savignyi* parecen ser más complejas de lo que se pensaba, revelando la existencia de más tipos de células granulares que los descritos sobre la base de su morfología y sugiriendo que la clasificación de dichas células debería efectuarse en función del distinto repertorio molecular que expresan. Por tanto, si los nuevos tipos celulares son distintos en machos y hembras, esto podría explicar el origen de las diferencias encontradas entre ambos proteomas salivales.

Independientemente de los mecanismos que puedan dar origen a esta diferencia, el significado biológico de la misma se desconoce. Éste podría estar relacionado con el procesamiento post-alimentación de la sangre ingerida o con la atracción y el apareamiento, que en *O. moubata* se produce poco después de la muda, fuera del hospedador y antes de alimentarse (Horigane et al., 2010). Ni nuestros resultados ni ninguno de los trabajos consultados ofrecen por ahora evidencias para apoyar o descartar estas hipótesis u otras, por lo que para responder a estas preguntas será necesario realizar estudios adicionales.

Por último, dado que los resultados del análisis proteómico de la saliva resultaron un tanto polémicos, intentamos confirmarlos con pruebas adicionales para dos proteínas concretas, y para ello analizamos mediante western blot la presencia/ausencia en las muestras de saliva de enolasa y actina. Elegimos estas proteínas porque ambas son intracelulares carentes de péptido señal, pese a lo cual aparecen en la saliva, y porque mientras la actina se identificó en ambos sexos, la enolasa solamente se identificó en machos.

Pues bien, los resultados de dichos western blots confirmaron los del análisis proteómico (Figuras 14 y 15) y además, demostraron que no todas las proteínas inoculadas al

hospedador con la saliva son inmunogénicas en contactos naturales, confirmando los resultados previos de Baranda et al. (1997). En el caso de la enolasa y la actina, la ausencia de inmunogenicidad natural pudo deberse a que son proteínas altamente conservadas y probablemente el hospedador no las reconoce como extrañas. No obstante, ambas proteínas sí son reconocidas, tanto en su versión recombinante como nativa, después de forzar al sistema inmune del hospedador mediante la administración de las recombinantes con adyuvantes. Este fenómeno, observado también con el antígeno salival Om44 (García-Varas et al., 2010) resultó muy interesante por ser similar al descrito por Kotsyfakis et al. (2008) para la sialostatina L2 de *I. scapularis*, quienes introdujeron el concepto de antígeno salival silente y propusieron a este tipo de antígenos como candidatos vacunales.

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA ENOLASA SALIVAL DE *O. MOUBATA*.

Los resultados del análisis proteómico anterior demostraron claramente la presencia de cantidades significativas de enolasa en la saliva de *O. moubata* (hasta un 7,64 % en machos de acuerdo con los valores de emPAI, Tablas 4 y 5) sugiriendo una secreción específica o dirigida. Que sepamos, esta es la primera vez que se describe la presencia de enolasa en la saliva de una garrapata, de modo que sus hipotéticas funciones en la interfase garrapata-hospedador aún se desconocen.

La enolasa fue identificada inicialmente como una enzima glucolítica de localización citoplasmática, pero actualmente se sabe que es una proteína multifuncional que puede expresarse en la superficie celular y secretarse al medio extracelular donde desempeña funciones distintas de las intracelulares (Pancholi, 2001; de la Torre-Escudero et al., 2010; Avilán et al., 2011). En concreto, en estos ambientes extracelulares, la enolasa interviene en la activación de enzimas implicadas en la invasión de los tejidos por agentes patógenos y células tumorales, así como en la modulación de las respuestas hemostática e inmunitaria del hospedador (Falabella et al., 2009; de la Torre-Escudero et al., 2010; Avilán et al., 2011). Una de estas enzimas es el plasminógeno/plasmina, que juega un papel clave en la fibrinólisis y en la degradación de la matriz extracelular (Cesarman-Maus y Hajjar, 2005; Collen y Lijnen, 2005).

Por lo tanto, una probable función para la enolasa salival de *O. moubata* en la interfase garrapata-hospedador sería la de actuar como receptor/activador de plasminógeno promoviendo la fibrinólisis y contribuyendo así a mantener la fluidez de la sangre y, por tanto, facilitando la alimentación. Además, de acuerdo con nuestras observaciones previas, cabía la posibilidad de que la enolasa ejerciera una segunda función antihemostática como ligando antagonista de P-selectina.

Para comprobar estas dos hipótesis hemos clonado y secuenciado el cDNA de la enolasa de *O. moubata*, producido la proteína en forma recombinante (rOmEno) y realizado ensayos tanto de unión y activación de plasminógeno, como de unión a P-selectina.

La secuencia de aminoácidos de esta enolasa se comparó con dos enolasas de ixódidos (las únicas secuencias de enolasas de garrapata disponibles en el momento de realizar este trabajo) y con las enolasas de otros artrópodos hematófagos. Esta comparación reveló un alto grado de conservación entre todas ellas (74 % al 82 % de identidad de secuencia) incluyendo los motivos de unión a metales y al sustrato, así como el dominio firma de la enolasa (Figuras 16, 17 y 18). Al igual que otras enolasas, la de *O. moubata* carece de péptido señal y de regiones de anclaje a la membrana, de modo que se desconoce cómo son secretadas y expuestas en la superficie celular (Avilán et al., 2011). Se ha sugerido que las enolasas pueden ser secretadas en exosomas y otras microvesículas y que, una vez secretadas, pueden reasociarse a la membrana celular (Bergmann et al., 2001; Olver y Vidal, 2007). La reasociación de proteínas secretadas sin ningún dominio típico de anclaje a la membrana parece ser un fenómeno bastante común y, de hecho, se ha observado con un número creciente de enolasas, tanto de eucariotas como de bacterias (Pancholi y Chhatwal, 2003; Floden et al., 2011). Es posible que esta reasociación tenga lugar a través de un dominio hidrofóbico descrito para la enolasa humana (AAVPSGASTGI) (Pancholi, 2001), que está conservado en la enolasa de *O. moubata* y en la mayoría de las enolasas de artrópodos hematófagos representadas en la figura 17. Por lo tanto, cabe pensar que este motivo permitiría a la enolasa salival de *O. moubata* asociarse con la membrana de las células del hospedador (endoteliales, plaquetas, leucocitos), centrando sus posibles actividades antihemostáticas en el sitio de alimentación de la garrapata.

En relación con dichas actividades, y comenzando por los resultados de los ensayos de unión a P-selectina (Figuras 24 y 25), éstos demostraron claramente que la enolasa salival no es el ligando de la P-selectina, ya que la rOmEno no se unió a la P-selectina y el verdadero ligando, presente en el sedimento de la inmunoprecipitación, no fue reconocido por el suero hiperinmune anti-enolasa. Estos resultados descartan la hipótesis de que el antígeno Om44 sea una isoforma de enolasa.

Respecto a la probable actividad profibrinolítica de la enolasa, nuestros resultados demostraron que tanto la enolasa recombinante como la nativa pueden fijar plasminógeno, que esta interacción es independiente del estado redox de los residuos de cisteína (Figura 20) y que en dicha unión intervienen los residuos de lisina de la enolasa (Figura 21), como ocurre con las enolasas de otros organismos (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011; Toledo et al., 2012). Dado que en estos ensayos 1 µg de proteína recombinante proporcionó una señal similar a 2 µg de saliva (Figura 20), y dado que la enolasa nativa representaría no más del 7,6 % en este fluido, esto sugiere que la saliva puede contener otras proteínas fijadoras de plasminógeno. Una de ellas puede ser la GAPDH, cuya capacidad para unir plasminógeno en otros organismos ya ha sido comprobada (de la Torre-Escudero et al., 2010).

Una vez demostrado que la enolasa de *O. moubata* actúa como receptor para el plasminógeno, pasamos a evaluar su capacidad para promover la activación de dicho plasminógeno generando plasmina. Los resultados del ensayo en fase líquida, aunque variables, sugerían que la enolasa soluble carece de capacidad para estimular la activación del plasminógeno (Figura 22). Por el contrario, los resultados del ensayo en fase sólida mostraron

claramente que el plasminógeno fijado sobre enolasa es transformado eficientemente en plasmina activa por el activador fisiológico del plasminógeno (tPA). En conjunto, los resultados de ambos ensayos indican que sólo la enolasa inmovilizada participaría en la activación del plasminógeno, lo que coincide con la idea de que la actividad profibrinolítica de la enolasa es orientada hacia la lesión de alimentación por medio de su asociación a las membranas celulares del hospedador. Por tanto, podemos asumir que la enolasa salival de *O. moubata* actúa como un auténtico receptor de plasminógeno en la interfase garrapata-hospedador, promoviendo la fibrinólisis y, probablemente, la degradación de la matriz extracelular, lo que contribuiría, a su vez, a la formación de la lesión de alimentación.

Por otra parte, los resultados de estos ensayos de activación también muestran que la saliva de *O. moubata* carece de moléculas capaces de activar el plasminógeno por sí mismas, en ausencia de activadores fisiológicos de plasminógeno, como el tPA, al contrario de lo que se ha observado en algunos ixódidos como *H. longicornis*, cuya saliva contiene una proteína, la longistatina, que activa ella misma al plasminógeno unido al coágulo y adicionalmente degrada al fibrinógeno actuando como profibrinolítico y anticoagulante (Anisuzzaman et al., 2011). Desconocemos si esta diferencia representa una estrategia ventajosa para *O. moubata* con respecto a las garrapatas duras, pero podemos suponer que la asignación a una proteína glucolítica como la enolasa de una función extracelular adicional sí sería ventajoso en términos de ahorro de energía (Floden et al., 2011).

A fin de ampliar la caracterización funcional de la enolasa de *O. moubata* se procedió a su silenciamiento génico mediante RNAi, alcanzando niveles de silenciamiento (Tabla 6) comparables a los obtenidos en trabajos previos para otros genes de *O. moubata*, como la subolesina (Manzano-Román et al., 2012b). El silenciamiento redujo en casi un 20 % la cantidad de sangre ingerida por los machos -aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa- y en un 8,6 % la cantidad ingerida por las hembras, sin afectar a las ninfas (Tabla 7). Este bajo efecto lo atribuimos a la fisiología de la alimentación de los argásidos, los cuales tienen a todos sus componentes salivales pre-sintetizados y listos para su secreción incluso antes de acceder al hospedador (Bowman et al., 2008), de modo que el silenciamiento génico de la enolasa apenas influiría en la cantidad de enolasa ya sintetizada, por lo que la alimentación se vería poco o nada afectada. Por el contrario, el silenciamiento génico de la enolasa afectó de forma significativa a la reproducción, ya que las hembras tratadas depositaron un 22 % menos de huevos y el 50 % de los depositados fueron infértiles. Aunque no investigamos los niveles de transcripción del gen de la enolasa en los huevos, la inhibición de la eclosión de los mismos sugiere, por una parte, que el silenciamiento de la enolasa se mantiene de forma transovárica, como se ha comprobado en ixódidos con otros genes como el de la subolesina (Kocan et al., 2007) y, por otra, que la enolasa está implicada en el desarrollo del embrión.

El potencial efecto protector de la enolasa que insinuaban los experimentos de RNAi fue evaluado en pruebas de vacunación de conejos con la proteína recombinante, en los que ésta indujo respuestas humorales con altos títulos de anticuerpos demostrando su inmunogenicidad al ser administrada con adyuvantes. Estos anticuerpos reconocieron

específicamente a la proteína recombinante y a la nativa de la saliva confirmando la secreción de ésta proteína al fluido salival, como ya hemos comentado (Figuras 15 y 25B).

Sin embargo, a pesar de que la enolasa salival presente en la interfase garrapata-hospedador puede ser alcanzada por los anticuerpos vacunales y, por tanto neutralizadas sus funciones profibrinolíticas, el efecto de la vacunación sobre la alimentación de las garrapatas fue insignificante (Tabla 8). Este resultado lo atribuimos a la presencia de otras moléculas salivales antihemostáticas con funciones redundantes que pudieron compensar la pérdida de función de la enolasa durante la alimentación (Maritz-Olivier et al., 2007; Fontaine et al., 2011; Chmelar et al., 2012). Por el contrario, la vacunación causó una reducción en la puesta de huevos similar a la causada por el silenciamiento génico, reforzando la idea de que la enolasa puede estar implicada en la oviposición y en el desarrollo de los huevos. Además, la vacunación también causó un aumento significativo en las tasas de mortalidad de las ninfas 3 y 4. Curiosamente, en estas dos fases evolutivas los ejemplares alimentados sobre los conejos vacunados ingirieron un 20 % más de sangre que los ejemplares alimentados en el grupo control, mientras que en las demás fases evolutivas los ejemplares ingirieron la misma cantidad de sangre en los conejos vacunados y en los controles (Tabla 8). Por lo tanto, se podría pensar que la mayor cantidad de anticuerpos anti-enolasa ingeridos por estas garrapatas está relacionada con el incremento de su mortalidad. Obviamente, esta idea requiere una demostración experimental.

Por tanto, estos resultados confirman que la enolasa salival de *O. moubata* puede ejercer una función importante en la interfase parásito-hospedador como receptor de plasminógeno estimulando la fibrinólisis del hospedador y manteniendo la fluidez de la sangre durante el proceso de alimentación. Pese a lo anterior, hemos observado que la neutralización de la función de la enolasa mediante RNAi o inmunización con la proteína recombinante no afecta a la alimentación de la garrapata y por, el contrario, reduce su fecundidad y fertilidad. Esto sugiere una importante función para la enolasa en la regulación de la reproducción, posibilitando nuevas estrategias para el control de *O. moubata*.

IDENTIFICACIÓN DEL LIGANDO DE P-SELECTINA PRESENTE EN LA SALIVA DE *O. MOUBATA*: PRODUCCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE GENOTECAS DE EXPRESIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES DE *O. MOUBATA*.

En el objetivo anterior pudimos comprobar que la enolasa salival no es la identidad del antígeno Om44 caracterizado como ligando de P-selectina, haciendo necesario abordar la cuestión de su identificación mediante una estrategia experimental distinta.

Esta estrategia consistió en la producción de microarrays de proteínas a partir de una genoteca de expresión de cDNA de glándulas salivales de *O. moubata* y su posterior análisis utilizando como sondas a la propia P-selectina y a un suero hiperinmune frente a Om44 obtenido por nosotros. De este modo, esperábamos poder identificar ligandos de P-selectina ortólogos a Om44, los cuales serían posteriormente producidos en forma recombinante para evaluar su potencial valor protector en pruebas de inmunización de animales.

En primer lugar se construyeron las genotecas de entrada y de expresión de glándulas salivales de *O. moubata* utilizando tecnología de recombinación homóloga, que simplificaba y facilitaba significativamente el clonaje de los cDNAs y su posterior transferencia entre el vector de entrada y el de destino. Ambas genotecas cumplieron los parámetros de calidad indicados por el fabricante del kit utilizado para su construcción (CloneMiner II cDNA Library Construction) y, además, mostraron una buena representatividad del órgano de partida (glándulas salivales), como indica la identidad de los insertos presentes en los 42 clones recombinantes secuenciados en las pruebas de control de calidad (Tabla 9). De hecho, el 73,8 % de estos clones pudieron identificarse como proteínas de garrapata y el 68 % se sabe que se expresan en las glándulas salivales sirviendo así también como herramienta para ampliar el conocimiento del proteoma de las glándulas salivales. El 26,2 % restante no pudieron ser identificados, ya que no mostraron homología con secuencias conocidas. Este porcentaje de clones no identificados fue muy similar al observado en sialomas de otras especies de garrapatas (Francischetti et al., 2008a, 2008b) y comparable al 33 % de proteínas no identificadas en el análisis del proteoma de la saliva de *O. moubata*, por lo que asumimos que la genoteca cumplía las condiciones necesarias para utilizarla en la producción de los microarrays.

Los microarrays de proteínas se han convertido recientemente en herramientas muy versátiles para el análisis simultáneo de cientos o miles de proteínas inmovilizadas sobre un soporte sólido permitiendo su caracterización inmunológica y funcional (Miersch y LaBaer, 2011). La tecnología actual permite la construcción de microarrays a partir de genotecas de cDNA clonadas en vectores de expresión y, en concreto, la tecnología NAPPA permite producir microarrays de proteínas mediante la impresión de los plásmidos codificantes en portaobjetos de vidrio adecuadamente funcionalizados y la posterior expresión *in situ* de las proteínas codificadas utilizando un sistema libre de células. Las condiciones para la transcripción/traducción pueden reproducir las de la síntesis de la proteína nativa facilitando su correcto plegamiento y modificación postransduccional, permitiendo así el análisis de las interacciones proteína-proteína y su caracterización funcional en unas condiciones próximas a las naturales (Weiner et al., 2004; Guan y Kiss-Toth, 2008; Link y Labaer, 2008; Ramachandran et al., 2008; Stoevesandt et al., 2009; Manzano-Román et al., 2013).

En consecuencia, utilizamos la tecnología NAPPA en la construcción de nuestros microarrays, sometiéndolos a las correspondientes pruebas de control de calidad y reproducibilidad. Estas pruebas mostraron que al menos el 70 % de los clones se imprimían y expresaban correctamente (Figura 27) y que para ello, en las condiciones en que llevamos a cabo la impresión, eran necesarios al menos 15 µg de DNA plasmídico de cada clon (Figura 28), evidenciando la importancia de la concentración de DNA en la mezcla de impresión. El análisis de calidad también mostró una buena reproducibilidad intra- e inter-array en la impresión y en la expresión proteica de los diferentes clones (Figuras 29 y 30), de modo que, tras establecer las condiciones óptimas del ensayo, pasamos a analizar dichos microarrays con nuestras dos sondas: el suero Om44 y la quimera recombinante P-selectina/IgG humana.

Comenzando con el suero anti-Om44, este fue obtenido por inmunización de animales con el antígeno Om44 purificado mediante captura con P-selectina y posterior electroelución a partir de geles de SDS-PAGE. Dicho suero, además del propio Om44, también reconocía a la actina. Este hecho pudo deberse a la co-purificación de la actina y el Om44 a partir de la misma banda de gel (Pérez-Sánchez et al., 2010b) después de la co-captura de ambas por la P-selectina, que en el caso de la actina pudo efectuarse a través del complejo proteico ezrina-radixina-moesina, que sirve de enlace y vía de transducción de señales entre los receptores de membrana y las proteínas del citoesqueleto (Ivetic y Ridley, 2004). Esta explicación nos parece posible porque en el análisis por MALDI-TOF/TOF del producto de la captura, además de actina, también detectamos ezrina, radixina y moesina (datos no mostrados)

En cualquier caso, el hecho es que este suero reconoció un total de 8 clones en el microarray, de los cuales se pudieron identificar 5 (Figura 31). Uno de ellos fue la actina, como era de esperar para este suero, confirmando la correcta expresión de las proteínas en el microarray.

En los otros 4 se identificaron las proteínas PLA2, 7DB, RP-60S L10 y HSP90, y, en principio, cualquiera de ellas podría representar la identidad de la proteína Om44, y, por tanto, actuar como ligando antagonista de P-selectina. El reconocimiento por el suero anti-Om44 se verificó más tarde por western blot para PLA2, RP-60S L10 y actina, pero no para 7DB, que no fue reconocida en este experimento, ni tampoco para HSP90, porque no pudo ser producida como recombinante en bacterias (Figura 33). En el caso de la PLA2, el suero reconoció la banda de 36 kDa que se corresponde con el tamaño de la proteína recombinante y una banda de 68 kDa, que interpretamos como un posible dímero. Ninguna de estas proteínas coincidía exactamente en tamaño con Om44, siendo la más próxima la PLA2 (Tabla 13). Además, de las cuatro proteínas, PLA2 y 7DB presentaban señales de secreción no clásica mientras que RP-60S L10 y HSP90 carecían por completo de señales de secreción (Tabla 13), sugiriendo la secreción al medio extracelular para las primeras y una localización intracelular para las segundas. Por su parte, las funciones conocidas de estas proteínas descartaban, en principio, a RP-60S L10 y HSP90 como ligandos de P-selectina, pero no a la PLA2 soluble, para la cual se han descrito funciones reguladoras de la inflamación y la hemostasia a través de su interacción con receptores de la superficie celular como las selectinas (Murakami et al., 2010). Respecto a las funciones de 7DB, actualmente se desconocen y sólo se sabe que las proteínas 7DB constituyen una familia de proteínas salivales específicas de argásidos (Francischetti et al., 2008b). Todas estas observaciones parecían indicar que la PLA2 es la identidad más probable para el Om44.

A continuación, a fin de detectar en los microarrays a posibles ligandos de P-selectina, los analizamos con la quimera P-selectina/IgG humana en dos condiciones distintas para permitir la detección de ligandos tanto de naturaleza exclusivamente peptídica como de naturaleza glicoproteica, puesto que ambos tipos de ligandos pueden ser reconocidos a través del dominio lectina de la P-selectina (Molenaar et al., 2002; Martínez et al., 2005; Leppänen y Cummings, 2010). Con este propósito, las proteínas del microarray se expresaron tanto en ausencia como en presencia de membranas microsomales caninas (CMMs), en este segundo

caso para permitir su procesamiento post-transduccional, incluyendo la escisión del péptido señal y las posibles glicosilaciones (Walter y Blobel, 1983; Svitkin et al., 2005; Zahedi et al., 2009).

En el ensayo realizado sin CMMs, la quimera reconoció tres clones, de los cuales sólo se pudo identificar uno, precisamente la PLA2 que, como acabamos de comentar, fue también reconocida por el suero anti-Om44 (Figura 32A). Dado que en la saliva/glándulas salivales de otras especies de garrapatas, tanto argásidos como ixódidos, también se ha identificado PLA2 (Francischetti et al., 2009), estos resultados sugieren que *O. moubata* expresa, y secreta en su saliva, una PLA2 que puede unirse a P-selectina a través de un tipo de interacción proteína-proteína independiente de glicanos. Para confirmar lo anterior se produjeron dos versiones recombinantes de esta PLA2, una no glicosilada en células de *E. coli* y otra *in vitro* con un lisado de células HeLa que permite la glicosilación -aunque dicha glicosilación era improbable al carecer la PLA2 de sitios de N- y O-glicosilación-, y se enfrentaron las dos por ELISA y western blot con la quimera P-selectina/IgG humana, la cual reconoció a ambas (Figuras 36 y 37), confirmando los resultados del análisis de los microarrays y la capacidad de la PLA2 para actuar como ligando de P-selectina.

Las PLA2s son una superfamilia proteica que incluye a una familia de PLA2s secretadas, las cuales son importantes componentes de los venenos de animales y también están presentes en la saliva de las garrapatas (Francischetti et al., 2009; Murakami et al., 2010). Los distintos miembros de esta familia de PLA2s secretadas varían en tamaño molecular entre 18 y 55 kDa y exhiben una gran diversidad de actividades farmacológicas, que incluyen acciones tóxicas, alteraciones del sistema hemostático e incluso acciones bactericidas, buena parte de ellas ejercidas a través de su actividad enzimática mediante la lisis de fosfolípidos de las membranas celulares y la producción de mediadores lipídicos (Zhu et al., 1997; Zeidner et al., 2009; Sajevic et al., 2011; Samy et al., 2012). Más recientemente también se ha demostrado que las PLA2s secretadas participan en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la regulación de la inflamación y la defensa del hospedador, así como en nuevas formas de señalamiento y comunicación celular (Meyer et al., 2005; Ibeas et al., 2009; Charalambous et al., 2012). Estas nuevas acciones son independientes de su actividad como enzimas lipolíticas y las ejercen a través de su actividad como ligando para determinadas proteínas, tanto solubles como de membrana, que actúan como receptores y que incluyen, entre otros, a selectinas, integrinas y factores de coagulación. La unión a dichos receptores es de alta afinidad (en el rango picomolar) y el resultado es la inhibición de la actividad biológica del receptor (Balsinde y Balboa, 2005; Murakami et al., 2010; Murakami et al., 2011). Lo anterior sugiere que podemos estar ante una nueva función de esta PLA2 secretada de *O. moubata* en la interfase parásito-hospedador, consistente en la inhibición del conjunto de actividades hemostáticas y proinflamatorias iniciadas tras la expresión de P-selectina por el hospedador; función ésta que coincide con las actividades anti-defensivas observadas para Om44, las cuales fueron bloqueadas tras la inmunización de los animales con dicha Om44 (Bowman et al., 1997; García-Varas et al., 2010), apoyando la idea de que esta PLA2 es la identidad del antígeno Om44.

Adicionalmente, puesto que está bien establecido que la P-selectina interacciona con ligandos glicopeptídicos endógenos, como el PSGL-1, a través de su dominio lectina y que esto lo hace sólo en presencia de altas concentraciones (milimolares) de calcio (Martínez et al., 2005; Leppänen y Cummings, 2010), expresamos réplicas de los microarrays utilizando CMMs y realizamos ensayos de interacción con P-selectina en presencia de calcio 2 mM con el fin de identificar posibles interacciones entre P-selectina y glicoproteínas salivales de *O. moubata*. Como se muestra en la figura 32B, la quimera reconoció 6 clones, de los cuales sólo pudieron identificarse 3, el Factor de Elongación EF-1 α /Tu, la proteína ribosomal 40S S7 y una proteína hipotética de *I. scapularis*, de las cuales, que sepamos, ninguna ha sido descrita como un posible ligando de la P-selectina. Aunque estos resultados necesitan confirmación, sugieren que la saliva de *O. moubata* puede contener glicoproteínas aún desconocidas que actúen como ligandos adicionales de P-selectina. Puesto que las selectinas median el contacto inicial de los leucocitos con el endotelio vascular (Abbal et al., 2006), la posible participación de esas nuevas moléculas salivales de garrapatas en la regulación de la adhesión y migración de los leucocitos merece estudios específicos, ya que podrían conducir al descubrimiento de nuevas actividades antihemostáticas y, consecuentemente, de nuevas vías de control de la alimentación de estos parásitos.

LIGANDOS DE P-SELECTINA Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS SALIVALES: EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD PROTECTORA EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.

Una vez identificadas las proteínas salivales de *O. moubata* reconocidas por el suero anti-Om44 y otras posibles proteínas unidoras de P-selectina, la última parte de este trabajo se centró en la realización de pruebas de inmunización de animales para evaluar el valor protector de las proteínas de mayor interés.

Con ese fin seleccionamos en primer lugar a la PLA2, pero también al resto de las proteínas reconocidas por el suero anti-Om44 (7DB, RP-60S, HSP90 y actina) para comprobar si inducían o no una respuesta inmunitaria protectora similar a la del antígeno Om44. Además, incluimos también a otras dos proteínas, la apirasa y el ortólogo de la savignygrina de *O. savignyi*, al que denominamos mougrina, las cuales habían sido identificadas en la genoteca de entrada durante las pruebas de control de calidad. Estas dos últimas, por su acción antiagregante plaquetaria podían ser buenos candidatos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata bloqueantes de la alimentación.

Todas estas proteínas se obtuvieron en forma recombinante en bacterias, salvo la HSP90, que resultó tóxica para las células.

Tras su administración con adyuvantes de Freund, las seis proteínas recombinantes indujeron elevados títulos de anticuerpos (> 1/12.800) demostrando una alta inmunogenicidad, excepto la RP-60S, que indujo una respuesta humoral bastante menos intensa (título 1/1.600) (Figuras 40A y 41A).

Los sueros frente a PLA2, actina y apirasa reconocieron específicamente a su proteína homóloga nativa en la saliva, tanto por ELISA como por western blot (Figuras 40B y 41B), confirmando la secreción de dichas proteínas a la saliva de *O. moubata*. Cabe señalar que los anticuerpos anti-PLA2 revelaron tres bandas, de 38, 68 y 100 kDa aproximadamente, cuando se enfrentaron a la recombinante homóloga, que interpretamos como posibles oligómeros de dicha recombinante, mientras que en la saliva reconocieron una sola banda de 68 kDa, lo que sugiere, que en condiciones nativas, esta proteína quizá esté en forma dimérica. En el caso de la GST-mougrina, los anticuerpos revelaron sobre la recombinante homóloga una banda de tamaño ligeramente superior al tamaño de la GST, en coincidencia con el tamaño de la proteína de fusión, y en la saliva reconocieron una banda de tamaño similar a la GST pero no reconocieron bandas en torno a los 7,2 kDa, que es el tamaño teórico de la mougrina. Por su parte, los anticuerpos anti-7DB reaccionaron débilmente con la saliva en los ensayos de ELISA y no revelaron ninguna banda en el western blot correspondiente. Desconocemos el porqué de esta falta de reconocimiento en el western blot. Por su parte, la baja inmunogenicidad de la RP-60S, junto con la posibilidad de que no sea secretada a la saliva por carecer de señales de secreción, justificaría su falta de reconocimiento en la saliva, tanto por ELISA como por western blot.

Respecto a la acción protectora de la respuesta inmunitaria inducida por las proteínas recombinantes, ésta fue similar en todas ellas y consistió, esencialmente, en descensos significativos en la cantidad de sangre ingerida (Tabla 15), en concordancia con lo que cabría esperar al neutralizar sus funciones antihemostáticas facilitadoras de la alimentación; funciones antihemostáticas que son conocidas para PLA2, apirasa y mougrina, pero que estarían aún por definir, en caso de que fuesen reales, para 7DB, RP-60S y actina. El descenso en la cantidad de sangre ingerida por las hembras se tradujo en descensos también significativos de su fecundidad, especialmente con PLA2, apirasa y mougrina (Tabla 16).

En conjunto, esta respuesta protectora fue cualitativa y cuantitativamente similar a la inducida por el antígeno Om44 purificado por electroelución a partir de geles SDS-PAGE (entre 25,8 % y 54,3 % de inhibición de la alimentación), y similar pero de menor potencia que la inducida por el SGE (hasta 60-70 % de inhibición de la alimentación y la reproducción) (García-Varas et al., 2010), lo cual puede sugerir la presencia en el SGE de otras proteínas con funciones redundantes que pudieron ser neutralizadas mediante la vacunación con este extracto.

Adicionalmente, algunas de las proteínas recombinantes evaluadas (RP-60S, actina, apirasa) indujeron un incremento significativo en la mortalidad de algunas fases evolutivas. Por su parte, la PLA2 provocó un incremento significativo de la mortalidad en todas las fases evolutivas (Tabla 17), sugiriendo, al menos para esta proteína, un papel no sólo en la alimentación sino también en otros procesos fisiológicos vitales.

Los descensos en los índices de supervivencia y reproducción de las hembras se usaron para definir la eficacia protectora de cada antígeno recombinante, por ser estos parámetros los que determinan el tamaño de la siguiente generación y, en consecuencia, el efecto de la vacuna sobre la población de los parásitos (Tabla 18). De acuerdo con esto, nuestros

resultados indican que de todos los antígenos evaluados, los más eficaces fueron, por este orden, la PLA2 (44,5 %), la mougrina (41,4 %) y la apirasa (23,8 %); precisamente las proteínas con funciones antihemostáticas bien conocidas. En consecuencia, estas tres proteínas son candidatos interesantes para el desarrollo de vacunas frente a *O. moubata*.

Las otras tres proteínas evaluadas, cuya función en la interfase garrapata-hospedador está por determinar, también indujeron respuestas protectoras pero con eficacias inferiores al 20 %, por lo que las consideramos *a priori* de menor interés como antígenos vacunales.

En conjunto, estos resultados confirman que se pueden inducir respuestas inmunitarias protectoras con antígenos salivales de garrapata administrados individualmente y que la protección consiste, básicamente, en un bloqueo parcial de la alimentación, previsiblemente como consecuencia de la neutralización de las funciones antihemostáticas de dichos antígenos en la interfase garrapata-hospedador.

Aunque no hemos ensayado otros adyuvantes o protocolos de inmunización que tal vez puedan proporcionar protecciones más elevadas, pensamos que el principal factor que puede limitar la eficacia de estas vacunas, basadas en la neutralización de antígenos individuales, es la multiplicidad y complejidad observada en la composición de la saliva, que compensaría la pérdida de función del antígeno diana con otras proteínas salivales con funciones redundantes (Willadsen, 2008; Chmelar et al., 2012; Wikel, 2013).

Es ese caso, el uso de vacunas múltiples, formuladas con varios antígenos diana, podría inducir respuestas protectoras más eficaces. Igualmente, la identificación de los epítomos protectores de esos antígenos podría permitir la construcción de antígenos recombinantes quiméricos potencialmente más eficaces. Nuestros resultados pueden servir de punto de partida para la búsqueda de epítomos protectores en tres proteínas inmunogénicas de argásidos que tienen ortólogos funcionales en ixódidos, por lo que es posible que éstas conserven epítomos similares. La identificación e inclusión en un antígeno recombinante quimérico de dichos epítomos conservados ofrecería la oportunidad de obtener vacunas de más amplio espectro, útiles para el control de un mayor número de vectores y de los patógenos que transmiten (de la Fuente, 2012; Parizi et al., 2012; Merino et al., 2013).

CONCLUSIONES

Primera

La proteína TSGP1 de *O. moubata* es una lipocalina salival secretada perteneciente al grupo de lipocalinas unidoras de aminas biogénicas de argásidos, cuya función en la interfase garrapata-hospedador es la retirada de histamina y serotonina de la lesión de alimentación. TSGP1 es inmunogénica en condiciones naturales e induce en los animales parasitados la síntesis de anticuerpos específicos.

Segunda

La versión recombinante truncada de TSGP1 muestra un 100 % de sensibilidad y un 99,4 % de especificidad en la detección por ELISA de anticuerpos anti-*O. moubata* en sueros porcinos. Esta eficacia diagnóstica, unida a su composición bien definida y facilidad de producción, la convierten en una herramienta superior al SGE para la detección de forma específica, rápida y fiable de animales expuestos a *O. moubata*. Su aplicación en muestreos seroepidemiológicos en el entorno sinantrópico permite identificar animales picados y localizar poblaciones de *O. moubata*, contribuyendo así al diseño de estrategias específicas para un control eficaz del argásido y la prevención de las enfermedades que trasmite.

Tercera

El análisis proteómico de la saliva de *O. moubata* reveló una composición variada, compleja y redundante, que incluye cientos de proteínas, en concordancia con la complejidad observada en los sialomas de otras especies de argásidos e ixódidos.

Cuarta

La composición proteica de la saliva de hembras y machos de *O. moubata* es muy diferente, compartiendo ambos sexos sólo el 5,2 % de las proteínas identificadas en el análisis proteómico. Esta es la primera vez que se observa dicha diferencia en una especie de la familia Argasidae, haciendo necesarios estudios adicionales para averiguar el significado biológico de la misma, el cual, aparentemente, no está relacionado con el proceso de alimentación de los ejemplares.

Quinta

Aunque, en términos cuantitativos, las proteínas más abundantes en la saliva de *O. moubata* son las secretadas por vías clásicas, la mayoría de las proteínas identificadas fueron intracelulares/housekeeping. La presencia en la saliva de estas proteínas intracelulares revela el uso de vías de secreción dirigida diferentes a las vías clásicas y sugiere nuevas funciones para dichas proteínas, previsiblemente relacionadas con la regulación de la interacción con el hospedador.

Sexta

La enolasa de *O. moubata* es un ejemplo de proteína intracelular secretada a la saliva por vías distintas de las clásicas. Su función en la interfase garrapata-hospedador no es la de actuar como un ligando antagonista de P-selectina, sino como receptor profibrinolítico del plasminógeno, contribuyendo a mantener la fluidez de la sangre y, probablemente, a la

formación de la lesión de alimentación. Pese a lo anterior, la neutralización de la función de la enolasa mediante RNAi o inmunización con la proteína recombinante afecta escasamente a la alimentación de la garrapata, pero reduce su fecundidad y fertilidad, indicando la participación de la enolasa en el proceso de la reproducción.

Séptima

La aplicación conjunta de las tecnologías gateway y NAPPA ha permitido producir microarrays de proteínas a partir de una genoteca de expresión de las glándulas salivales de *O. moubata*, posibilitando el análisis simultáneo de cientos de proteínas salivales y su caracterización parcial a nivel inmunológico y funcional. El análisis combinado de estos microarrays con el suero anti-Om44 y la P-selectina permitió la identificación del antígeno protector Om44. Los resultados indican que se trata de una fosfolipasa A₂ secretada, que actúa como ligando antagonista de P-selectina, uniéndose a ella a través de interacciones proteína-proteína independientes de glicanos.

Octava

Es posible inducir respuestas inmunitarias bloqueantes de la alimentación, biológicamente significativas, mediante la administración con adyuvantes de proteínas salivales que desempeñan funciones antihemostáticas y antiinflamatorias, como son la PLA₂, la apirasa y la mougrina, lo cual convierte a estas tres proteínas en antígenos útiles para el desarrollo de vacunas frente a esta especie.

Novena

Las respuestas conseguidas mediante la administración individual de estos antígenos alcanzan eficacias protectoras cercanas al 50 %, probablemente porque la neutralización de su función antihemostática es compensada por otras proteínas salivales con funciones redundantes. Es consecuencia, se recomienda la inclusión simultánea en las vacunas de varios antígenos protectores a fin de neutralizar la redundancia funcional e inducir respuestas protectoras más eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbal, C., Lambelet, M., Bertaggia, D., Gerbex, C., Martinez, M., Arcaro, A., Schapira, M., Spertini, O., 2006. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood* 108, 3352-3359.
- Alarcon-Chaidez, F., Ryan, R., Wikel, S., Dardick, K., Lawler, C., Foppa, I.M., Tomas, P., Cushman, A., Hsieh, A., Spielman, A., Bouchard, K.R., Dias, F., Aslanzadeh, J., Krause, P.J., 2006. Confirmation of tick bite by detection of antibody to *Ixodes calreticulin* salivary protein. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 1217-1222.
- Alarcon-Chaidez, F.J., Sun, J., Wikel, S.K., 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 48-71.
- Aljamali, M.N., Hern, L., Kupfer, D., Downard, S., So, S., Roe, B.A., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009a. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Molecular Biology* 18, 129-154.
- Aljamali, M.N., Ramakrishnan, V.G., Weng, H., Tucker, J.S., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009b. Microarray analysis of gene expression changes in feeding female and male lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 71, 236-253.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492-1501.
- Allen, J.R. & Kemp, D.H., 1982. Observations on the behaviour of *Dermacentor andersoni* larvae infesting normal and tick resistant guinea-pigs. *Parasitology* 84, 195-204.
- Anatriello, E., Ribeiro, J.M., de Miranda-Santos, I.K., Brandao, L.G., Anderson, J.M., Valenzuela, J.G., Maruyama, S.R., Silva, J.S., Ferreira, B.R., 2010. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics* 11, 450.
- Anderson, J.M. & Valenzuela, J.G., 2008. Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics, In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press.
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P.W., Rincon, M., Kantor, F.S., Fikrig, E., 2002. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16, 849-859.
- Anisuzzaman, Islam, M.K., Alim, M.A., Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., Tsuji, N., 2011. Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathogens* 7, e1001312.
- Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1995. A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology* 60, 133-147.
- Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Baranda, J.A., Encinas-Grandes, A., 1997. Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. *Parasite Immunology* 19, 401-410.

- Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quinones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P.A., Concepción, J.L., 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, 932549.
- Balsinde, J. & Balboa, M.A., 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in activated cells. *Cellular Signalling* 17, 1052-1062.
- Baranda, J.A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1997. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Parasitology* 83, 831-838.
- Baranda, J.A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Manzano, R., Encinas-Grandes, A., 2000. Purification, N-terminal sequencing and diagnostic value of the major antigens of *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. *Veterinary Parasitology* 87, 193-206.
- Barker, S.C., Murrell, A., 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press.
- Batista, I.F., Chudzinski-Tavassi, A.M., Faria, F., Simons, S.M., Barros-Batestti, D.M., Labruna, M.B., Leao, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., 2008. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* 51, 823-834.
- Batista, I.F., Ramos, O.H., Ventura, J.S., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2010. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 493, 151-156.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004a. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340, 783-795.
- Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Von Heijne, G., Brunak, S., 2004b. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design & Selection* 17, 349-356.
- Ben-Yakir, D., 1989. Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology* 26, 243-246.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2001. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* 40, 1273-1287.
- Bior, A.D., Essenberg, R.C., Sauer, J.R., 2002. Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 645-655.
- Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Tanaka, T., Xuan, X., Fujisaki, K., 2010. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. *Journal of Insect Physiology* 56, 1587-1598.
- Borrebaeck, C.A. & Wingren, C., 2009. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *Journal of Proteomics* 72, 928-935.
- Bowman, A.S., Gengler, C.L., Surdick, M.R., Zhu, K., Essenberg, R.C., Sauer, J.R., Dillwith, J.W., 1997. A novel phospholipase A₂ activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Experimental Parasitology* 87, 121-132.

- Bowman, A.S., Ball, A.B., Sauer, J.R., 2008. Tick salivary glands: the physiology of ticks water balance and their role in pathogen trafficking and transmission, In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Ed.) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brossard, M. & Wikel, S., 2008. Tick immunobiology, In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, Cambridge.
- Canals, A., Oleaga, A., Pérez, R., Domínguez, J., Encinas, A., Sánchez-Vizcaino, J.M., 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Veterinary Parasitology* 37, 145-153.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* 129, 307-321.
- Cikos, S., Bukovska, A., Koppel, J., 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8, 113.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology* 114, 40-46.
- Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E., Hamm, H.E., 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107, 2736-2744.
- Collen, D. & Lijnen, H.R., 2005. Thrombolytic agents. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 93, 627-630.
- Coons, L. & Roshdy, M., 1981. Ultrastructure of granule secretion in salivary glands of *Argas (Persicargas) arboreus* during feeding. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 65, 225-234.
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., Dixon, L.K., 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364, 2683-2696.
- Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charloteaux, B., Decrem, Y., Prevot, P.P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 3, 0001400.
- Cutler, S.J., 2006. Possibilities for relapsing fever reemergence. *Emerging Infectious Diseases* 12, 369-374.
- Cutler, S.J., 2010. Relapsing fever--a forgotten disease revealed. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1115-1122.
- Cutler, S.J., Abdissa, A., Trape, J.F., 2009. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 400-406.
- Champagne, D. & Valenzuela, J.G., 1996. Pharmacology of haematophagous arthropod saliva. In: Wikel, S. (Ed.) *The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships*. CAB International.
- Charalambous, K., Booth, P.J., Woscholski, R., Seddon, J.M., Templer, R.H., Law, R.V., Barter, L.M., Ces, O., 2012. Engineering de novo membrane-mediated protein-protein communication networks. *Journal of the American Chemical Society* 134, 5746-5749.

- Chinzei, Y. & Minoura, H., 1988. Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. *Journal of Medical Entomology* 25, 26-31.
- Chmelar, J., Anderson, J.M., Mu, J., Jochim, R.C., Valenzuela, J.G., Kopecky, J., 2008. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* 9, 233.
- Chmelar, J., Oliveira, C.J., Rezacova, P., Francischetti, I.M., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J.M., Mares, M., Kopecky, J., Kotsyfakis, M., 2011. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736-744.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J.H., Francischetti, I.M., Kotsyfakis, M., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics* 75, 3842-3854.
- Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., Fikrig, E., 2010. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathogens* 6, e1001205.
- de la Fuente, J., 2012. Vaccines for vector control: exciting possibilities for the future. *Veterinary Journal* 194, 139-140.
- 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, 6938-6946.
- de la Fuente, J., Manzano-Román, R., Naranjo, V., Kocan, K.M., Zivkovic, Z., Blouin, E.F., Canales, M., Almazán, C., Galindo, R.C., Step, D.L., Villar, M., 2010. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 28, 1786-1795.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology* 181, 17-22.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Almazán, C., Kocan, K.M., Merino, O., Pérez de la Lastra, J.M., Estrada-Peña, A., Blouin, E.F., 2013. Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases* 60 Suppl 2, 172-178.
- de la Fuente, J. & Merino, O., 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923-5929
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., 2010. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology* 173, 76-84.
- de la Torre Escudero, E., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Hernández-González, A., Siles-Lucas, M., 2011. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *Journal of Proteomics* 74, 1534-1544.

- Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., Frere, J.M., Feron, O., Dogne, J.M., Dessy, C., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2009. Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *Journal of Experimental Medicine* 206, 2381-2395.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System Palo Alto, CA, USA.
- Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A.L., Dias, J.M., Coelho, F.M., Russo, R.C., Ferreira, B.R., Graham, G.J., Shaw, J.P., Wells, T.N., Teixeira, M.M., Power, C.A., Proudfoot, A.E., 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2019-2031.
- Eisenhaber, B., Bork, P., Yuan, Y., Loffler, G., Eisenhaber, F., 2000. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 340-341.
- El Shoura, S.M., 1985. Ultrastructure of salivary glands of *Ornithodoros (Ornithodoros) moubata* (Ixodoidea: Argasidae). *Journal of Morphology* 186, 45-52.
- Encinas-Grandes, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., 1999. Garrapatas duras, In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (Eds.) *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana.
- Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 801-813.
- Fernández-Soto, P., 2003. Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Fernández-Soto, P., Dávila, I., Laffond, E., Lorente, F., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2001. Tick-bite-induced anaphylaxis in Spain. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 95, 97-103.
- Floden, A.M., Watt, J.A., Brissette, C.A., 2011. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS One* 6, e27502.
- Flower, D.R., Macdonald, I.K., Ramakrishnan, K., Davies, M.N., Doytchinova, I.A., 2010. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Research* 6 Suppl 2, S1.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Misse, D., Pages, F., Fusai, T., Rogier, C., Almeras, L., 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasite and Vectors* 4, 187.
- Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99, 3602-3612.
- Francischetti, I.M., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2004. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thrombosis Haemostasis* 91, 886-898.
- Francischetti, I.M., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., Ribeiro, J.M., 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1142-1161.

- Francischetti, I.M., Mans, B.J., Meng, Z., Gudderra, N., Veenstra, T.D., Pham, V.M., Ribeiro, J.M., 2008a. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 1-21.
- Francischetti, I.M., Meng, Z., Mans, B.J., Gudderra, N., Hall, M., Veenstra, T.D., Pham, V.M., Kotsyfakis, M., Ribeiro, J.M., 2008b. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *Journal of Proteomics* 71, 493-512.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* 14, 2051-2088.
- Francischetti, I.M., Anderson, J.M., Manoukis, N., Pham, V.M., Ribeiro, J.M., 2011. An insight into the sialotranscriptome and proteome of the coarse bontlegged tick, *Hyalomma marginatum rufipes*. *Journal of Proteomics* 74, 2892-2908.
- Frauschuh, A., Power, C.A., Deruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M., Martin, T., Wells, T.N., Proudfoot, A.E., 2007. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 27250-27258.
- Galindo, R.C., Doncel-Pérez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A.J., Martín-Hernando, M.P., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 612-617.
- Gao, X., Shi, L., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., Zhou, J., 2011. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *Journal of Insect Physiology* 57, 339-343.
- García Varas, S., 2004. Vacuna anti-*Ornithodoros moubata*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2010. Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *International Journal for Parasitology* 40, 313-326.
- Gaspar, A.R., Joubert, A.M., Crause, J.C., Neitz, A.W., 1996. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology* 20, 583-598.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129 Suppl, S353-366.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., 2007. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *Journal of Vector Borne Diseases* 44, 79-89.
- Gillespie, R.D., Dolan, M.C., Piesman, J., Titus, R.G., 2001. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Immunology* 166, 4319-4326.
- Goto, A., Matsushita, K., Gesellchen, V., El Chamy, L., Kuttenukeuler, D., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., Akira, S., Boutros, M., Reichhart, J.M., 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nature Immunology* 9, 97-104.

- 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 Suppl, S427-442.
- Guan, H. & Kiss-Toth, E., 2008. Advanced technologies for studies on protein interactomes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 110, 1-24.
- Gudderra, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M., 2002. Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology* 48, 269-278.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Pérez de León, A.A., 2012. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?. *International Journal for Parasitology* 42, 421-427.
- Hajnicka, V., Vancova, I., Kocakova, P., Slovak, M., Gasperik, J., Slavikova, M., Hails, R.S., Labuda, M., Nuttall, P.A., 2005. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130, 333-342.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J.M., Bowman, A.S., 2004. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* 113, 401-408.
- Harlow, E. & Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 511-551 pp.
- Heegaard, C.W., Rasmussen, L.K., Andreasen, P.A., 1994. The plasminogen activation system in bovine milk: differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding to casein and urokinase receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1222, 45-55.
- Heegaard, C.W., Andreasen, P.A., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., 1997. Binding of plasminogen and tissue-type plasminogen activator to dimeric α_2 -casein accelerates plasmin generation. *Fibrinolysis and Proteolysis* 11, 29-36.
- Hoogstraal, H., 1956. Faunal exploration as a basic approach for studying infections common to man and animals. *East African Medical Journal* 33, 417-424.
- Horigane, M., Shinoda, T., Honda, H., Taylor, D., 2010. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Molecular Biology* 19, 501-515.
- Horn, F., dos Santos, P.C., Termignoni, C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384, 68-73.
- Hovius, J.W., Levi, M., Fikrig, E., 2008. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Medicine* 5, e43.
- Hrachovinova, I., Cambien, B., Hafezi-Moghadam, A., Kappelmayer, J., Camphausen, R.T., Widom, A., Xia, L., Kazazian, H.H., Jr., Schaub, R.G., McEver, R.P., Wagner, D.D., 2003. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nature Medicine* 9, 1020-1025.
- Ibeas, E., Fuentes, L., Martin, R., Hernandez, M., Nieto, M.L., 2009. Secreted phospholipase A₂ type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 81, 54-63.
- Ibrahim, M.A., Ghazy, A.H., Maharem, T., Khalil, M., 2001. Isolation and properties of two forms of thrombin inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 25, 675-698.

- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 1265-1272.
- Ivetic, A., Ridley, A.J., 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112, 165-176.
- Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M., Chinzei, Y., 2003. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *European Journal of Biochemistry* 270, 1926-1934.
- Jongejan, F. & Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.
- Karczewski, J., Endris, R., Connolly, T.M., 1994. Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 6702-6708.
- Karim, S., Singh, P., Ribeiro, J.M., 2011. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* 6, e28525.
- Kato, N., Iwanaga, S., Okayama, T., Isawa, H., Yuda, M., Chinzei, Y., 2005. Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thrombosis Haemostasis* 93, 359-367.
- Kazimírová, M. & Štibrániová, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 43.
- Keidel, E.M., Ribitsch, D., Lottspeich, F., 2010. Equalizer technology--Equal rights for disparate beads. *Proteomics* 10, 2089-2098.
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363-371.
- Kemp, D.H., Stone, B.F., Binnington, K.C., 1982. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) *Physiology of ticks*. Pergamon Press, Oxford, pp. 119-168.
- Kocan, K.M., Manzano-Roman, R., de la Fuente, J., 2007. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. *Parasitology Research* 100, 1411-1415.
- Koh, C.Y., Kazimirova, M., Trimnell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P.A., Kini, R.M., 2007. Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 29101-29113.
- Kopacek, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., Grubhoffer, L., 2000. Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *European Journal of Biochemistry* 267, 465-475.
- Kotsyfakis, M., Anderson, J.M., Andersen, J.F., Calvo, E., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 2008. Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *Journal of Immunology* 181, 5209-5212.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H.H., Turner, P.C., 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene* 342, 243-249.
- Lakkaraju, A. & Rodríguez-Boulan, E., 2008. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends in Cell Biology* 18, 199-209.
- Lane, R.S., Moss, R.B., Hsu, Y.P., Wei, T., Mesirov, M.L., Kuo, M.M., 1999. Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61, 850-859.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E., 2002. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 10083-10089.
- Leppänen, A. & Cummings, R.D., 2010. Fluorescence-based solid-phase assays to study glycan-binding protein interactions with glycoconjugates. *Methods in Enzymology* 478, 241-264.
- Liao, M., Zhou, J., Gong, H., Boldbaatar, D., Shirafuji, R., Battur, B., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., 2009. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology* 55, 164-173.
- Link, A.J. & Labaer, J., 2008. Using the Nucleic Acid Programmable Protein Array (NAPPA) for identifying protein-protein interactions: General guidelines. *CSH Protocols* 2008, pdb.ip62.
- Liyou, N., Hamilton, S., Elvin, C., Willadsen, P., 1999. Cloning and expression of ecto 5-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Molecular Biology* 8, 257-266.
- Ludwig, A.K., Giebel, B., 2012. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 11-15.
- Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B.M., Friedrich, T., Mentele, R., Sturzebecher, J., Fuentes-Prior, P., Pereira, P.J., 2008. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* 3, e1624.
- Mans, B.J., 2011. Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity* 3, 41-51.
- Mans, B.J. & Ribeiro, J.M., 2008a. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 841-852.
- Mans, B.J. & Ribeiro, J.M., 2008b. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 862-870.
- Mans, B.J., Gasper, A.R., Louw, A.I., Neitz, A.W., 1998. Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry & Molecular Biology* 120, 617-624.
- Mans, B.J., Venter, J.D., Vrey, P.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2001. Identification of putative proteins involved in granule biogenesis of tick salivary glands. *Electrophoresis* 22, 1739-1746.

- Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2003. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1158-1167.
- Mans, B.J., Venter, J.D., Coons, L.B., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2004. A reassessment of argasid tick salivary gland ultrastructure from an immuno-cytochemical perspective. *Experimental and Applied Acarology* 33, 119-129.
- Mans, B.J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Schwan, T.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Hammer, C.H., Ribeiro, J.M., 2008a. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 42-58.
- Mans, B.J., Andersen, J.F., Schwan, T.G., Ribeiro, J.M., 2008b. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 22-41.
- Mans, B.J., Ribeiro, J.M., Andersen, J.F., 2008c. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 18721-18733.
- Manzano Román, R., 2002. Vacuna anti-*Ornithodoros erraticus*. Tesis Docotral. Universidad de Salamanca.
- Manzano-Román, R., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2006. Antigens from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* induce lethal anti-tick immune responses in pigs and mice. *Veterinary Parasitology* 135, 65-79.
- Manzano-Román, R., García-Varas, S., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2007. Purification and characterization of a 45-kDa concealed antigen from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* that induces lethal anti-tick immune responses in pigs. *Veterinary Parasitology* 145, 314-325.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., González-González, M., Matarraz, S., Álvarez-Prado, A.F., LaBaer, J., Orfao, A., Pérez-Sánchez, R., Fuentes, M., 2012a. Self-assembled protein arrays from an *Ornithodoros moubata* salivary gland expression library. *Journal of Proteome Research* 11, 5972-5982.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R., 2012b. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Veterinary Parasitology* 185, 248-259.
- Manzano-Román, R., Dasilva, N., Díez, P., Díaz-Martín, V., Pérez-Sánchez, R., Orfao, A., Fuentes, M., 2013. Protein arrays as tool for studies at the host-pathogen interface. *Journal of Proteomics* 94, 387-400.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A.W., Gaspar, A.R., 2007. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology* 23, 397-407.
- Maritz-Olivier, C., van Zyl, W., Stutzer, C., 2012. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick Borne Diseases* 3, 179-187.

- Markus, G., Hitt, S., Harvey, S.R., Tritsch, G.L., 1993. Casein, a powerful enhancer of the rate of plasminogen activation. *Fibrinolysis* 7, 229-236.
- Martínez, M., Joffraud, M., Giraud, S., Baisse, B., Bernimoulin, M.P., Schapira, M., Spertini, O., 2005. Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 5378-5390.
- Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73, 1907-1920.
- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., de la Fuente, J., 2011. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine* 29, 8575-8579.
- Merino, O., Alberdi, P., Pérez de la Lastra, J.M., de la Fuente, J., 2013. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 30.
- Meyer, M.C., Creer, M.H., McHowat, J., 2005. Potential role for mast cell tryptase in recruitment of inflammatory cells to endothelium. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 289, 3.
- Miersch, S. & LaBaer, J., 2011. Nucleic Acid programmable protein arrays: versatile tools for array-based functional protein studies. *Current Protocols in Protein Science*. Chapter 27, Unit 27.22.
- Minoura, H., Chinzei, Y., Kitamura, S., 1985. *Ornithodoros moubata*: host immunoglobulin G in tick hemolymph. *Experimental Parasitology* 60, 355-363.
- Molenaar, T.J., Appeldoorn, C.C., de Haas, S.A., Michon, I.N., Bonnefoy, A., Hoylaerts, M.F., Pannekoek, H., van Berkel, T.J., Kuiper, J., Biessen, E.A., 2002. Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists. *Blood* 100, 3570-3577.
- Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Villar, M., Jiménez, M., Pinal, R., Estrada-Peña, A., Molina, R., Lucientes, J., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2013. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine* 31, 1187-1196.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117, 307-310.
- Motoyashiki, T., Tu, A.T., Azimov, D.A., Ibragim, K., 2003. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. *Thrombosis Research* 110, 235-241.
- Mulenga, A., Macaluso, K.R., Simser, J.A., Azad, A.F., 2003. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 911-919.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Girard, C., Yamamoto, K., Lambeau, G., 2010. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 92, 561-582.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Sato, H., Yamamoto, K., 2011. Secreted phospholipase A₂ revisited. *The Journal of Biochemistry* 150, 233-255.

- Nakajima, C., Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Nishikado, H., Ohashi, K., Onuma, M., 2006. A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68, 447-452.
- Nakaya, H.I., Li, S., Pulendran, B., 2012. Systems vaccinology: learning to compute the behavior of vaccine induced immunity. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine* 4, 193-205.
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig, E., 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology* 11, 641-650.
- Nebreda Mayoral, T., Merino, F.J., Serrano, J.L., Fernández-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez, R., 2004. Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of Spain. *European Journal of Epidemiology* 19, 79-83.
- Need, J.T. & Butler, J.F., 1991. Possible applications of the immune response of laboratory mice to the feeding of argasid ticks. *Journal of Medical Entomology* 28, 250-253.
- Nienaber, J., Gaspar, A.R., Neitz, A.W., 1999. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology* 93, 82-91.
- Nogueira, S.V., Smith, A.A., Qin, J.H., Pal, U., 2012. A surface enolase participates in *Borrelia burgdorferi*-plasminogen interaction and contributes to pathogen survival within feeding ticks. *Infection and Immunity* 80, 82-90.
- Nonaka, M. & Yoshizaki, F., 2004. Evolution of the complement system. *Molecular Immunology* 40, 897-902.
- Nunn, M., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., Nuttall, P.A., 2005. Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Immunology* 15, 2084-2091.
- Nuttall, P.A. & Labuda, M., 2008. Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1990. Relationships between the defensive systems of Iberian-breed swine and the European vector of African swine fever, *Ornithodoros erraticus*. *The Journal of Parasitology* 76, 874-880.
- Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1990. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Veterinary Record* 126, 32-37.
- Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Veterinary Parasitology* 52, 97-111.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1149-1159.

- Oliveira, C.J., Cavassani, K.A., More, D.D., Garlet, G.P., Aliberti, J.C., Silva, J.S., Ferreira, B.R., 2008. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *International Journal for Parasitology* 38, 705-716.
- Oliveira, C.J., Anatriello, E., de Miranda-Santos, I.K., Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Ferreira, B.R., Ribeiro, J.M., 2013. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. *Ticks and Tick Borne Diseases*.
- Olver, C. & Vidal, M., 2007. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcellular Biochemistry* 43, 99-131.
- Packila, M. & Guilfoile, P.G., 2002. Mating, male *Ixodes scapularis* express several genes including those with sequence similarity to immunoglobulin-binding proteins and metalloproteases. *Experimental and Applied Acarology* 27, 151-160.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 902-920.
- Pancholi, V. & Chhatwal, G.S., 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 293, 391-401.
- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, I., Jr., 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *The Veterinary Journal* 194, 158-165.
- Paul, W.E., 2008. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Penrith, M.L., Vosloo, W., Jori, F., Bastos, A.D., 2013. African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Research* 173, 228-246.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1992. Analysis of the specificity of the salivary antigens of *Ornithodoros erraticus* for the purpose of serological detection of swine farms harbouring the parasite. *Parasite Immunology* 14, 201-216.
- Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *Veterinary Record* 135, 207-209.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Manzano-Román, R., 2010a. Surveillance of ticks in Europe based on indirect methods: the anti-tick ELISA test. *VBORNET Newsletter* 4. Special issue 'TICKS'.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Siles-Lucas, M., Díaz-Martín, V., De La Torre, E., Hernández-González, A., Manzano-Román, R., 2010b. Aplicación de eucalizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de *Ornithodoros moubata*. *Proteómica* 5, 143-145.
- Polgar, J., Matuskova, J., Wagner, D.D., 2005. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 1590-1596.
- Preston, S.G., Majtan, J., Kouremenou, C., Rysnik, O., Burger, L.F., Cabezas Cruz, A., Chiong Guzman, M., Nunn, M.A., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., Austyn, J.M., 2013. Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS Pathogens* 9, e1003450.

- Prevot, P.P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2006. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 26361-26369.
- Prudencio, C.R., Pérez de la Lastra, J.M., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2010. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 28, 5398-5406.
- Radisky, D.C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y., Bissell, M.J., 2009. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 228-234.
- Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., Pitto, M., 2011. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* 11, 709-720.
- Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A.Y., Walter, J.C., LaBaer, J., 2004. Self-assembling protein microarrays. *Science* 305, 86-90.
- Ramachandran, N., Raphael, J.V., Hainsworth, E., Demirkan, G., Fuentes, M.G., Rolfs, A., Hu, Y., LaBaer, J., 2008. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nature Methods* 5, 535-538.
- Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Pérez-Sánchez, R., Blanco, E., Michaud, V., Roger, F., 2011. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 247-254.
- Rennie, L., Wilkinson, P.J., Mellor, P.S., 2001. Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Medical and Veterinary Entomology* 15, 140-146.
- Ribeiro, J.M.C. & Arcà, B., 2009. From Sialomes to the Sialoverse: An insight into salivary potion of blood-feeding insects. *Advances in Insect Physiology* 37, 59-118.
- Ribeiro, J.M. & Spielman, A., 1986. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental Parasitology* 62, 292-297.
- Ribeiro, J.M., Endris, T.M., Endris, R., 1991. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part: Physiology* 100, 109-112.
- Ribeiro, J.M., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I.M., Mans, B.J., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Wikel, S.K., 2006. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 111-129.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12, 136.
- Ribeiro, J.M., Labruna, M.B., Mans, B.J., Maruyama, S.R., Francischetti, I.M., Barizon, G.C., de Miranda Santos, I.K., 2012. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 332-342.
- Ricci, C.G., Pinto, A.F., Berger, M., Termignoni, C., 2007. A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 42, 291-300.

- Righetti, P.G., Boschetti, E., Lomas, L., Citterio, A., 2006. Protein Equalizer Technology: the quest for a "democratic proteome". *Proteomics* 6, 3980-3992.
- Roger, F., Ratovonjato, J., Vola, P., Uilenber, G., 2001. *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Experimental and Applied Acarology* 25, 263-269.
- Roshdy, M.A., 1972. The subgenus *Persicargas* (Ixodoidea, Argasidae, Argas). 15. Histology and histochemistry of the salivary glands of *A. (P.) persicus* (Oken). *Journal of Medical Entomology* 9, 143-148.
- Roshdy, M.A. & Coons, L.B., 1975. The subgenus *Persicargas* (Ixodoidea: Argasidae: Argas). 23. Fine structure of the salivary glands of unfed *A. (P.) Arboreus* Kaiser, Hoogstraal, and Kohls. *The Journal of Parasitology* 61, 743-752.
- Roversi, P., Lissina, O., Johnson, S., Ahmat, N., Paesen, G.C., Ploss, K., Boland, W., Nunn, M.A., Lea, S.M., 2007. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *Journal of Molecular Biology* 369, 784-793.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.
- Salat, J., Paesen, G.C., Rezacova, P., Kotsyfakis, M., Kovarova, Z., Sanda, M., Majtan, J., Grunclova, L., Horka, H., Andersen, J.F., Brynda, J., Horn, M., Nunn, M.A., Kopacek, P., Kopecky, J., Mares, M., 2010. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochemical Journal* 429, 103-112.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Stiles, B.G., Girish, K.S., Swamy, S.N., Hemshekhar, M., Tan, K.S., Rowan, E.G., Sethi, G., Chow, V.T., 2012. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. *Current Medical Chemistry* 19, 6150-6162.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Martínez-López, B., 2012. African swine fever: An epidemiological update. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Sanders, M.L., Jaworski, D.C., Sánchez, J.L., DeFraités, R.F., Glass, G.E., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Needham, G.R., Schwartz, B.S., 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 279-285.
- Santos, I.K., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., de Castro, M., Costa, J.N., Costa, A.M., da Silva, E.R., Neto, O.B., Rocha, C., Daffre, S., Ferreira, B.R., da Silva, J.S., Szabo, M.P., Bechara, G.H., 2004. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026, 242-246.
- Schroeder, H., Skelly, P.J., Zipfel, P.F., Losson, B., Vanderplassen, A., 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 5-13.
- Schuijt, T.J., Bakhtiari, K., Daffre, S., Deponte, K., Wienders, S.J., Marquart, J.A., Hovius, J.W., van der Poll, T., Fikrig, E., Bunce, M.W., Camire, R.M., Nicolaes, G.A., Meijers, J.C., van 't Veer, C., 2013. Factor Xa activation of factor V is of paramount importance in initiating the coagulation system: lessons from a tick salivary protein. *Circulation* 128, 254-266.

- Schwartz, B.S., Ribeiro, J.M., Goldstein, M.D., 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *American Journal of Epidemiology* 132, 58-66.
- Schwartz, B.S., Ford, D.P., Childs, J.E., Rothman, N., Thomas, R.J., 1991. Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *American Journal of Epidemiology* 134, 86-95.
- Schwartz, B.S., Nadelman, R.B., Fish, D., Childs, J.E., Forseter, G., Wormser, G.P., 1993. Entomologic and demographic correlates of anti-tick saliva antibody in a prospective study of tick bite subjects in Westchester County, New York. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48, 50-57.
- Schwartz, B.S., Sánchez, J.L., Sanders, M.L., DeFraités, R.F., 1996. Tick avoidance behaviors associated with a decreased risk of anti-tick salivary gland protein antibody seropositivity in military personnel exposed to *Amblyomma americanum* in Arkansas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 410-416.
- Simons, M. & Raposo, G., 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575-581.
- Six, A., Bellier, B., Thomas-Vaslin, V., Klatzmann, D., 2012. Systems biology in vaccine design. *Microbial Biotechnology* 5, 295-304.
- Skerra, A., 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 337-350.
- Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson, W.L., 2002. Ticks (Ixodida), In: Müllen, G., Durden, L. (Eds.) *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press.
- Štibrániová, I., LahovÁ, M., BartÍKovÁ, P., 2013. Immunomodulators in tick saliva and their benefits. *Acta Virologica* 57, 200-216.
- Stoevesandt, O., Taussig, M.J., He, M., 2009. Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert Review of Proteomics* 6, 145-157.
- Svitkin, Y.V., Pause, A., López-Lastra, M., Perreault, S., Sonenberg, N., 2005. Complete translation of the hepatitis C virus genome in vitro: membranes play a critical role in the maturation of all virus proteins except for NS3. *Journal of Virology* 79, 6868-6881.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tanaka, A.S., Andreotti, R., Gomes, A., Torquato, R.J., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A., 1999. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* 45, 171-177.
- Tirloni, L., Seixas, A., Mulenga, A., da Silva Vaz, I., Jr., Termignoni, C., 2014. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental Parasitology* 137, 25-34.
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia, J.S., 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology* 28, 131-141.
- Toledo, A., Coleman, J.L., Kuhlow, C.J., Crowley, J.T., Benach, J.L., 2012. The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infection and Immunity* 80, 359-368.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine* 20, 3560-3568.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of Experimental Biology* 205, 2843-2864.
- van de Locht, A., Stubbs, M.T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Hoffken, W., Huber, R., 1996. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?. *EMBO Journal* 15, 6011-6017.
- Vargas, M., Montero, C., Sánchez, D., Pérez, D., Valdes, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodríguez, E., Mendez, L., Leonart, R., Suarez, M., Fernández, E., Estrada, M.P., Rodríguez-Mallon, A., Farnos, O., 2010. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Veterinary Research* 6, 43.
- Vial, L., 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16, 191-202.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J., 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 31, 3688-3691.
- Walter, P. & Blobel, G., 1983. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods in Enzymology* 96, 84-93.
- Wang, H. & Nuttall, P.A., 1994. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109 (Pt 4), 525-530.
- Wang, H. & Nuttall, P.A., 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 286-295.
- Wang, H., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., Barbour, A.G., 1998. Male ticks help their mates to feed. *Nature* Feb 19;391(6669), 753-754.
- Wang, M., Guerrero, F.D., Perteza, G., Nene, V.M., 2007. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 8, 368.
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., Vlasuk, G.P., 1990. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 248, 593-596.
- Weiner, H., Faupel, T., Bussow, K., 2004. Protein arrays from cDNA expression libraries. *Methods in Molecular Biology* 264, 1-13.
- Wikel, S., 2013. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology* 4, 337.

- Wikel, S., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K., 1996. Arthropod modulation of host immune responses. In: Wikel, S. (Ed.) The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships. CAB International.
- Willadsen, P., 2008. Anti-tick vaccines, In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press. Cambridge.
- Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J., Lai, R., 2006. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 343, 585-590.
- Zahedi, R.P., Volzing, C., Schmitt, A., Frien, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A., Zimmermann, R., 2009. Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. Proteomics 9, 3463-3473.
- Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R.K., Ley, K., 2007. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. Blood Reviews 21, 99-111.
- Zeidner, N., Ullmann, A., Sackal, C., Dolan, M., Dietrich, G., Piesman, J., Champagne, D., 2009. A borreliacidal factor in *Amblyomma americanum* saliva is associated with phospholipase A₂ activity. Experimental Parasitology 121, 370-375.
- Zhu, K., Bowman, A.S., Brigham, D.L., Essenberg, R.C., Dillwith, J.W., Sauer, J.R., 1997. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). Experimental Parasitology 87, 30-38.
- Zhu, K., Dillwith, J.W., Bowman, A.S., Sauer, J.R., 1997. Identification of hemolytic activity in saliva of the lone star tick (Acari:Ixodidae). Journal of Medical Entomology 34, 160-166.
- Zivkovic, Z., Torina, A., Mitra, R., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., Villar, M., Nijhof, A.M., Mani, R., La Barbera, G., Caracappa, S., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2010. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. BMC Immunology 11, 7.

ANEXO.PUBLICACIONES Y PATENTES



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*

Verónica Díaz-Martín, Raúl Manzano-Román, Mar Siles-Lucas, Ana Oleaga, Ricardo Pérez-Sánchez*

Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2010

Received in revised form 1 December 2010

Accepted 8 December 2010

Keywords:

Ornithodoros moubata

TSGP1

Lipocalin

Recombinant antigen

Serological diagnosis

ABSTRACT

The argasid tick *Ornithodoros moubata* is distributed throughout South and East Africa and Madagascar, where it colonizes wild and domestic habitats and feeds on warthogs, domestic swine, and humans. This argasid transmits the spirochete *Borrelia duttonii*, causing East African tick-borne relapsing fever in humans, and the African swine fever virus, which causes a highly lethal haemorrhagic disease in pigs. Tick surveillance and the elimination of *O. moubata* from synanthropic environments (human dwellings and pigsties) would facilitate the control and prevention of these two diseases. Since direct surveillance methods are impractical in this context, the development of an indirect method for the detection of specific antibodies against tick salivary proteins in samples taken from animal or human hosts living in the area under study would provide a more convenient surveillance and diagnostic tool. Previous work has indicated that the 20A1 salivary antigen of *O. moubata* could be an optimal candidate for the development of a specific serological test and identified it as an orthologue of the *Ornithodoros savignyi* TSGP1 lipocalin. The objectives of the present work were to clone, sequence, and molecularly characterize the *O. moubata* TSGP1, as well as its production as a recombinant protein in order to assess its usefulness as a diagnostic antigen in an ELISA test for tick surveillance. Our results show that *O. moubata* TSGP1 (OmTSGP1) conserves the tertiary structure of lipocalins and contains the biogenic amine-binding motif. We also show that OmTSGP1 shares 65% sequence identity with the *O. savignyi* TSGP1, demonstrating that they represent orthologous proteins and suggesting they share identical function as biogenic amine scavengers. A recombinant form of OmTSGP1 was produced, showing 100% sensitivity and 99.4% specificity in an ELISA test for the detection of anti-*O. moubata* antibodies in pig sera. This recombinant antigen represents a promising epidemiological tool for *O. moubata* surveillance that may help to implement control measures against *O. moubata*-borne diseases.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The argasid tick *Ornithodoros moubata* is distributed throughout central, southern and eastern Africa, and the island of Madagascar (Hoogstraal, 1956; Roger et al., 2001; Vial, 2009). This endophilous tick colonizes wild and

domestic habitats, where it hides in holes, cracks and fissures inside and around animal burrows, pigsties, and human dwellings. In the wild, its main hosts are warthogs and other animals inhabiting burrows, whereas in synanthropic environments its main hosts are pigs and humans.

O. moubata transmits *Borrelia duttonii*, the causative agent of East African human relapsing fever, which is endemic in East African countries (Cutler, 2006). In addition, *O. moubata* is a well-established vector for African swine fever virus (Rennie et al., 2001). African swine fever

* Corresponding author. Tel.: +34 923219606; fax: +34 923219609.
E-mail address: ricardo.perez@irnasa.csic.es (R. Pérez-Sánchez).

(ASF) is a devastating hemorrhagic fever that affects swine, with mortality rates approaching 100%. It causes major economic losses, threatens food security, and limits pig production in affected countries (Costard et al., 2009).

The elimination of *O. moubata* from synanthropic environments (human dwellings and pigsties) would largely improve the control and prevention of the above-mentioned diseases. To approach this elimination appropriately, it is essential to have reliable information about the sites infested with *O. moubata* so that the appropriate anti-argasid measures can be applied.

Epidemiological studies based on the finding of *O. moubata* ticks in the field are difficult to perform owing to the nidicolous life style of *O. moubata*, which makes it necessary to explore all possible tick hiding places in the area sampled before it can be regarded as a tick-free site. Instead, serological methods could offer a rapid alternative for such assessments.

Serological methods applied to studies addressing the epidemiology of ticks are based on the detection of specific antibodies against tick salivary proteins in serum samples taken from hosts living in the area under study. Serology against tick salivary proteins has already been used to evaluate the epidemiology of another argasid tick, i.e., *Ornithodoros erraticus*, by ELISA (Canals et al., 1990; Oleaga-Pérez et al., 1994; Pérez-Sánchez et al., 1994). This test allowed the identification of pig farms infested with *O. erraticus* in an ASF-endemic area of Spain and permitted the application of specific control measures to avoid tick–pig contact on tick-infested farms.

The antigen extract used in this ELISA test was a salivary gland extract (SGE) obtained from adult *O. erraticus* ticks. The composition of SGE proved to be qualitatively similar in all the developmental stages of the tick and also to the salivary fluid secreted into the host (Baranda et al., 1997). Although the SGE proved to be a suitable antigen for the serological detection of *O. erraticus*, it has some drawbacks. Its preparation is time-consuming and difficult to standardise, and it may contain non-specific antigens, giving rise to unexpected cross-reactivity. Thus, we were prompted to select and characterize a single antigen from SGE. For this, we purified the four main antigens from both the *O. erraticus* and *O. moubata* SGE and studied their diagnostic value (Baranda et al., 2000). Regarding *O. moubata*, the best candidate for the serodiagnosis of infested animals was its 20A1 antigen, which showed 50% identity in its N-terminus when compared to the TSGP1 salivary lipocalin of *Ornithodoros savignyi* (Baranda et al., 2000; Mans et al., 2001, 2003).

In a later study, we showed that all the spots recognized on the *O. moubata* SGE in 2D-Western blots by a pool of sera from naturally infested pigs corresponded to different isoforms of the same protein, which was identified by *de novo* sequencing as an orthologue of the *O. savignyi* TSGP1 lipocalin, and was assumed to represent the 20A1 antigen (Oleaga et al., 2007).

Lipocalins are small proteins whose main function is the transportation of small molecules. Lipocalins are ubiquitous in nature and, although their amino acid sequence may diverge strongly, the lipocalin three-dimensional structure is strongly conserved. This comprises an eight-stranded anti-parallel β -barrel closed off at one end by an N-terminal

helix and stabilized by a C-terminal α -helix that packs against the side of the barrel (Skerra, 2000). Lipocalins have been classified as “kernel” lipocalins, which show conserved sequence motifs, and “outliers”, which are highly divergent in sequence (Flower et al., 2000). The lipocalins of blood-feeding arthropods fall into this second group (Mans and Ribeiro, 2008a).

In soft ticks, the lipocalin family is by far the most relevant protein family in terms of the number of members as well as in protein expression levels (Mans et al., 2001, 2003, 2008; Oleaga et al., 2007; Francischetti et al., 2008). Regarding functionality, lipocalins have been implicated in the modulation of the host inflammatory response by scavenging of inflammatory mediators (Mans and Ribeiro, 2008a,b; Mans et al., 2008). Additional functions include the targeting of platelet aggregation and the complement system (Waxman and Connolly, 1993; Nunn et al., 2005), as well as involvement in toxicoses and actions as allergens (Mans et al., 2002; Hilger et al., 2005). A range of soft and hard tick lipocalins, including the *O. savignyi* TSGP1, have the so-called biogenic amine-binding motif (BAB), whose more degenerated pattern is CD[VIL]X_{7–17}EL[WY]X_{3–30}C (Mans et al., 2008). Lipocalins showing this motif bind to histamine and serotonin and are thought to act as effective histamine and serotonin scavengers at tick feeding sites (Mans et al., 2008).

The purposes of the present work were: (i) to clone, sequence, and molecularly characterize the *O. moubata* TSGP1 (OmTSGP1), including comparisons between its secondary structure and three dimensional model and those of the *O. savignyi* TSGP1, and (ii) to produce OmTSGP1 as a recombinant protein for application as a diagnostic antigen in an ELISA test for tick surveillance.

2. Materials and methods

2.1. Parasite material

The *O. moubata* specimens are maintained in our laboratory colony, fed regularly on rabbits, and kept in an environmental chamber at 28 °C, 85% relative humidity, and 16 h light/8 h darkness.

Tick salivary glands were extracted from unfed adults (10 males and 10 females) as described elsewhere (Oleaga-Pérez et al., 1994). Once extracted, the glands were washed with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) and immediately processed for RNA isolation. Total RNA was isolated using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey–Nagel), according to the manufacturer's instructions, and preserved at –80 °C.

Salivary glands were also used for the collection of salivary gland extracts (SGE), obtained as described before (Oleaga-Pérez et al., 1994).

2.2. Isolation and amplification of the OmTSGP1 cDNA sequence

Total RNA isolated from salivary glands was used as a starting material for both 3'- and 5'-RACE, which were performed using the 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Table 1
Primers used in 5'/3'-RACE and RT-PCR for OmTSGP1 cDNA amplification and cloning.

Name	Sequence
SP1	5'- GAGCACAGCTGCGTGTACATCTGCCCC
SP2	5'-CTATGGTACCACAGCTCAAGATATGG
SP3	5'-GGTCATTGTCATTGATGTGCTGCCC
SP4	5'-ATGCACCGGCTGCTACTGCTACTC
SP5	5'-TCAACTTTTTGCTCGATGACGTCAGC
SP6	5'-GAAGAAAACCAGCGTGGGAAGGG
Oligo d(T)-anchor	5'-ACCACGGTATCGATGTCGACTTTTTT- TTTTTTTTTV (V = A, C or G)
Anchor	5'-GACCACGGTATCGATGTCGAC

For the 3'-RACE, initial reverse transcription (RT) was performed from total RNA, using the “oligo d(T)-anchor” primer supplied in the kit. 1 µl of the resulting single-stranded cDNA was used as the template for PCR amplification of the OmTSGP1 3'-end, using the “anchor” primer supplied in the kit and a specific sense primer denominated SP1 (Table 1). SP1 was designed by reverse translation of the specific peptide sequence EHSCVYLPP obtained previously by us (Oleaga et al., 2007). PCR was performed in 35 cycles of 94 °C for 15 s, 66 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, followed by a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR product was electrophoresed in an agarose gel and the band was excised and purified using the StrataPrep DNA Gel Extraction kit (Stratagene), as recommended by the manufacturer. The PCR product was cloned into the pSC-A vector using the StrataClone PCR Cloning kit (Stratagene), following the manufacturer's instructions, and the sequencing of both strands was performed at the DNA Sequencing Service of the University of Salamanca. At least three different clones of the insert were sequenced to rule out sequencing errors.

For 5'-RACE, two specific anti-sense primers were designed from the specific 3'-end of the nucleotide sequence just obtained (primers SP2 and SP3, Table 1). Synthesis of the cDNA was performed from total RNA using the SP2 primer. The resulting cDNA was purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Then, polyadenylation of its 3'-end and subsequent amplification of the polyadenylated cDNA by nested PCR were performed following the protocols described in the 5'/3' RACE Kit. The first PCR round was performed using the SP2 and anchor primers in 35 cycles of 94 °C for 15 s, 30 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s for the 10 first cycles, and 94 °C for 15 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s for 25 cycles, followed by a final step at 72 °C for 7 min. The PCR product was diluted 1:20 in water and 1 µl of this dilution was used as template in a second PCR round with the SP3 primer and anchor primers. This PCR was performed in 35 cycles of 94 °C for 15 s, 64 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, followed by a final step at 72 °C for 7 min. The PCR product was purified from an agarose gel, cloned into the pSC-A vector and sequenced in both senses, as described before.

After collection of the nucleotide sequences of the 5'- and 3'-cDNA ends, a new set of specific primers covering the whole coding sequence of OmTSGP1 were designed (primers SP4 and SP5, Table 1).

Total RNA isolated from salivary glands was subjected to RT using the 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche). 1 µl of the resulting cDNA was then amplified using the above-indicated primer set. PCR was performed in 35 cycles of 94 °C for 15 s, 64 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, with a final extension step at 72 °C for 7 min.

Additionally, a mature version of OmTSGP1 cDNA, lacking its predicted signal peptide (see Section 3), was constructed. The mature sequence was amplified using a sense primer designed ad hoc (SP6, Table 1) in combination with the SP5 anti-sense primer. These primers included BamHI adapters to assist in the sub-cloning of the amplified cDNA in the pQE-30 expression vector (Qiagen). PCR was carried out in 35 cycles of 94 °C for 15 s, 64 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, with a final extension step at 72 °C for 7 min. In both cases, the PCR products were purified from agarose gels, cloned into the pSC-A vector, and sequenced in both senses, as described above.

2.3. Bioinformatic analysis of the OmTSGP1 protein

The deduced amino acid sequence of OmTSGP1 was subjected to a bioinformatic analysis to assess its primary structure and post-translational modifications using the corresponding tools at the ExpASY website. The OmTSGP1 amino acid sequence was also used to identify possible orthologues from the non-redundant Genbank protein sequence database by BLASTP analysis. Retrieved sequences with E -values less than 10^{-15} were aligned using ClustalX. In this multiple alignment we also included the sequences of other soft tick lipocalins showing the BAB motif, namely the monomine, monotonin and AM-182 (a closely related paralogue of monotonin) from *Argas monolakensis* and the Arg r 1 from *Argas reflexus*. The alignment was checked manually and adjusted to provide a conserved core of sequence alignment (132 positions). Using this alignment, neighbour-joining analysis was performed using the Mega4 package (Tamura et al., 2007). Gaps were treated as pairwise deletions, amino acid distances were calculated using Poisson model, and branch supports were estimated using bootstraps analysis (10,000 bootstraps).

For the prediction and comparison of the secondary structure, the sequences of *O. moubata* and *O. savignyi* TSGP1 were submitted to the PHYRE server (Kelley and Sternberg, 2009). Models were obtained based on the structures of the AM182-serotonin complex (similar to monotonin) and monomine (Mans et al., 2008). Three-dimensional models of both TSGP1 sequences were obtained by subjecting their sequences to the 3djigsaw server (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw>). These models were visualized using the Pymol package (DeLano, 2002).

2.4. Recombinant protein expression and purification

The cDNA molecule coding for the mature OmTSGP1 protein was sub-cloned into the expression vector pQE-30 (Qiagen) to obtain the corresponding his-tagged recombinant protein (rOmTSGP1). The mature version was chosen instead of the whole molecule in order to facilitate further purification of the recombinant protein. In addition,

we wished to use this recombinant as an antigen in an ELISA assay (see below), and the mature protein – lacking the signal peptide – represents the native antigen exposed to the host.

The pQE-30 recombinant plasmid was transformed into the *Escherichia coli* M15 strain (Qiagen), and expression was induced by adding isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1 mM at 37 °C for 3 h. The induced cells were harvested and lysed by sonication in the binding buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazole, pH 7.9) supplied with the His-Bind Purification kit (Novagen). After a 20 min centrifugation step at 10,000 \times g, the lysate pellet was solubilised in binding buffer containing 8 M urea and re-centrifuged as before. The new supernatant was passed through the His-Bind resin according to the kit manufacturer's instructions. Before elution of the recombinant protein, urea was eliminated by washing the column with washing buffer (0.5 M NaCl, 60 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) containing decreasing concentrations of urea (6 M, 4 M, 2 M and 0 M). Then, the recombinant protein was eluted with elution buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9). The eluted recombinant protein was dialysed against PBS over 24 h at 4 °C and stored at –80 °C until use. The concentration of the recombinant protein was measured by the method of Markwell et al. (1978), and its purity and integrity checked by SDS-PAGE.

2.5. Sera

A total of 172 porcine sera were collected. 18 correspond to sera from pigs experimentally infested with different developmental stages of *O. moubata*. These sera were obtained by Baranda et al. (2000) from 6 pigs infested with either 1000 nymphal-1 or 50 adult *O. moubata* ticks per pig three times at 15-day intervals. Blood samples were taken at seven days after the first infestation (primary response), and at seven days (secondary response) and 2.5 months (residual response) after the third infestation.

27 sera against different developmental stages of *O. erraticus* were also used. These sera were also obtained by Baranda et al. (2000) from 9 pigs infected with either 1000 larval, 200 nymphal-1 or 50 adult *O. erraticus* ticks.

6 sera against the hard ticks *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus turanicus* and *R. bursa*, the pig louse *Haematopinus suis* and the sarcoptic mange mite *Sarcoptes scabiei* were also used. The anti-hard tick sera and anti-louse serum were obtained from 5 pigs experimentally infested; the anti-*S. scabiei* serum was obtained from a pig naturally infested (Pérez-Sánchez et al., 1992).

The pre-infestation sera from all the above pigs (21 sera) were used as experimental negative controls.

Regarding *O. moubata* field negative sera, we selected 100 pig samples from those collected by Oleaga-Pérez et al. (1994) in the province of Salamanca (Spain), an area free of *O. moubata*. These sera included samples from farms free of and infested with *O. erraticus*, as detected with the anti-*O. erraticus* SGE-ELISA (Oleaga-Pérez et al., 1994). These pigs were living under a free-range management system, and hence were exposed to a wide range of ectoparasites.

2.6. ELISA and statistics

Comparison of the diagnostic performance of rOmTSGP1 and the *O. moubata* SGE antigen was done using the ELISA technique for the detection of anti-*O. moubata* IgG antibodies. Briefly, polystyrene plates (Corning) were coated overnight at 4 °C with 1 μ g/well of SGE or 100 ng/well of rOmTSGP1 in 100 μ l/well carbonate buffer (pH 9.6). Plates were washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS (TPBS) and post-coated with 200 μ l/well of 1% BSA in PBS for 1 h at 37 °C. After washing, sera were added in duplicate (100 μ l/well) at 1/300 dilution in PBS and incubated at 37 °C for 1 h. After another wash, peroxidase-labelled anti-pig IgG (Sigma) was added at 1/6000 dilution in TPBS and the plates were incubated for 1 h at 37 °C. After a final washing step, the reaction was developed in the dark with 100 μ l/well of citrate buffer, pH 5, plus orthophenylene diamine (0.6 mg/ml) and hydrogen peroxide (0.4 μ l/ml). The reaction was stopped with 100 μ l/well of 3 N sulphuric acid, and the plates were read at 492 nm in an ELISA reader (EAR 400 FT; SLT Lab Instruments, Germany).

The serological index (SI) was calculated for each optical density (OD) and was used to establish a common cut-off for all the ELISA plates, using the following formula: $[(NC - S)/(NC - PC)] \times 100$, where NC and PC represent the negative and positive controls, respectively, and S stands for each sample serum (Hernández-González et al., 2008).

The sera were classified in groups according to their origin and specificity. In each group of sera, SI means were calculated for the rOmTSGP1 and SGE antigens and compared as related pairs using a *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Receiver-Operator Characteristic (ROC) curves were built for each antigen and used to establish the cut-off values. The cut-off value selected was that giving the highest diagnostic performance for each antigen, which was calculated as the sum of the sensitivity and specificity divided by two. The area under the ROC curve (AUC) was used to compare the diagnostic performance of both antigens.

All statistical analyses were done with the SPSS v17 package.

3. Results

3.1. Amplification, cloning and sequencing of the OmTSGP1 cDNA

Amplification and sequencing of the complete coding sequence of the *O. moubata* TSGP1 cDNA was achieved by 3'/5'-RACE and RT-PCR (Fig. 1A). This cDNA molecule contained a 597-nucleotide open reading frame coding for a protein of 198 amino acids, with a predicted molecular weight and pI of 21,718 Da and 5.31, respectively. This sequence was submitted to GenBank and received accession number HM481418 (to be released).

The translated protein (Fig. 1B) shows a predicted signal peptide comprising its 17 amino terminal residues (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) and includes

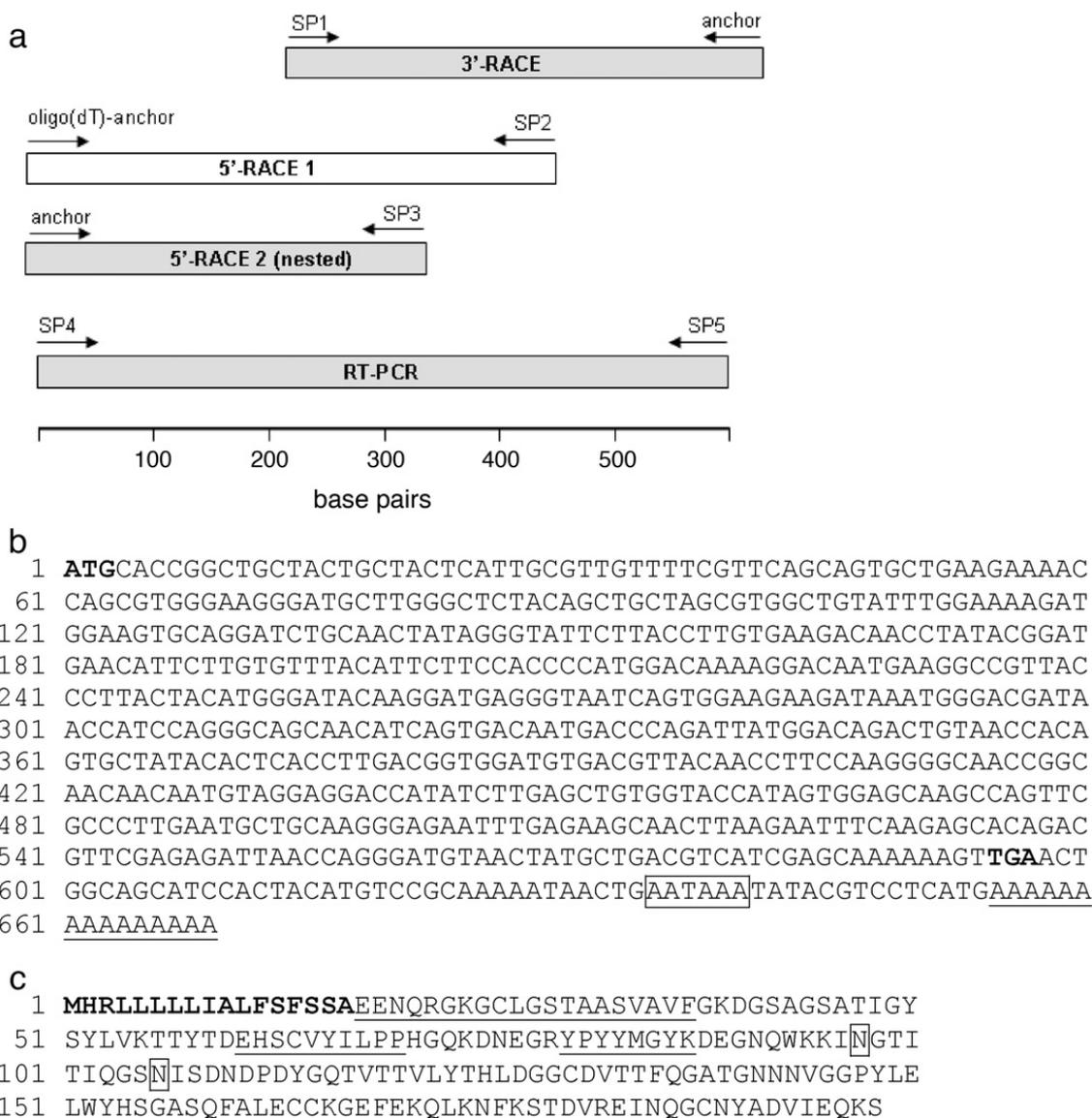


Fig. 1. (A) Strategy for the amplification of the OmTSGP1 cDNA. Arrows indicate the specific and anchor primers used (see Table 1). Boxes show the OmTSGP1 cDNA sequence fragment amplified in each reaction. Shadow boxes show the PCR products that were cloned and sequenced. (B) cDNA sequence containing the open reading frame of *Ornithodoros moubata* TSGP1 and the 3'-untranslated region. Initiation and stop codons are in bold, poly-adenylation site is boxed and poly-A tail is underlined. (C) Deduced amino acid sequence of the OmTSGP1 protein: predicted signal peptide is in bold. Partial amino acid sequences provided by Baranda et al. (2000) and Oleaga et al. (2007) are underlined. Potential N-glycosylation sites on asparagines 97 and 106 are boxed.

the partial amino acid sequences obtained by Baranda et al. (2000) and Oleaga et al. (2007). The mature protein, without signal peptide, shows the same N-terminal sequence as the 20A1 native antigen, except at position 9 (cysteine/methionine). Additionally, two potential N-glycosylation sites on asparagines 97 and 106 were found (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>). The protein sequence lacks both transmembrane helices (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) and glycosyl-phosphatidyl inositol anchors (<http://gpi.unibe.ch>).

3.2. Phylogenetic analysis of OmTSGP1 and other soft-tick lipocalins containing the BAB motif

BLASTP analysis of the non-redundant Genbank protein database using the TSGP1 sequence of *O. moubata* retrieved 5 soft-tick lipocalins with *E*-values below 10^{-15} .

These included the TSGP1 from *O. savignyi* (Mans et al., 2001) and 4 lipocalins from the sialome of *Ornithodoros parkeri* (Francischetti et al., 2008). These sequences were aligned together with 4 additional soft-tick lipocalins selected owing to the presence of the BAB motif in their sequences, consisting of the *A. monolakensis* monomine, monotonin and AM-182 and the *A. reflexus* Arg r 1 (Mans et al., 2008). Fig. 2 shows that the BAB motif pattern CDVX₇₋₁₇ELWX₁₂₋₁₅C is well conserved among all the aligned sequences. All of them also showed the six cysteine residues (highlighted in grey in Fig. 2) required to build the disulphide bond pattern proposed by Mans et al. (2008) for the biogenic amine-binding lipocalins of soft ticks. Phylogenetic analysis of the amino acid sequences (Fig. 3) indicated that these proteins were grouped within two major clades, corresponding to both genera *Ornithodoros* and *Argas*.

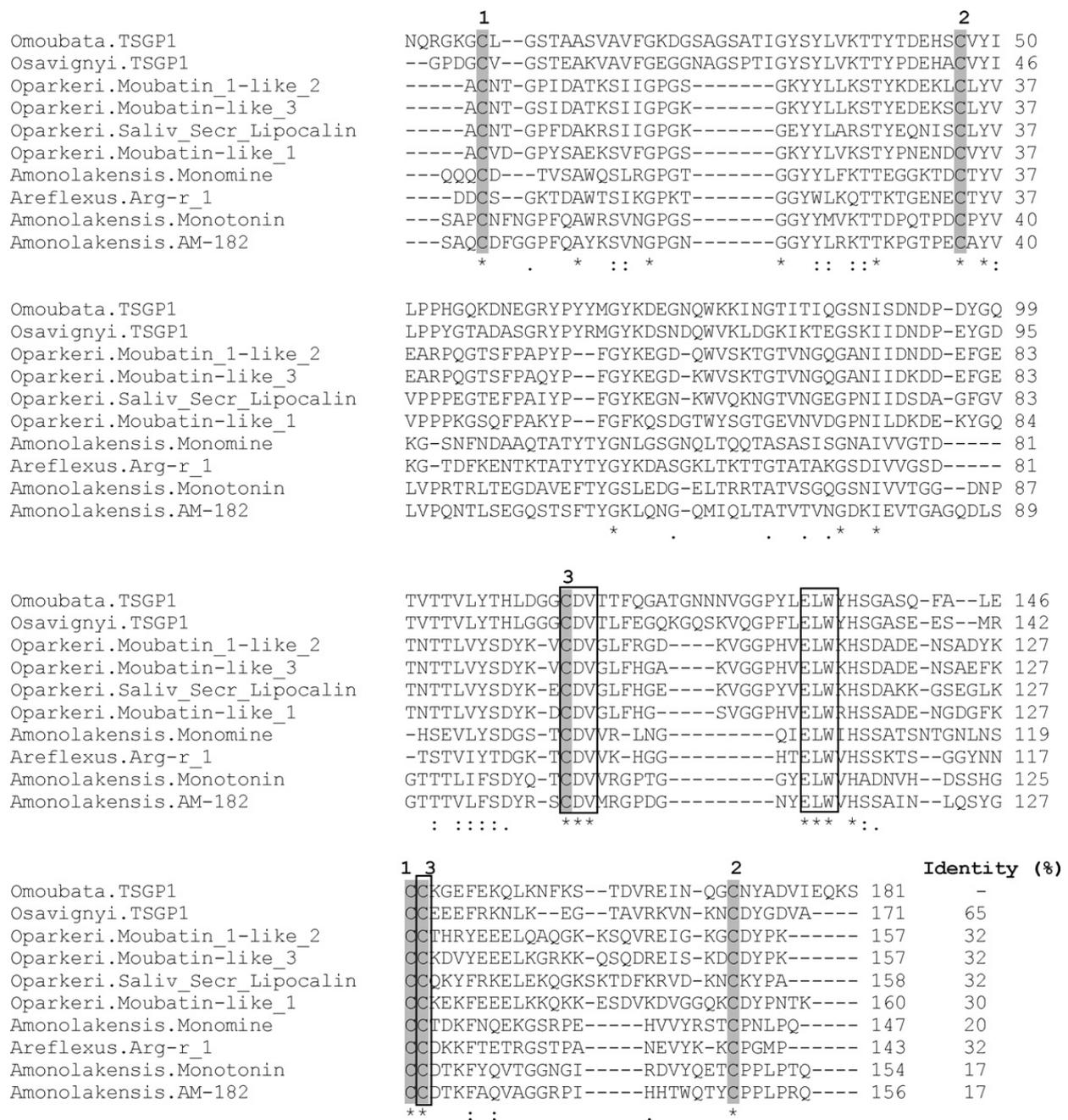


Fig. 2. Alignment of *Ornithodoros moubata* TSGP1 (HM481418) with soft tick lipocalins showing the BAB motif: *Ornithodoros savignyi* TSGP1 (25991387); *Ornithodoros parkeri* moubatin 1-like 2 (149287000), moubatin like 3 (149287030), salivary secreted lipocalin (149287088) and moubatin like 1 (149286896); *Argas monolakensis* monomine (114152936), monotonin (114152976) and AM-182 (114153056), and *Argas reflexus* Arg r 1 (58371884). The amino acids conserved in all the sequences are labelled with asterisks, the conservative and semi-conservative substitutions are labelled with two and one point, respectively. Conserved cysteines are further highlighted in grey. The 3 disulfide bridges, as derived from the structures of *O. savignyi* TSGP1 and monomine, are indicated with paired numbers on the cysteine residues involved. The BAB motif is highly conserved (boxed residues) and presents the following pattern CDVX₇₋₁₇ELWX₁₂₋₁₅C. The percentage of sequence identity between *O. moubata* TSGP1 and the other lipocalins is indicated.

3.3. Molecular modeling of the *O. moubata* and *O. savignyi* TSGP1

Sequences of *O. moubata* and *O. savignyi* TSGP1 were submitted to the PHYRE server (Kelley and Sternberg, 2009), and for both proteins models were obtained based on the structures of the *A. monolakensis* AM-182 serotonin complex and monomine (Mans et al., 2008). The estimated precision of each model was 100%. Both proteins were

aligned with each other, showing that conserved residues occur in discrete clusters and correspond to regions predicted to be involved in secondary structure formation (Fig. 4A).

The predicted three dimensional models were similar for both proteins. They consisted of an eight-stranded anti-parallel β -barrel and a C-terminal α -helix that packs against the side of the barrel, which is characteristic of the tertiary structure of lipocalins (Fig. 4B).

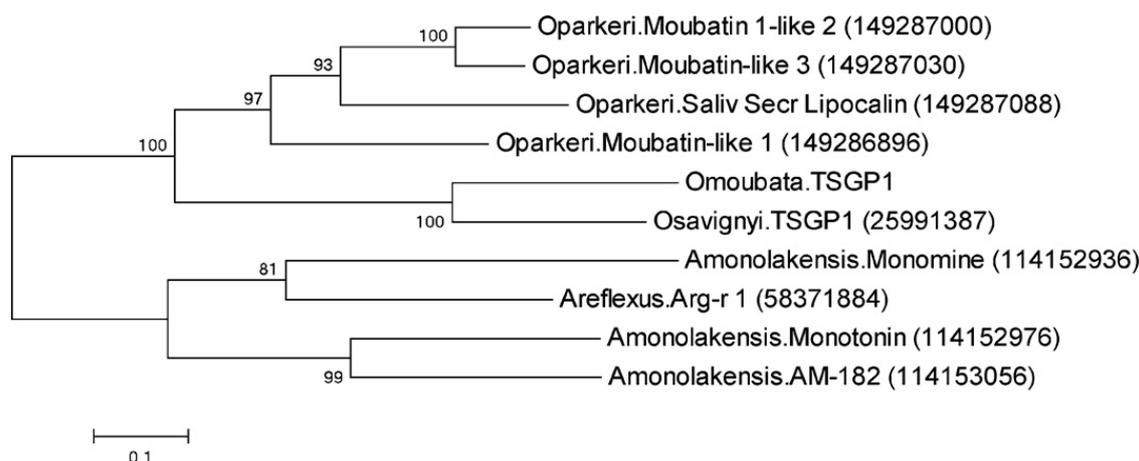


Fig. 3. Neighbor-joining analysis of soft tick BAB motif-containing lipocalins including *Ornithodoros moubata* TSGP1 (HM481418), *Ornithodoros savignyi* TSGP1 (25991387); *Ornithodoros parkeri* moubatin 1-like 2 (149287000), moubatin-like 3 (149287030), salivary secreted lipocalin (149287088) and moubatin-like 1 (149286896); *Argas monolakensis* monomine (114152936), monotonin (114152976) and AM-182 (114153056), and *Argas reflexus* Arg r 1 (58371884). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. Branch support values (10,000 bootstraps) for nodes are indicated.

3.4. Expression and purification of the rOmTSGP1 protein

The mature version of the OmTSGP1 cDNA was sub-cloned into the pQE-30 vector and transformed into M15 *E. coli* cells. This afforded 3.1 mg of purified rOmTSGP1 per litre of culture. The purified protein migrated as a single band of 21 kDa in reducing SDS-PAGE (data not shown), in good agreement with the predicted 21,202 Da molecular mass of the his-tagged recombinant polypeptide. The predicted molecular mass and pI values of the mature recombinant protein without including the tag were 19,803 Da and 5.02, respectively.

3.5. Comparative performance of rOmTSGP1 and SGE in ELISA

ROC analysis of the SIs for both antigens showed the best AUC for rOmTSGP1 (0.998) when compared to the SGE AUC (0.971), and allowed a cut-off value for rOmTSGP1 to be established that was two-fold lower than for SGE (7.53% and 14.57%, respectively; Fig. 5 and Table 2). Using these cut-off values, rOmTSGP1 reacted with one serum from the group of negative field sera (99% specificity in this group), whereas SGE reacted with thirteen sera from the same group (87% specificity). The ELISA-rOmTSGP1 showed 100% sensitivity and 99.4% specificity (99.7% diagnostic performance), whereas SGE provided 100% sensitivity and 91.5% specificity (95.75% diagnostic performance).

Table 3 shows the mean SI ± SD obtained with the SGE and tOmTSGP1 antigens for the different groups of sera tested. With two exceptions, all positive and negative serum groups resulted in higher SIs with SGE than with

rOmTSGP1. The SI differences between SGE and rOmTSGP1 for the positive serum groups were not significant, whereas for all the groups of negative sera the comparisons showed significantly higher SIs with SGE than with rOmTSGP1.

In addition, all the negative serum groups reacted equally with rOmTSGP1 (mean SI around 2%), whereas their reactivity against the SGE varied widely among groups, SIs as high as 10% being reached in some of these groups (i.e., the anti-ectoparasite and field negative).

4. Discussion

Our previous work showed that the 20A1 salivary antigen from *O. moubata*, identified as a putative orthologue of the *O. savignyi* TSGP1 lipocalin (Oleaga et al., 2007), could be a good candidate for the standardization of a serological test for the detection of anti-*O. moubata* antibodies in animals and humans (Baranda et al., 2000).

We therefore cloned and further characterized this protein, obtaining a complete cDNA sequence that was confirmed to represent the *O. moubata* TSGP1 molecule. The corresponding protein shows a signal peptide that, when processed post-translationally, results in a mature protein matching the MW, pI and N-terminal sequence of the 20A1 antigen purified by Baranda et al. (2000), showing that the 20A1 is an isoform of the *O. moubata* TSPGP1, as anticipated by us (Oleaga et al., 2007).

Phylogenetic analysis of the amino acid sequence of OmTSGP1 confirmed that this is an orthologue of the *O. savignyi* TSGP1, and that it also belongs to the serotonin- and histamine-binding clade of the soft tick lipocalins defined by Mans et al. (2008). Our results indicate that

Table 2

Comparative analysis based on ROC curves of the diagnostic performance of rOmTSGP1 and SGE antigens in ELISA for the detection of anti-*O. moubata* IgG antibodies: area under the curve ± standard error (AUC ± SE), confidence interval (CI), cut-off, sensitivity, specificity, and diagnostic performance for each antigen.

Antigen	AUC ± SE	CI (95%)	Cut-off (% SI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Diagnostic performance
rOmTSGP1	0.998 ± 0.002	0.000–1.000	7.53	100	99.4	99.70
SGE	0.971 ± 0.012	0.948–0.999	14.57	100	91.5	95.75

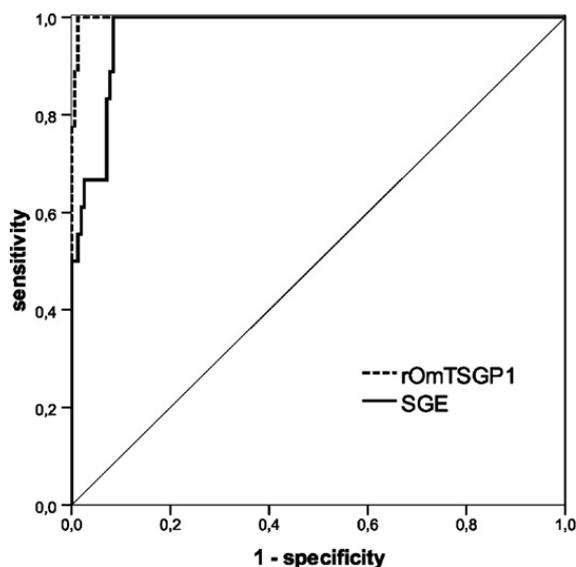


Fig. 5. ROC curves constructed to analyse and compare the diagnostic performance of rOmTSGP1 and SGE antigens in ELISA for the detection of anti-*O. moubata* IgG antibodies with a panel of defined sera. These curves were used to determine the area under the curve and the cut-off values for the SGE and rOmTSGP1 antigens.

the sequences analysed can be grouped in two genus-specific clades for *Ornithodoros* and *Argas*, respectively. This suggests that the two clades are orthologous groups (i.e., monophyletic) and that gene duplication events after divergence of the two genera would lead to a number of paralogous proteins, as already inferred by Mans et al. (2008) and Mans and Ribeiro (2008a). It should be also noted that three of the *O. parkeri* proteins included in our analysis have previously been annotated as “moubatin-like” (Francischetti et al., 2008). Here, BLASTP analysis of the non-redundant database using OmTSGP1 as a query retrieved those sequences as TSGP1-like, while, conversely, BLASTP analysis of the non-redundant database using each of the three *O. parkeri* sequences as queries always retrieved TSGP1 as best “other species” hit, suggesting that they have a closer functional relationship to TSGP1 than to moubatin, in agreement with Mans et al. (2008). Similar annotations were addressed in regard to cysteinyl leukotriene scavenger lipocalins and also their relationship with moubatin (Mans and Ribeiro, 2008b).

Our results also show that *O. moubata* TSGP1 displays high sequence identity with the *O. savignyi* orthologue, including the same BAB motif pattern, and that it also exhibits secondary and tertiary structures very similar to those from the above-mentioned protein. It may be inferred from these results that *O. moubata* TSGP1 has a similar biological function to that of *O. savignyi* TSGP1; e.g., as a histamine- and serotonin-scavenger. Histamine and serotonin have many roles in host defence against blood loss and tick infestation. Among others, they induce a feeling of pain and itching, thereby increasing the risk of tick rejection by host grooming. Therefore, host biogenic amine scavenging by ticks seems to be crucial for successful tick feeding (Mans et al., 2008; Francischetti et al., 2008).

Furthermore, the evidence presented here together with previous results obtained by us suggest that TSGP1

could be the main histamine and serotonin scavenger in the saliva of *O. moubata*. This is supported by the high abundance of this protein in the salivary glands of *O. moubata* (>90% of the protein mass; Oleaga et al., 2007) and by the high number of TSGP1 immunogenic isoforms present in *O. moubata* salivary glands (18 isoforms; Oleaga et al., 2007). The redundancy achieved by the multiplication of protein isoforms could be necessary for effective scavenging of the histamine and serotonin that accumulate at the tick feeding site (Mans et al., 2008). This could result in the use of different TSGP1 paralogues when they lose their functionality due to targeting by the immune system. Thus each individual would not express all the isoforms, but rather only one or some of them. Indeed, this phenomenon has been observed for the proteins of the IxAC family, which are specific inhibitors of the alternative complement pathway expressed by the salivary gland of *Ixodes ricinus* (Couvreur et al., 2008).

The abundance and antigenicity of *O. moubata* TSGP1 also point to this antigen as a candidate for the serodiagnosis of *O. moubata* infested animals and humans. Here, we obtained TSGP1 as a recombinant protein to assess its sensitivity and specificity in ELISA. This was compared with the performance of SGE in the same diagnostic test. rOmTSGP1 showed lower SIs than the SGE, although both antigens resulted in 100% sensitivity, detecting all positive sera. These included low positive primary and residual response sera, meaning that both SGE and rOmTSGP1 can be used to detect specific anti-tick antibodies in pigs, at least from 7 days after the primary tick bite to 2.5 months after the last pig–tick contact.

In order to assess the specificity of rOmTSGP1, we tested the rOmTSGP1 and SGE antigens with a panel of negative sera comprising sera from pigs experimentally infested with *O. erraticus* and other ectoparasites different from *O. moubata*, and sera taken from free-range pigs from the province of Salamanca in Spain (field sera). These free-range pigs are exposed to a wide range of ectoparasites but not to *O. moubata* since this species is not present in Spain. Our results showed that SGE gave rise to a higher number of false-positive results than the rOmTSGP1 with the field sera. Furthermore, rOmTSGP1 showed very low background reactivity with all the negative sera, thus improving the discrimination between negative and positive sera when compared with the SGE extract. This is of particular interest for the detection of positive sera with low reactivity. The ROC analysis and cut-off calculations for each antigen confirmed that rOmTSGP1 shows a better diagnostic performance (99.70%) than SGE (95.75%).

In conclusion, we have obtained the TSGP1 recombinant antigen from *O. moubata* and shown that an ELISA test based on its use is a suitable tool for detecting specific exposure of pigs to *O. moubata*. Regarding diagnostic performance, this recombinant protein performed better than the SGE. Together with the fact that recombinant proteins are always advantageous in comparison with crude extracts, since they can be homogeneously produced in large amounts, this shows that the rOmTSGP1 antigen is a promising tool for the surveillance of *O. moubata* epidemiology. This in turn could substantially improve approaches for the implementation of control measures against *O.*

moubata-borne diseases; namely African swine fever and human relapsing fever.

Acknowledgement

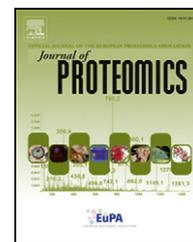
This work was supported by grant no. CSI07A08 from the Regional Government of Castile & León (Spain).

References

- Baranda, J.A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1997. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. *J. Parasitol.* 83, 831–838.
- Baranda, J.A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Manzano, R., Encinas-Grandes, A., 2000. Purification, N-terminal sequencing and reactivity of the major antigens of *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. *Vet. Parasitol.* 87, 193–206.
- Canals, A., Oleaga, A., Pérez, R., Dominguez, J., Encinas, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs experimental and field infested with *Ornithodoros erraticus*. *Vet. Parasitol.* 37, 145–153.
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., Dixon, L.K., 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2683–2696.
- Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotiaux, B., Decrem, Y., Pierre-Paul Prévôt, P.P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2008. Variability and action mechanism of a family of anticomplement proteins in *Ixodes ricinus*. *Plos ONE* 3, e1400, doi:10.1371/journal.pone.0001400.
- Cutler, S., 2006. Possibilities for relapsing fever re-emergence. *Emer. Infect. Dis.* 12, 369–374.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- Flower, D.R., North, A.C., Sansom, C.E., 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9–24.
- Francischetti, I.M., Mans, B.J., Meng, Z., Gudderra, N., Veenstra, T.D., Pham, V.M., Ribeiro, J.M., 2008. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 1–21.
- Hernández-González, A., Muro, A., Barrera, I., Ramos, G., Orduña, A., Siles-Lucas, M., 2008. Usefulness of four different *Echinococcus granulosus* recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin. Vacc. Immunol.* 15, 147–153.
- Hilger, C., Bessot, J.C., Hutt, N., Grigioni, F., DeBlay, F., Pauli, G., Hentges, F., 2005. IgE-mediated anaphylaxis caused by bites of the pigeon tick *Argas reflexus*: cloning and expression of the major allergen Arg r 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 617–622.
- Hoogstraal, H. (Ed.), 1956. African Ixodoidea I. Ticks of the Sudan. Department of Medical Zoology, U.S. Naval Medical Research Unit No. 3, Cairo, Egypt.
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E., 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the phyre server. *Nat. Protoc.* 4, 363–371.
- Mans, B.J., Ribeiro, J.M.C., 2008a. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 841–852.
- Mans, B.J., Ribeiro, J.M.C., 2008b. A novel group of peptide leukotriene scavengers in soft ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 862–870.
- Mans, B.J., Venter, J.D., Vrey, P.J., Louw, A.I., Neitz, A.W.H., 2001. Identification of putative proteins involved in granule biogenesis of tick salivary glands. *Electrophoresis* 22, 1739–1746.
- Mans, B.J., Steinmann, C.M., Venter, J.D., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2002. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Toxicon* 40, 1007–1016.
- Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W.H., 2003. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1158–1167.
- Mans, B.J., Ribeiro, J.W., Andersen, J.A., 2008. Structure, function and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *J. Biol. Chem.* 283, 18721–18733.
- Markwell, M.K., Hass, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Ann. Biochem.* 87, 206–210.
- Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., Nuttall, P.A., 2005. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* 174, 2084–2091.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1149–1159.
- Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by serology. Elimination of unspecific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Vet. Parasitol.* 52, 97–111.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1992. Analysis of the specificity of the salivary antigens of *Ornithodoros erraticus* for the purpose of serological detection of the swine farms harbouring the parasite. *Parasite Immunol.* 14, 201–216.
- Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca (Spain). *Vet. Rec.* 135, 207–209.
- Rennie, L., Wilkinson, P.J., Mellor, P.S., 2001. Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Med. Vet. Entomol.* 15, 140–146.
- Roger, F., Ratovonjato, J., Vola, P., Uilenber, G., 2001. *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp. Appl. Acarol.* 25, 263–269.
- Skerra, A., 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 337–350.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Vial, L., 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16, 191–202.
- Waxman, L., Connolly, T.M., 1993. Isolation of an inhibitor selective for collagen stimulated platelet aggregation from the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 268, 5445–5449.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes

Verónica Díaz-Martín^a, Raúl Manzano-Román^a, Luz Valero^b, Ana Oleaga^a, Antonio Encinas-Grandes^c, Ricardo Pérez-Sánchez^{a,*}

^aParasitología, IRNASA (CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

^bSección de Proteómica, Universidad de Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^cArea de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Accepted 15 January 2013

Available online 4 February 2013

Keywords:

Ornithodoros moubata

Saliva

Protein equalization

Proteome

Sialome

LC-MS/MS

ABSTRACT

Tick saliva contains pharmacologically active molecules that allow these parasites to obtain a blood meal from the host and facilitate host infection by tick-borne pathogens. Recent transcriptomic and proteomic analyses of the salivary glands of several tick species have provided data sets that are invaluable for a better understanding of tick sialomes and tick-host-pathogen relationships. Here we performed a proteomic study of the saliva from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. Saliva samples from female and male specimens were analyzed separately by LC-MS/MS before and after their equalization to facilitate the identification of the less abundant proteins. We report the array of 193 proteins identified in the saliva of *O. moubata* showing: (i) the broad and complex composition of the saliva of this tick, in good agreement with the complexity of the argasid and ixodid sialomes described previously; (ii) a notable difference in the saliva proteomes of females and males, since only 10 of the proteins identified appeared to be shared by both sexes; and (iii) the presence in the salivary fluid of a wide range of proteins known to be housekeeping/intracellular, which could be secreted in unconventional ways, including exosome secretion.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks are hematophagous ectoparasites of terrestrial vertebrates of great medical and veterinary importance, mainly because they are vectors of diseases affecting humans, livestock and companion animals. Moreover, tick feeding can cause direct damage to their hosts such as significant blood loss as well as paralysis, toxicosis, irritation and allergy [1]. Tick saliva is known to contain anti-hemostatic, anti-inflammatory and immunomodulatory molecules that modify the physiology of their hosts at the tick bite site, allowing these parasites to obtain

a blood meal from the host [2–4]. In addition to their role in feeding and other functions related to ion- and water-handling, tick saliva may potentiate the transmission and establishment of tick-borne pathogens, and therefore immune responses to tick saliva can confer protection against pathogen transmission [4–6]. Accordingly, the identification and characterization of tick salivary proteins may lead to the discovery of novel pharmacological agents and antigen targets for the development of vaccines against ticks and/or tick-borne diseases [4,7].

Recently, salivary gland transcriptomic and proteomic analyses of several hard and soft ticks have been performed,

* Corresponding author at: Unidad de Patología Animal, IRNASA, CSIC., Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923219606; fax: +34 923219609.

E-mail address: ricardo.perez@irnasas.csic.es (R. Pérez-Sánchez).

providing data sets that are invaluable for a better understanding of tick sialomes and the immunobiology at the tick–host–pathogen interface [2,8,9]. These sialomes show that the repertoire of tick salivary gland transcripts and proteins is much more broad and complex than anticipated, containing hundreds to thousands of different proteins, many of which are novel, since they have no similarities to other proteins in the databases. The authors of those studies classified the salivary transcripts and proteins they found as putative secreted or possible housekeeping groups, and then into different groups according to their known or predicted biological function. Most such putative secreted proteins have unknown functions but, if secreted into their hosts, they probably have antihemostatic, anti-inflammatory, immunomodulatory, or even antiangiogenic or antimicrobial activity [9]. Regarding the probable housekeeping proteins identified, the authors of these studies do not comment further on them but suggest that their sequences may help to identify novel secreted protein families if identified in proteome experiments [2].

The argasid tick *Ornithodoros moubata* is distributed throughout South and East Africa and Madagascar, where it colonizes wild and domestic habitats and feeds mainly on warthogs, but also on domestic swine and humans [10,11]. *O. moubata* transmits important human and animal diseases such as East African tick-borne relapsing fever [12] and African swine fever [13,14], whose control and prevention would largely benefit from the elimination of *O. moubata* from at least synanthropic environments (human dwellings and pigsties).

Previous attempts to develop anti-*O. moubata* vaccines using tick salivary antigens have provided encouraging results [15,16], but an effective vaccine is currently still lacking. It is to be expected that a better knowledge of *O. moubata* salivary proteins engaging at the tick–host–pathogen interface will result in the identification of novel antigenic targets for new and more effective vaccine developments. To this end, the first approach to the sialome of *O. moubata* consisted of the proteomic analysis of its salivary gland extract (SGE) by 2-D electrophoresis and a 2-D Western blot followed by matrix-assisted laser desorption/ionization with tandem mass spectrometry (MALDI-MS/MS) of the most abundant and antigenic spots. This resulted in the identification of only two proteins, moubatin and up to 17 isoforms of TSGP1, showing further that TSGP1 was hyperabundant in SGE [17]. Later, a similar study was performed on equalized SGE, which allowed the identification of some additional low-abundance proteins [18].

In order to expand our knowledge of the actual secreted proteins from the sialome of *O. moubata*, we carried out a proteomic study of the saliva of this tick instead of its SGE. Saliva samples from female and male specimens were analyzed separately, since previous evidence obtained by us suggested that their protein repertoires could differ between the sexes (unpublished data). In addition, the saliva samples were analyzed before and after equalization in order to facilitate the identification of the least abundant proteins. Here we report the array of proteins identified in the saliva of *O. moubata* adults showing: (i) a notable difference in the protein composition of the saliva between the sexes; and (ii) the presence in the salivary fluid of a wide range of proteins previously predicted to be housekeeping/intracellular.

These findings expand our knowledge of soft tick sialomes and may help in the identification of proteins that are secreted to saliva by non-classical ways and might play non-described functions at the tick–host interface, raising new questions about the biology of soft tick saliva and soft tick–host relationships.

2. Material and methods

2.1. Ticks

The *O. moubata* ticks used in this work came from a colony maintained in our laboratory, which was established in the mid 1990s from specimens submitted from the Institute for Animal Health, Pirbright, Surrey, UK. The ticks are fed regularly on rabbits and kept at 28 °C, 85% relative humidity and 16 h light/8 h darkness.

All animal manipulations were done according to the rules from the Ethical and Animal Welfare Committee from the Institution where the experiments were conducted (IRNASA, CSIC), following the corresponding EU rules and regulations.

2.2. Saliva collection

Saliva samples were obtained separately from female and male ticks that had been reared in similar conditions: all of them were of the same age and had been fed two times on the same rabbit hosts, and at the moment of saliva collection they had been starved for four months. For the sake of ease of handling, the ticks were processed in batches of five ticks per batch. Saliva collection was performed as previously described [19,20], with some modifications. First, the ticks were washed three times in warm water and dried on a paper towel. Then, they were held with their dorsum adhered by double sided sticky tape on a glass slide, and 1 µl of a 1% solution of pilocarpine hydrochloride (Sigma) in phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) was injected into the tick genital pore with a 5 µl Hamilton syringe. Shortly after stimulation, small droplets of clear viscous saliva started to be secreted, which were immediately harvested from the tick mouthparts using a micropipette, and deposited on 200 µl of ice-cooled PBS. Saliva was collected continually from the five ticks in the batch until perceptible emission stopped, some 30–40 min after stimulation. Possible contamination from external sources was prevented by the investigators using sterilized material and wearing gloves and head caps. Each batch of saliva was then filtered through a 0.22-µm pore filter (Costar-Corning Inc.), its protein concentration measured in a NanoDrop 2000 spectrophotometer, and stored at –20 °C until further use. The protein concentration of several successive saliva batches prepared was similar and was found to be, on average, 1.14 µg/µl for females (44 µg of salivary protein per tick), and 0.77 µg/µl for males (31 µg of salivary protein per tick). Reproducibility among saliva batches was assessed by standard SDS-PAGE of some batches selected randomly from each sex and found to be similar within the same sex but different between sexes (Results section; Fig. 1A). To check reproducibility among the different protocols of the induction of salivation, three additional batches of ticks of every sex were induced to

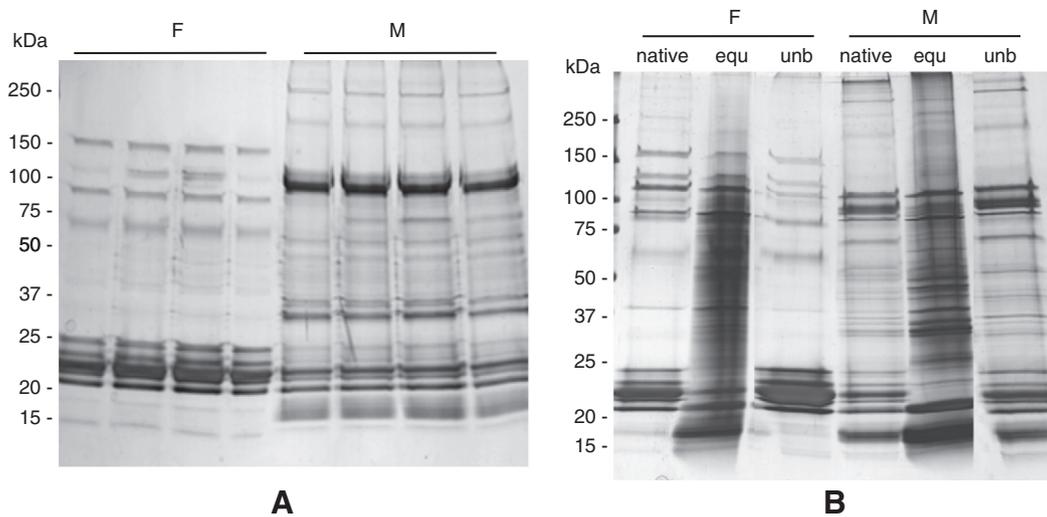


Fig. 1 – Silver stained 5–20% SDS-PAGE showing saliva from female (F) and male (M) *O. moubata* ticks. (A) Pilocarpine-induced saliva from four randomly selected batches of each sex. (B) Pooled saliva from female and male ticks before (native) and after equalization (equ); protein fraction that did not bind to the ProteoMiner® columns (unb).

salivate by injecting the ticks with 10 μ l of a 0.2% solution of dopamine (Sigma) in PBS [21] into the tick genital pore. The secreted saliva was collected and analyzed as described before. The protein concentration of these saliva samples was found to be on average 0.33 μ g/ μ l for females (9.9 μ g of salivary protein per tick), and 0.25 μ g/ μ l for males (7.5 μ g of salivary protein per tick), and their composition was found to be similar to that of the pilocarpine-induced samples. Accordingly, owing to the higher protein yield of the pilocarpine-based protocol, this protocol was the one applied in ensuing experiments in order to obtain up to 3 mg of saliva protein from each sex. Then, the saliva samples collected were pooled by sex, and an aliquot of each pool was removed and stored at -20 °C (native saliva). The remainder of both pools was subjected to protein equalization.

2.3. Protein equalization of the saliva samples

Before equalization, both saliva pools were lyophilized and re-suspended in water (in 1/10 of the initial volume) in order to concentrate them. Following this, they were dialyzed in PBS using the 3.5 K Slade-A-Lyzer Mini kit (Pierce) for 2 h at room temperature (with one buffer change at 60 min). The saliva samples (3 mg of protein/sample) were then equalized using the ProteoMiner small capacity kit (BIO-RAD) following the instructions provided by the supplier. Both the unbound proteins (unbound) and the proteins retained and later eluted from the column (equalized) were collected and their protein concentrations measured in a NanoDrop 2000 spectrophotometer. Samples of native saliva, equalized saliva, and unbound salivary proteins from both sexes were analyzed by standard SDS-PAGE in silver-stained 5–20% gradient gels.

2.4. Trypsin digestion, liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)

Samples of native and equalized saliva from both female and male *O. moubata* ticks were subjected to proteomic analysis by

trypsin digestion in solution followed by LC–MS/MS of the tryptic peptides.

For trypsin digestion in solution, saliva samples containing 10 μ g of protein were precipitated overnight at 4 °C in 10% trichloroacetic acid (TCA). The pellets were washed with 20% acetone at -20 °C and dissolved in 20 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 containing 50% trifluoroethanol (TFE). Then, they were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 60 °C, and alkylated with 55 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. Following this, proteins were digested overnight at 37 °C with 2.5 ng/ μ l of sequencing grade trypsin (Promega) in a total volume of 200 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 and 5% TFE. The reaction was stopped with 20 μ l of 10% trifluoroacetic acid (TFA) and the supernatants were filtered through a 0.22 μ m filter and dried by centrifugation in vacuum.

LC–MS/MS was performed as described before [22]. Briefly, the resulting peptides from the above-mentioned digestions were resuspended in 6 μ l of 5% acetonitrile, 0.1% TFA and 5 μ l of the sample was loaded onto a trap column (PepMap C18, 300 μ m \times 5 mm, LC Packings) and desalted with 0.1% TFA at a flow rate of 30 μ l/min for 3 min. The peptides were then loaded onto an analytical column (PepMap C18 3 μ m 100 Å, 75 μ m \times 15 cm, LC Packings) equilibrated in 5% acetonitrile and 0.1% formic acid. Elution was carried out with a linear 5–40% gradient of solvent B (95% acetonitrile, 0.1% formic acid) for 120 min at a flow rate of 300 μ l/min. The peptides eluted were analyzed with a nanoESI-Q-TOF mass spectrometer (QSTAR-XL, AB Sciex) in an information-dependent acquisition mode (IDA), in which a 1-s TOF MS scan from 400 to 1800 m/z was performed, followed by 3-s product ion scans from 65 to 1800 m/z on the three most intense doubly- or triply-charged ions.

2.5. Database searching and protein identification

Database searching and protein identification were performed as described before [22]. Protein Pilot v2.0 (Applied Biosystems)

was used to search FASTA protein databases and Mascot v2.2 (Matrix Science) was used to mine EST databases.

Protein Pilot default parameters were used to generate peak lists directly from QSTAR wiff files of saliva samples. The Paragon algorithm of Protein Pilot was used to search the NCBIInr protein database with the following parameters: trypsin specificity, cys-alkylation and restricted taxonomy to metazoans. To avoid using the same spectral evidence in more than one protein, the proteins identified were grouped based on MS/MS spectra by the Protein-Pilot Progroup algorithm. Thus, proteins sharing MS/MS spectra were grouped, regardless of the peptide sequence assigned. The protein within each group able to explain more spectral data with confidence was designated as the primary protein of the group. Only the proteins of the group for which there was individual evidence (unique peptides with enough confidence) were also listed. Only primary proteins are shown in the results. A Protein Pilot unused score above 1.3, which is equivalent to a protein confidence threshold greater than 95%, was considered significant. Under these conditions the calculated false discovery rate (FDR) using a reverse decoy database was under 1%.

For Mascot searches, the peak lists were generated directly from QSTAR wiff files by Mascot Daemon v 2.2.2 (Matrix Science) with Sciex Analyst import filter options, using the default parameters. The EST_acari (2378274 sequences; 545902716 residues) database was searched using the following parameters: tryptic specificity, allowing two missed cleavages and a tolerance on the mass measurement of 80 ppm in MS mode and 0.5 Da for MS/MS ions. The carbamidomethylation of Cys was set as a fixed modification, and Met oxidation and Asn/Gln deamidation were set as variable modifications. The significant threshold was set to 0.02 to keep the FDR, calculated by Mascot using a decoy database, below 5%. Only proteins for which there were two or more red bold matches were selected and shown in the results.

The relative abundance of a protein in the sample was quantified using the protein abundance index (PAI), which is defined as the number of observed peptides in the experiment divided by the number of observable tryptic peptides for each protein within a given mass range of the mass spectrometer employed [23]. PAI was modified exponentially to give emPAI, the exponential form of PAI minus one, which is directly proportional to the protein content in a sample [24,25]. The protein content in a particular sample was calculated as a percentage by dividing the emPAI value of a protein by the sum of all emPAI values in that sample multiplied by 100.

2.6. Bioinformatics, functional annotation and classification of the proteins

For functional annotation of the proteins, blast tools were used to compare the protein sequences to the NR protein database of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), the GO (<http://amigo.geneontology.org>) and the UniProtKB databases (<http://www.uniprot.org>), and to search for conserved protein domains in the Pfam, SMART, Kog, and conserved domains (CDD) databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). In addition, the following predictions were also

performed: presence of signal peptide using SignalP 3.0 [26] at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; non-classical protein secretion using SecretomeP 2.0 [27] at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>; presence of transmembrane helices using the TMHMM Server v. 2.0 at <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>; and presence of glycosyl-phosphatidyl anchor sites using the big-PI Predictor [28] at <http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpiserver.html>. Functional annotation of the proteins identified was based on all the above comparisons and on the previously published tick sialomes [2,8,9,29,30], which served as models for the classification of proteins as either secretory or intracellular/housekeeping, with further subdivisions based on function and/or protein families. Identified proteins with unknown ontology were annotated as “unknown function”.

2.7. Protein identification using 1-D gel electrophoresis and LC-MS/MS

Native saliva samples of both sexes were electrophoresed in 5–20% gradient polyacrylamide gels and stained with Sypro Ruby (SIGMA) according to the manufacturer's instructions. Sypro Ruby-stained gels were digitalized with the ChemiDoc system (Bio-Rad) and gel images were analyzed with Image Lab software (Bio-Rad), including the assessment of the relative abundance of the bands detected. After that, the stained gel bands (approximately 13 in females and 16 in males; see Results section; Fig. 4), were excised and submitted to the Proteomic Service of the Universidad de Valencia (Spain).

There, they were subjected to trypsin digestion and LC-MS/MS analysis for protein identification. Briefly, gel slices were conditioned with 50% acetonitrile, dried and digested with trypsin (20 ng/μl in 25 mM NH₄HCO₃) overnight at 37 °C. The reactions were stopped with 10% trifluoroacetic acid (TFA) to a final concentration of 0.1%, and the supernatants were filtered through a 0.22 μm filter and dried by centrifugation in vacuum. The resulting peptides were resuspended in 6 μl of 5% acetonitrile, 0.1% TFA and 5 μl of the sample was loaded onto a trap column (NanoLC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm × 15 cm, Eksigen) and desalted with 0.1% TFA at a flow rate of 2 μl/min for 10 min. The peptides were then loaded onto an analytical column (NanoLC Column, 3 μm C18-CL, 75 μm × 25 cm, Eksigen) for 10 min at 3 μl/min. Elution was carried out with a linear 5–40% gradient of solvent B (95% acetonitrile, 0.1% formic acid) for 30 min at 300 nl/min, and the peptides eluted were analyzed with a nanoESI-Q-TOF mass spectrometer (5600 TripleTOF, AB Sciex) in an information-dependent acquisition mode (IDA). The 50 most intense precursors in each TOF MS scan were selected for fragmentation. Combined MS and MS/MS spectra were searched against the NCBIInr_metazoa and EST_acari databases using the Mascot v 2.3.02 algorithm with the following parameters: tryptic specificity, allowing two missed cleavages and a tolerance on the mass measurement of 50 ppm in MS mode and 0.5 Da for MS/MS ions. The carbamidomethylation of Cys was set as a fixed modification, and Met oxidation and Asn/Gln deamidation were set as variable modifications. The significant threshold was set to 0.05 and only proteins for which there were one or more red bold matches were selected and shown in the results.

2.8. Comparative immune-detection of the actin and enolase proteins in the saliva from female and male *O. moubata* ticks by Western blot

For the immune-detection of the actin and enolase proteins in *O. moubata* female and male saliva, the corresponding polyclonal sera against the *O. moubata* recombinant actin and enolase proteins were obtained from rabbits [31].

Briefly, the whole actin and enolase cDNA coding sequences were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using two sets of specific primers designed ad hoc on the respective nucleotide sequences retrieved from the GenBank: Actin (GenBank ID: AB208021.1), Enolase (GenBank ID: GU594041.1). The PCR products were purified, cloned in the pSC-A sequencing vector (Stratagene) and then subcloned in the pQE-30 expression vector (Qiagen). Recombinant protein expression was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and the recombinant proteins were purified using nickel-affinity columns. All the above-mentioned experiments were performed following standard procedures [11].

The purified recombinant proteins were inoculated emulsified with Freund's adjuvant into New Zealand white rabbits, as described elsewhere [32]. Each animal received three doses of 200 μ g/dose of the corresponding recombinant protein administered at two inoculation points at 15-day intervals. Rabbits were bled immediately before the administration of the first dose and at seven days after the third dose. Blood samples were allowed to clot and sera were removed and stored at -80°C . IgG antibody levels against the recombinant proteins were titrated by ELISA in two-fold dilution serum series according to standard procedures [16], and were found to be higher than 1/12,800.

For Western blots, 15 μ g samples of female and male native saliva and 1 μ g samples of the corresponding recombinant proteins were resolved by SDS-PAGE in 5–20% gradient gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes at 400 mA for 90 min. Blots were blocked with 1% BSA in PBS and then rinsed with PBS containing 0.05% Tween 20. Following this, the sheets were incubated with either the corresponding anti-recombinant rabbit polyclonal serum or with a pool of the sera from two pigs sensitized by natural infestations (both at 1/100 dilution). These latter sera were obtained in earlier studies and had been preserved at -80°C [33]. After three new washes, the blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-rabbit IgG or HRP-anti-pig IgG (both from Sigma) at 1/2000 dilution and washed again three times. Incubations were performed at 37°C for 1 h, and the washes were carried out at room temperature over 10 min for each wash. Finally, the recognized bands were developed with 4-Cl-1-naphthol. Pre-immune rabbit and pig sera were reacted in parallel as negative controls (not shown).

3. Results

3.1. SDS-PAGE of native and equalized saliva from female and male *O. moubata* ticks

The protein band patterns of several batches of native saliva from both sexes were very similar within each sex and noticeably

different between the sexes (Fig. 1A). Some 20 bands were found in female saliva, with molecular weights ranging between 150 and 15 kDa. The bands from 25 to 20 kDa were by far the most intense. By contrast, in the saliva from males up to 36 bands were observed, with molecular weights ranging from more than 250 to 15 kDa. Among them, the most intense bands were seen at around 100, 37 and 25–20 kDa.

Equalization increased the number and intensity of perceptible bands in the saliva of both sexes, resulting in more complex band patterns, which at first sight looked quite similar to each other (Fig. 1B). However, closer inspection revealed that there were still significant differences between them.

3.2. Number of proteins identified by LC-MS/MS in native and equalized saliva samples

Overall, for the four types of saliva samples analyzed Mascot searching of the EST_acari database retrieved 278 protein hits, 187 of which could be identified. The remaining 91 protein hits (33%) could not be identified because they did not match any known sequence in the blast analysis. Protein pilot searching of the protein NCBI nr database retrieved 154 supplementary identifications. Thus, global database searching resulted in 341 protein identifications. After removal of the redundant identifications in each sample, a final count of 203 identified proteins was obtained.

For each saliva sample, the number of protein hits, the number of identified proteins, and the number of non-redundant identifications are indicated in Table 1. The proteins identified simultaneously in native and equalized saliva of the same sex (three in females, 11 in males) were counted only once and annotated to the native samples. Thus, the proteins annotated to the corresponding equalized samples were always additional identifications. As a result, we identified 118 proteins in female saliva (69.5% of them only after equalization), and 85 proteins in male saliva (40% of them only after equalization). Accordingly, equalization increased the number of protein identifications by 228% in females and 67% in males.

A total of 193 different proteins were identified in the saliva of *O. moubata* adults, with only 10 proteins present simultaneously in both sexes.

3.3. Description and classification of the proteins identified in the saliva of *O. moubata*

The proteins identified were classified as putative secreted or possible intracellular/housekeeping proteins, and were then divided into groups according to their molecular function or family (Tables 2 and 3), in a similar way as was done for the above-referred tick sialomes (Section 2.6). As a result, some 25% of the identified proteins were classified as secreted, while the remaining ones (approximately 75%) were classified as housekeeping/intracellular (Fig. 2). Subsequent analysis with SecretomeP predicted that at least one-third of these possible housekeeping/intracellular proteins could have been secreted unconventionally (Tables 2 and 3). For the remaining two-thirds, the bioinformatics tools used did not predict any secretion method, despite the fact that they all were found in a secreted fluid.

Table 1 – Number of protein hits and protein identifications in the saliva of *Ornithodoros moubata*.

Database (algorithm)		Female saliva		Male saliva		Both sexes
		Native	Equalized	Native	Equalized	Total
EST_acari (Mascot)	Total protein hits	65	81	77	55	278
	Unidentified protein hits (%)	37 (57%)	26 (33%)	18 (23%)	10 (18%)	91 (33%)
	Identified proteins	28	55	59	45	187
NCBIInr_metazoa (P. Pilot)	Identified proteins	17	52	45	40	154
EST-acari+NCBIInr_metazoa	Total identified proteins	45	107	104	85	341
	Non-redundant in each sample	36	82	51	34	203
	Non-redundant by each sex	118		85		–
	Total non-redundant	–		–		193

Regarding protein function, among the putative secreted proteins, the most numerous in both sexes had unknown ontologies and were annotated as “unknown function”. The remaining proteins were distributed in six functional groups; these groups were the same in each sex and contained similar numbers of proteins, enzymes (24%–30%) and the lipocalins (10%–12%) being the most numerous, followed by the immunity-related, glycine-rich, mucins and protease inhibitors (Fig. 2).

Among the putative intracellular/housekeeping proteins, the most numerous in both sexes were also the annotated as “unknown function”. The others were distributed in 11–12 groups, which were the same in both sexes except for the nuclear export machinery group, which was only found in males. The proteins involved in signal transduction (15%), nuclear regulation (14%), protein synthesis (11%) and transporters (11%) were the most numerous in females, while those involved in protein synthesis (16%), metabolism (13%), energy metabolism (9%) and signal transduction (8%) were the most numerous in males. Cytoskeletal proteins were the next most numerous proteins in both female and male saliva (5.4% and 5%, respectively), actin being the only cytoskeletal protein shared by both sexes. The remaining groups, six in females and seven in males, respectively represented 25% and 22% of the putative housekeeping proteins identified (Fig. 2), and contained only one protein shared by both sexes (the RNA-binding protein musashi; Tables 2 and 3).

Additionally, 3 proteins from host blood were also found in the *O. moubata* saliva: serum albumin in females, and hemoglobin alpha and beta chains in males, which are classified as “host origin proteins” in Tables 2 and 3, although they are not included in Fig. 2. Since tick saliva is known to contain ingested host proteins, including albumin and immunoglobulins [34,35] the finding of these proteins was not unexpected, although they were not considered further in the current study.

3.4. Relative quantification of the proteins identified in the saliva of *O. moubata*

The exponentially modified protein abundance index (emPAI) and % emPAI values obtained for some of the proteins identified in the native saliva samples (Tables 2 and 3) provided information about their relative amounts in this secretion [24,25]. According to these emPAI values, the most

abundant proteins in female saliva were by far the lipocalins, which represented the 100% of the emPAIs computed (Table 2, Fig. 3). By contrast, in the male saliva the most abundant proteins were the group of enzymes involved in energy metabolism, followed by lipocalins, which totaled 55.55% and 30.5%, respectively, of the emPAI values computed (Table 3 and Fig. 3). The proteins in the native saliva samples without an emPAI value and the proteins that were only identified in the equalized samples (with or without emPAI value) were assumed to be low or very low in abundance (Tables 2 and 3).

The % emPAI-based relative quantification paralleled the results of the quantification carried out on Sypro Ruby-stained 1-D polyacrylamide gels (Fig. 4). After the analysis of the relative abundance of the Sypro Ruby-stained bands, the proteins present in these bands were identified by LC-MS/MS analysis (Supplementary Table 1), depicted in Fig. 4 and noted down in Tables 2 and 3. As can be observed in Fig. 4, bands containing lipocalins represented up to 93.1% of the protein mass in the female saliva, while in male saliva the most abundant bands were those containing the enzymes involved in energy metabolism (more than 51.6%), followed by the bands corresponding to lipocalins (31.5%).

3.5. Detection of the actin and enolase proteins in *O. moubata* saliva by Western blot

This experiment was carried out to confirm, in a different way, the results of proteomics regarding the presence of actin in the saliva of both sexes and the presence of enolase in males only. As shown in Fig. 5A, recombinant actin and the native actin in female and male saliva were all recognized by the anti-recombinant actin hyperimmune rabbit serum. The slightly larger size of the recombinant actin can be attributed to the histidine tag from the pQE-30 expression vector. By contrast, Fig. 5B shows that the anti-*O. moubata* sera obtained from pigs sensitized by natural contact did not recognize either the recombinant actin or the actin band in the saliva lanes, while they did recognize the natural immunogenic proteins. Fig. 5B also shows notable differences in antigenic band patterns between sexes, reinforcing the earlier evidence of their different saliva composition. Thus, these results confirmed the real presence of actin in the saliva of both sexes and suggest that native actin is not immunogenic through natural contact.

Table 2 – Proteins identified in native and equalized saliva from female *Ornithodoros moubata* ticks by LC–MS/MS. Proteins were classified as either secretory or housekeeping and further in groups based on function and/or protein families. Numbers in brackets indicate the number of non-redundant identifications inside each category/group. Inside groups, proteins are in the order of decreasing score. Scores without decimals correspond to MASCOT-derived identifications; scores with decimals belong to Protein Pilot-derived identifications. PN, number of unique matched peptides. emPAI, exponentially modified protein abundance index. % emPAI (percentage of exponentially modified protein abundance index), was calculated by dividing the emPAI value of a protein by the sum of all emPAI values multiplied by 100. MW, molecular weight (kDa) as predicted by the Uniprot web server (www.uniprot.org). SignalP, presence of classical secretion signal. SecretomeP, prediction of non-classical protein secretion. TMH, number of predicted transmembrane helices. GPI*, potential site for GPI-anchor. Underlined names indicate proteins that were identified only in equalized saliva; proteins marked with asterisk (*) were identified in both sexes.

Protein name	Database ID no.	Species	Score	PN	emPAI	% emPAI	MW	SignalP	SecretomeP	TMH/ GPI	Match to 1D-PAGE LC-MS/MS (Fig. 4)
<u>Putative secreted proteins (25)</u>											
Serine proteases (3)											
Factor D-like protein (serine proteinase)	AAO12856.1	<i>Dermacentor andersoni</i>	89	3	–	–	40.9	Yes			
Serine proteinase, putative	XP_002409528.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	–	–	26.4			1 TMH	
Urokinase-type plasminogen activator	XP_001848040.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1.4	1	–	–	28.1	Yes	Yes		
<u>Lipocalins (3)</u>											
TSGP1*	ADK94457.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	537	79	3.66	89.92	21.7	Yes	Yes		Yes
TSGP4	AAAT76831.1	<i>Ornithodoros savignyi</i>	52	3	0.18	4.42	19.3	Yes	Yes		Yes
Moubatin*	AAA29432.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	13.66	13	0.23	5.65	18.8	Yes	Yes		Yes
<u>Protease inhibitors (2)</u>											
Thyrotropin precursor (cistatin)	AAO1022.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	172	12	–	–	7.9	Yes		1 TMH	Yes
Collagen alpha-3(VI) chain precursor (contains 1BPTI/Kunitz inhibitor domain)	NP_990865.1	<i>Gallus gallus</i>	1.35	1	–	–	13.9	Yes			
Glycine rich superfamily (2)											
Glycine rich secreted salivary gland protein	AAIT75325.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	2	–	–	31.7	Yes	Yes		
Cement protein	DAA34732.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	51	3	–	–	39.9	Yes	Yes		
<u>Mucins (2)</u>											
Proteophosphoglycan, putative	XP_002399267.1	<i>Ixodes scapularis</i>	56	3	–	–	21.9		Yes		
Mucin-7, putative	XP_002406133.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	3	–	–	23.6		Yes		
<u>Nucleotidases (2)</u>											
5'-Nucleotidase/apyrase	ABS30897.1	<i>Ornithodoros savignyi</i>	4.33	2	–	–	65.1	Yes			Yes
5'-Nucleotidase III (subfamily IE hydrolase)	XP_311397.4	<i>Anopheles gambiae</i>	2	1	–	–	34.4				
<u>Immunity related (2)</u>											
Alpha-2-macroglobulin precursor*	AAAI0129.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	50.37	21	–	–	165.1	Yes	Yes	1 TMH	Yes
Lectin 1 putative immunolectin (C-type lectin)	AAV91436.1	<i>Lonomia obliqua</i>	2	1	–	–	60.3				
<u>Phosphatases (1)</u>											
Lysosomal acid phosphatase*	XP_002410320.1	<i>Ixodes scapularis</i>	126	6	–	–	42.3	Yes	Yes		
<u>Secreted conserved proteins (unknown function) (8)</u>											
Hypothetical protein	XP_002399190.1	<i>Ixodes scapularis</i>	67	7	–	–	13.9	Yes			
Secreted PAPA repeat protein	DAA34610.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	65	3	–	–	25.8	Yes	Yes	1 TMH	
Hypothetical secreted protein 108	DAA34554.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	64	2	–	–	15.2	Yes	Yes	GPI ¹²¹	
Secreted salivary gland peptide	XP_002406260.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	2	–	–	25.0				2 TMH
Secreted protein, putative	XP_002408924.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	2	–	–	7.5				
Secreted protein, putative	XP_002399632.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	3	–	–	20.6	Yes	Yes		
Secreted protein, putative	XP_002402709.1	<i>Ixodes scapularis</i>	52	2	–	–	38.3		Yes		
F-box/LRR-repeat protein, putative	XP_002403227.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	–	–	45.3		Yes		

Table 2 (continued)

Protein name	Database ID no.	Species	Score	PN	emPAI	% emPAI	MW	SignalP	SecretomeP	TMH/ GPI	Match to 1D-PAGE LC-MS/MS (Fig. 4)
Sec14p-like lipid-binding domain containing protein	XP_002404368.1	<i>Ixodes scapularis</i>	48	2	–	–	80.58				
Bestrophin-4	ABG02138.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.57	1	–	–	64.06			5 TMH	
2-Oxoglutarate/malate carrier protein-like	XP_002610854.1	<i>Branchiostoma floridae</i>	1.32	1	–	–	34.32			1 TMH	
Protein canopy homolog 1 precursor	NP_001088889.1	<i>Xenopus laevis</i>	1.32	1	–	–	20.71	Yes			
Cytoskeletal proteins (5)											
Actin *	BAE46505.1	<i>Ornithodoros moukata</i>	87	6	–	–	41.84				Yes
Paramyosin, putative	XP_002407400.1	<i>Ixodes scapularis</i>	63	3	–	–	56.83				
Microtubule-actin cross-linking factor 1-like	XP_003454660.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	60	2	–	–	855.23				
Septin-1-like	XP_003493686.1	<i>Bombus impatiens</i>	59	3	–	–	41.09				
Dynein heavy chain, isoform C	NP_001163759.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.4	1	–	–	580.46				Yes
Detoxification (5)											
Alcohol dehydrogenase, short chain	XP_002406421.1	<i>Ixodes scapularis</i>	71	5	–	–	25.76				
Cytochrome P450	XP_002434947.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	2	–	–	60.22			2 TMH	
Monooxygenase	XP_002412032.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	3	–	–	65.82	Yes			
Sulfotransferase, putative	XP_002412156.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	2	–	–	31.23				
Proteasome machinery (5)	EAT45862.1	<i>Aedes aegypti</i>	2	1	–	–	37.61				
Goliath E3 ubiquitin ligase-like	XP_966546.1	<i>Tribolium castaneum</i>	56	3	–	–	52.08	Yes		1 TMH	
Ubiquitin protein ligase	XP_002414996.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	5	–	–	19.72	Yes			
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	XP_002636074.1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	2	1	–	–	46.20	Yes			
F-box and WD domain protein	XP_002406691.1	<i>Ixodes scapularis</i>	1.6	1	–	–	58.09				
E3 ubiquitin-protein ligase hyd	NP_524296.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.43	1	–	–	318.88	Yes			
Transcription machinery (4)											
Conserved hypothetical protein	XP_002407059.1	<i>Ixodes scapularis</i>	61	4	–	–	28.36				
PR domain zinc finger protein 2-like	XP_002925632.1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	1.91	1	–	–	186.30				
Flav-like family member 6-like	XP_002919757.1	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	1.7	1	–	–	49.89				
Chromodomain helicase-DNA-binding protein 3	XP_001846200.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1.52	1	–	–	223.88				

Regarding enolase, Fig. 6A shows that the anti-recombinant enolase hyperimmune rabbit serum recognized the recombinant enolase and a band of native enolase in male saliva, but not in female saliva. As was the case for actin, the histidine tag accounted for the slightly larger size of the recombinant enolase vs. native enolase. Fig. 6B, shows that the anti-*O. moubata* sera obtained from pigs sensitized by natural contact did not recognize either the recombinant enolase or the native enolase in the male saliva, whereas they recognized the same immunogenic proteins as shown in Fig. 5B. These results therefore suggest that native enolase is not immunogenic through natural contact and confirm the presence of native enolase in the saliva of males only.

4. Discussion

Owing to the importance of tick saliva in blood feeding, host immunity and pathogen transmission, our aim in this work was to identify the proteins that *O. moubata* secretes to this fluid and consequently inoculates into the host during feeding. To accomplish this goal, we carried out a proteomic study of the tick saliva instead of its SGE. In this way we could be certain that all the proteins identified were actually secreted and were not housekeeping/intracellular proteins released by the broken salivary gland cells, as may be the case of a fraction of the proteins present in the SGE.

Accordingly, pilocarpine- and dopamine-induced saliva was collected from tick mouthparts, carefully avoiding its contamination. The saliva from females and males was collected separately because prior observations had suggested that the protein composition of *O. moubata* saliva might differ between the sexes (unpublished data). Comparative analysis by SDS-PAGE of several pilocarpine- and dopamine-induced saliva batches demonstrated reproducibility between both protocols used to induce tick salivation and reproducibility among saliva batches from the same sex, confirming the difference in salivary composition between sexes (Fig. 1A).

Hence, we managed to collect up to 3 mg of saliva protein from each sex and equalized both samples in order to facilitate the identification of the low-abundance proteins. The need for saliva equalization was assumed on the basis of our previous experience with SGE, in which we observed that the hyperabundant TSGP1 lipocalin was hindering the detection of the poorly represented proteins [17,18]. As was the case for SGE, the TSGP1 lipocalin was the most abundant protein in the non-equalized saliva of females, and second to GAPDH in the non-equalized saliva of males. Accordingly, it was not surprising that when equalization had removed the “excess” of TSGP1 and other proteins from saliva the number of identified proteins increased significantly, particularly in females, where the ratio of new identifications (69.2%) was almost double that of males (38%) (Fig. 1B; Table 1).

The identification of 193 different proteins in the tick saliva was indicative of a broad and complex *O. moubata* saliva composition, in good agreement with the complexity of the argasid and ixodid sialomes described previously [2,8,9,29,30,36]. However, when we looked at the identity of those proteins several issues arose that could be considered controversial.

First, we anticipated identifying the *O. moubata* salivary proteins previously described and uploaded in the databases, including some well known antihemostatic and anti-inflammatory agents such as ornithodorin, TAP and OMCI [37–39]. Thus, the failure to detect these proteins is difficult to explain. Although these proteins are assumed to be present in saliva at physiologically relevant concentrations, it may also be assumed that their identification in the native saliva samples might have been hindered by the overwhelming abundance of proteins such as TSGP1. Regarding the equalized samples, since the equalization process requires large amounts of starting sample (10 mg according to the ProteoMiner manufacturer), working with 3 mg of saliva would not have favored the identification of all the expected proteins. Furthermore, some proteins could have been lost along the sample lyophilization and dialysis steps performed before equalization. Additionally, it could be also hypothesized that since saliva was collected at certain tick feeding time points, some of the known tick salivary proteins might not be present in a given saliva sample.

Second, among the proteins identified we obtained a very high ratio of housekeeping (77.5%) versus secreted (22.5%) proteins, in contrast to other soft-tick sialomes described, where secretory proteins represented more than 60% [29,30,36]. In our analysis, very few of the highly abundant secretory protein families in soft ticks were identified: i.e., no basic tail proteins, Kunitz-type protease inhibitors and metalloproteases; only those lipocalins for which sequences exist in the database. A possible reason for missing these proteins could be the high sequence diversity observed for many of the major secretory families in tick sialomes [2,8,9,29,30,38] and the small number of *O. moubata* proteins and ESTs in the databases (128 and 95, respectively), which would have resulted in a lack of specific target sequences for comparative purposes. The 33% of unidentified protein hits in Table 1 lend support to this idea. Hence, the low ratio of secreted vs. housekeeping proteins obtained here should be taken with caution.

In spite of the foregoing, it was not completely unexpected to find housekeeping/intracellular proteins in tick saliva [2,40,41]. It is increasingly recognized that some housekeeping/intracellular proteins can be secreted in unconventional ways to the extracellular milieu, where they play additional extracellular functions that are not always related to their intracellular functions [42]. Examples of such proteins in *O. moubata* saliva could be GAPDH and enolase. These proteins are well known cytoplasmic glycolytic enzymes but they have also been described as virulence-associated immunomodulatory and profibrinolytic agents in the extracellular milieu [43,44]. Thus, the presence in tick saliva of proteins formerly designated as intracellular could help to identify novel secreted protein families and functions in tick sialomes. In accordance with this, the SecretomeP analysis predicted unconventional secretion mechanisms for one-third of these housekeeping/intracellular proteins, helping to explain their presence in saliva. However, SecretomeP did not predict any unconventional secretion mechanism for the other two-thirds of housekeeping/intracellular proteins. Among this second group of proteins we found a wide range of proteins known to be secreted in exosomes, including

Table 3 – Proteins identified in native and equalized saliva from male *Ornithodoros moubata* ticks by LC-MS/MS. Proteins were classified as either secretory or housekeeping and further in groups based on function and/or protein families. Numbers in brackets indicate the number of non-redundant identifications inside each category/group. Inside groups, proteins are in the order of decreasing score. Scores without decimals correspond to MASCOT-derived identifications; scores with decimals belong to Protein Pilot-derived identifications. PN, number of unique matched peptides. emPAI, exponentially modified protein abundance index. % emPAI (percentage of exponentially modified protein abundance index), was calculated by dividing the emPAI value of a protein by the sum of all emPAI values multiplied by 100. MW, molecular weight (kDa) as predicted by the Uniprot web server (www.uniprot.org). SignalP, presence of classical secretion signal. SecretomeP, prediction of non-classical protein secretion. TMH, number of predicted transmembrane helices. GPIⁿ, potential site for GPI-anchor. Underlined names indicate proteins that were identified only in equalized saliva; proteins marked with asterisk (*) were identified in both sexes.

Protein name	Database ID no.	Species	Score	PN	emPAI	% emPAI	MW	SignalP	SecretomeP	TMH/ GPI	Match to 1D-PAGE LC-MS/MS (Fig. 4)	
<i>Putative secreted proteins (20)</i>												
Serine proteases (2)												
Trypsin-like serine protease	XP_002413603.1	<i>Ixodes scapularis</i>	51	3	–	–	26.58	Yes	Yes			
Cationic trypsinogen precursor	AAA30900.1	<i>Canis sp.</i>	1.92	1	–	–	26.17	Yes	Yes			
Other peptidases (2)												
Similar to ADAM metalloproteinase	XP_002168387.1	<i>Hydra magnipapillata</i>	2	1	–	–	58.10		Yes	2 TMH		
Angiotensin-converting enzyme	XP_001659916.1	<i>Aedes aegypti</i>	2	1	–	–	70.14		Yes			
Lipocalins (2)												
TSGP1 *	ADR94457.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	349	43	2.17	29.60	21.71	Yes	Yes		Yes	
Moubatin *	AAA29432.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	9.65	10	0.1	1.36	18.82	Yes	Yes		Yes	
Immunity related (2)												
Alpha-2-macroglobulin precursor *	AAN10129.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	61	2	–	–	165.07	Yes	Yes	1 TMH	Yes	
Hemolin, putative	XP_002407721.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	4	–	–	29.79		Yes			
Glycine rich superfamily (1)												
Structural constituent of cuticle, putative	XP_002410255.1	<i>Ixodes scapularis</i>	69	2	–	–	51.18	Yes	Yes			
Mucins (1)												
Mucin/peritrophin-like protein precursor	AAS01023.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	2	1	–	–	19.5	Yes	Yes		Yes	
Protease inhibitors (1)												
Similar to serine proteinase inhibitor	XP_002199473.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	1.35	1	–	–	43.44		Yes			
Hydrolases (1)												
<u>Epoxide hydrolase 1</u>	XP_001489035.1	<i>Equus caballus</i>	54	2	–	–	52.51	Yes	Yes			
Phosphatases (1)												
Lysosomal acid phosphatase *	XP_002410320.1	<i>Ixodes scapularis</i>	65	3	0.1	1.36	42.33	Yes	Yes		Yes	
Secreted conserved proteins (unknown function) (7)												
Unknown secreted protein DS-1	AAS94229.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	137	3	–	–	38.8	Yes	Yes			
Unknown secreted protein PK-26	AAS94230.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	137	3	–	–	39.0	Yes	Yes			
Conserved hypothetical protein	XP_002404867.1	<i>Ixodes scapularis</i>	91	2	0.11	1.50	18.83	Yes	Yes			
Fascilin domain-containing protein, putative	XP_002399918.1	<i>Ixodes scapularis</i>	59	2	–	–	37.56	Yes	Yes		Yes	
Hypothetical protein	XP_002402150.1	<i>Ixodes scapularis</i>	58	3	–	–	52.04	Yes	Yes	5 TMH		
Secreted salivary gland peptide, putative	XP_002400957.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	2	–	–	16.16	Yes	Yes	6 TMH		
Salivary gland peptide, putative	XP_002412511.1	<i>Ixodes scapularis</i>	50	2	0.08	1.09	28.94	Yes	Yes	4 TMH	Yes	
<i>Possible housekeeping proteins (63)</i>												
Protein synthesis, modification and export machinery (10)												
Arginine kinase	NM_001104086.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	213	5	0.29	3.95	39.9–61.2				Yes	
HSP70 family member	BK007244.1	<i>Amblyomma variegatum</i>	69	3	–	–	56.19					
Protein folding, similar to HSP90	XM_002413104.1	<i>Ixodes scapularis</i>	62	4	–	–	90.28					

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Protein name	Database ID no.	Species	Score	PN	empAI	% emPAI	MW	SignalP	SecretomeP	TMH/GPI	Match to 1D-PAGE LC-MS/MS (Fig. 4)
Methionyl-tRNA synthetase, putative	XM_002407084.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	3	–	–	74.24				
ADP ribosylation factor 79F *	DQ886810.1	<i>Argas monolakensis</i>	60	2	–	–	20.58				
Thioredoxin H2 protein, putative	XM_002401871.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	2	–	–	24.14	Yes			Yes
Endophilin A, putative	XM_002423258.1	<i>Pedicularius humanus</i>	53	2	–	–	40.17		Yes		
3D7 sec-1 family protein	XM_001352180.1	<i>Plasmodium falciparum</i>	51	2	–	–	135.98		Yes		
40S ribosomal protein SA	EF633966.1	<i>Ornithodoros parkeri</i>	48	2	–	–	33.07		Yes		
Microtubule affinity-regulating kinase 1	BC072186.1	<i>Xenopus laevis</i>	2	1	–	–	88.62		Yes		
Metabolism, lipid, nucleotide and carbohydrate (8)											
Glycogen phosphorylase, putative	XP_002408095.1	<i>Ixodes scapularis</i>	77	2	0.11	1.50	94.28				Yes
Triosephosphate isomerase	XP_002411305.1	<i>Ixodes scapularis</i>	57	3	–	–	26.93				
ptm1, putative	XP_002436068.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	5	–	–	52.399	Yes		5 TMH	
Imidazolone-5-propionate hydrolase	XP_002413459.1	<i>Ixodes scapularis</i>	54	3	–	–	18.12				
Glycine/serine hydroxymethyltransferase	XP_002400747.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	4	–	–	51.69				
Fatty acyl-CoA elongase, putative	XP_002434209.1	<i>Ixodes scapularis</i>	49	2	–	–	31.81		Yes		5 TMH
Triosephosphate isomerase	XP_002166707.1	<i>Bombyx mori</i>	2.02	1	–	–	26.78				
Arylformamidase (esterase-lipase)	EEC09597.1	<i>Ixodes scapularis</i>	1.53	1	–	–	31.95				
Metabolism, energy (6)											
GAPDH	ACH8810.1	<i>Dermacentor variabilis</i>	269	15	1.46	19.91	35.95		Yes		Yes
Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	XP_002411768.1	<i>Ixodes scapularis</i>	255	5	1.71	23.33	39.44		Yes		Yes
Enolase	ADD91327.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	250	5	0.56	7.64	46.96				Yes
Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase	XP_002407150.1	<i>Ixodes scapularis</i>	159	4	0.26	3.54	35.92				
Pyruvate kinase	XP_002407464.1	<i>Ixodes scapularis</i>	101	7	0.13	1.77	58.48				Yes
NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa	XP_002424632.1	<i>Pedicularius humanus</i>	54	2	–	–	27.25				
Signal transduction (5)											
Seven transmembrane receptor	XP_002436127.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	4	–	–	48.46				6 TMH
Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase *	XP_002413374.1	<i>Ixodes scapularis</i>	60	4	–	–	61.04				
RAS family protein, putative	XP_002433782.1	<i>Ixodes scapularis</i>	55	2	–	–	20.64				
Agouti-related protein	AA09464.1	<i>Sus scrofa</i>	2	1	–	–	13.20				
7-Transmembrane G-protein-coupled receptor *	XP_002632572.1	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1.62	1	–	–	37.50				7 TMH
Cytoskeletal proteins (3)											
Beta-actin	ABP01547.2	<i>Dermacentor variabilis</i>	87	3	0.14	1.91	41.82				Yes
Actin *	BAE46505.1	<i>Ornithodoros moubata</i>	3.89	2	–	–	41.84				Yes
Formin 1	NP_989754.1	<i>Gallus gallus</i>	1.43	1	–	–	135.24		Yes		
Nuclear regulation (3)											
RNA-binding protein musashi *	XP_002412054.1	<i>Ixodes scapularis</i>	56	3	–	–	28.815		Yes		Yes
ATPase involved in DNA replication and repair	XP_002166707.1	<i>Hydra magnipapillata</i>	2	1	–	–	109.034		Yes		Yes
DNA polymerase accessory subunit	AA047536.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.4	1	–	–	41.05				

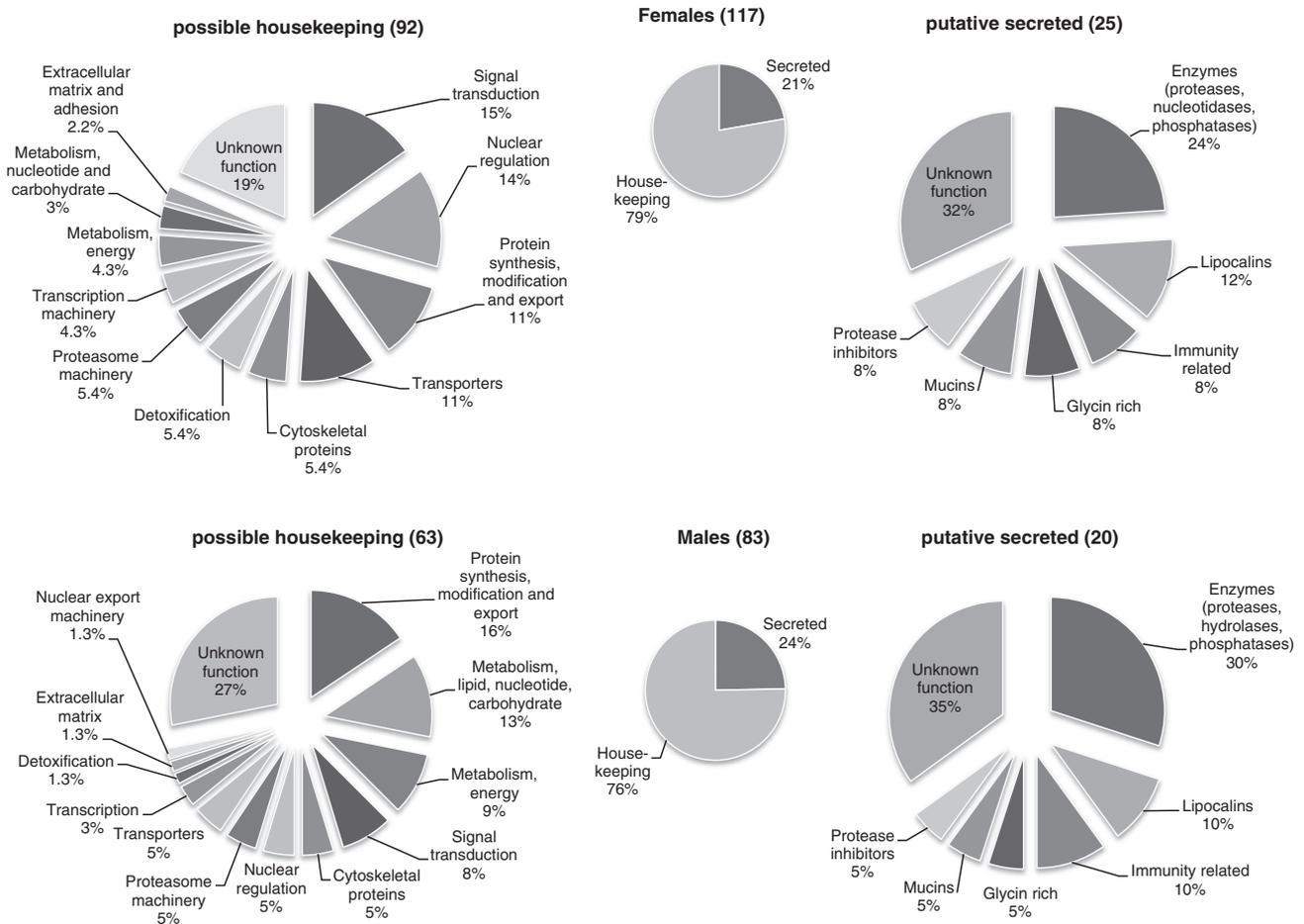


Fig. 2 – Proteins found in female and male saliva were classified as possible secreted or putative housekeeping, and further in groups according to their function and/or protein family. Pie charts represent the percentage of proteins found in each group with respect to the total number of proteins in that category (in brackets).

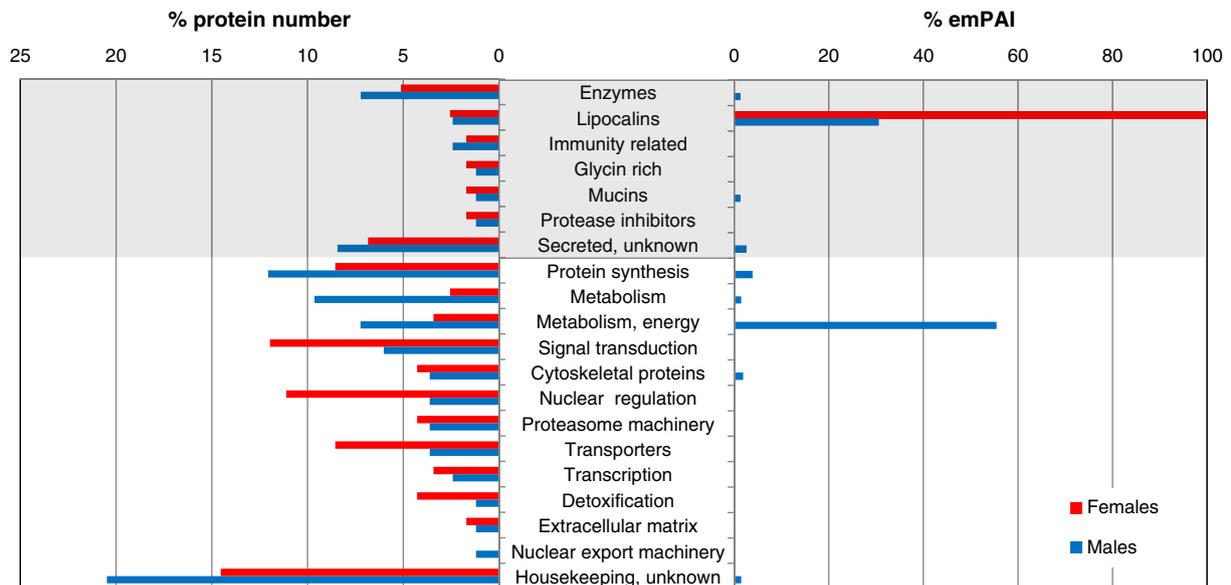


Fig. 3 – Proteins identified in female and male saliva. The proteins are classified as secreted (gray background) or housekeeping (white background), and further in groups according to their function and/or protein family. Left chart: % protein number is the ratio between the numbers of proteins identified in each group with respect to the total number of proteins identified in each sex. Right chart: the emPAI percentage of each group is the sum of the % emPAI of each protein in that group. The % emPAI of each protein is calculated as the emPAI value of that protein divided by the sum of the emPAI values of all the proteins in each sex and multiplied by 100.

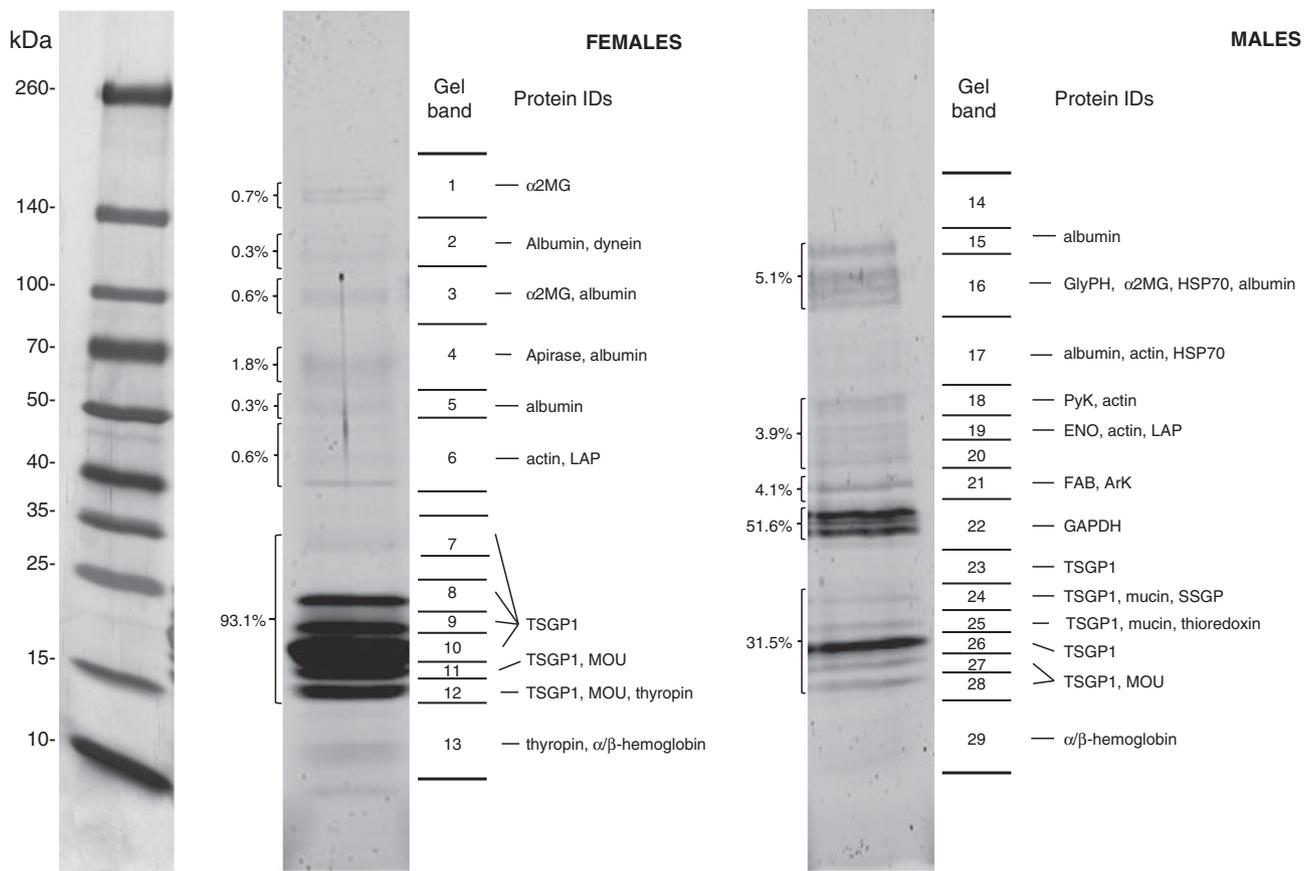


Fig. 4 – Sypro Ruby-stained one-dimensional gel electrophoresis of native female and male saliva. Left panel shows the molecular weight marker positions in the gel and their values in kDa. In the panels of females and males, the relative abundance of the Sypro Ruby-stained bands was calculated using the Image Lab software and annotated as percentage values on the left side of the lanes. The bands were excised according to the pattern depicted on the right side of the lanes and the proteins present in them were identified by LC-MS/MS and annotated to the corresponding band (Protein ID): α 2MG, alpha-2-macroglobulin; ArK, arginine kinase; ENO, enolase; FBA, fructose 1,6-bisphosphate aldolase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GlyPH, glycogen phosphorylase; HSP70, heat shock protein 70; LAP, lysosomal acid phosphatase; MOU, moubatin; PyK, pyruvate kinase; SSGP, secreted salivary gland peptide; TSGP1, tick salivary gland protein 1.

actin, enolase, fructose 1,6-bis phosphate aldolase, heat shock proteins 70 and 90, histones, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, and ubiquitin C, among others (Tables 2 and 3). Exosomes are small membrane vesicles containing lipids, adhesion and intercellular signaling molecules as well as RNAs, which eukaryotic cells secrete into their extracellular environment, entering body fluids. Exosome secretion is used more widely by cells and organisms than has previously been appreciated and is known to be involved in both physiological and pathological processes [45–49]. Thus, the finding in the saliva of *O. moubata* of a range of housekeeping/intracellular proteins known to be secreted by exosomes in other organisms suggests that this tick could also be using exosome secretion to produce saliva. Moreover, evidence for apocrine secretion of the cytoplasmic content in the salivary gland cells of argasid ticks has been reported [9], which would also contribute to explaining the presence of housekeeping/intracellular proteins in saliva, although this type of secretion would be very unspecific with respect to which housekeeping proteins will actually be secreted.

Whereas the above reasons may explain the presence in the *O. moubata* saliva of a higher number of unconventionally than conventionally secreted proteins, the quantitative data drawn from the empAI values and Sypro Ruby-stained gels indicate the opposite. That is, the relative abundance of conventionally secreted proteins was much higher than that of the housekeeping or unconventionally secreted ones, at least in female saliva (Figs. 3 and 4). These conventionally secreted proteins were mainly lipocalins such as TSGP1, TSGP4 and moubatin. Lipocalins are known to be abundantly expressed in tick saliva, playing important antihemostatic and antiinflammatory functions at the tick bite site as scavengers of biogenic amines, leukotrienes and adenosine nucleotides. Accordingly, in light of previous reports it was not surprising to find them so abundantly expressed in the *O. moubata* saliva as well [17,50–52]. Conversely, the low abundance of most of the housekeeping proteins identified in female saliva would suggest a non-targeted secretion (i.e., apocrine secretion), raising the question of whether such proteins would be of biological relevance at the tick

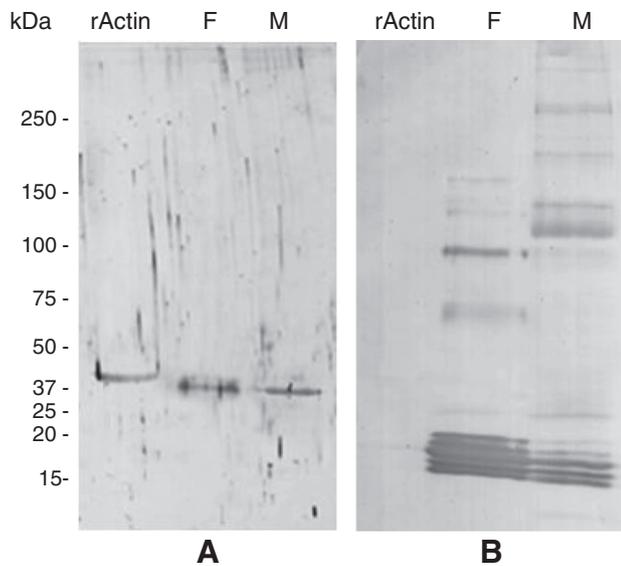


Fig. 5 – Western blot. Recombinant *O. moubata* actin (rActin) and native saliva samples from female (F) and male (M) *O. moubata* ticks were separated in 5–20% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose sheets, and reacted against: (A) a rabbit anti-rActin polyclonal serum; (B) a pool of two sera obtained from two pigs sensitized by natural infestations. The molecular weight markers are included on the left side of the panel.

feeding site or not. For instance, TSGP1, which possesses signal peptide, would represent more than 90% of the protein mass in female saliva while actin, without classical secretion signals, would not surpass the 0.6% (Fig. 4). In male saliva, however, the unusually secreted proteins were more abundant than the classically secreted ones, especially the group of enzymes involved in energy metabolism, such as GAPDH, FBA, enolase and PyK. In males, TSGP1 represents up to 31.5% of the protein mass, while GAPDH accounts for the 51.6% (Fig. 4). This suggests that these proteins would have been secreted to the saliva in a targeted way, and according to Ribeiro et al. [9] they would play some kind of antihemostatic, anti-inflammatory or immunomodulatory role. Thus, future studies aimed at their functional characterization in this extracellular environment are needed. The production of recombinants and the identification of their vertebrate molecular targets may possibly be a useful starting point, as has been performed, for example, with the *Schistosoma bovis* enolase, which acts as a profibrinolytic plasminogen receptor when expressed on the tegument surface of this worm [53], and more recently with the *O. moubata* enolase, which also acts as a profibrinolytic plasminogen receptor, most likely helping the tick to maintain the fluidity of host blood during feeding [31].

The third controversial finding concerning the identity of the proteins found in the *O. moubata* saliva was the large difference observed between the protein composition of males and females, since only 5.2% of the proteins identified were shared by both sexes. The interpretation of this difference should be done cautiously because, as stated

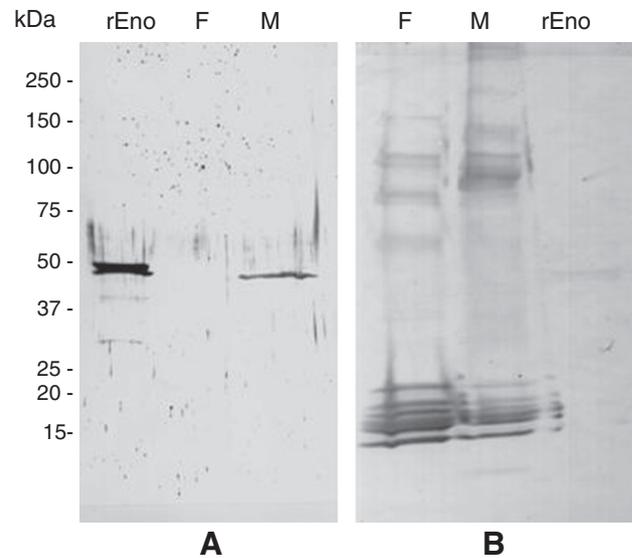


Fig. 6 – Western blot. Recombinant *O. moubata* enolase (rEno) and native saliva samples from female (F) and male (M) *O. moubata* ticks were separated in 5–20% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose sheets and reacted against: (A) a rabbit anti-rEnolase (rEno) polyclonal serum; (B) a pool of two sera obtained from two pigs sensitized by natural infestations. The molecular weight markers are included on the left side of the panel.

before, a range of the salivary proteins of *O. moubata* were not identified in the current study. Should these proteins be shared by both sexes, then the final difference between the sexes would be lower than that currently observed. However, this possibility does not rule out the difference observed in the current proteomic study, which is also supported by the different protein band patterns and protein identities shown in Figs. 1 and 4. Such a difference was unexpected for several reasons.

It is known that in hard ticks the anatomy and functions of their salivary glands differ between the sexes, male ticks having additional specific salivary gland acini. The feeding patterns between the sexes are also different since the males ingest very low or negligible amounts of blood as compared with the females [54]. In addition, several salivary gland genes are differentially expressed between males and females along the feeding process [55–57], and the effect of salivary gland extracts on the host immune response varies between males and females [58]. All of this can explain the observed differences in saliva composition between hard tick sexes. Noteworthy examples of these differences are the so-called Immunoglobulin-Binding Proteins (IGBPs), which are only secreted by males feeding adjacent to feeding females. These IGBPs are ingested by the females, helping them to prevent damage from host antibodies and hence enhancing their fecundity [35,59].

As opposed to hard ticks, soft ticks are generally fast feeders and it is generally accepted that they have already the components of their saliva synthesized and ready to be secreted [54]. In addition, in soft ticks both sexes feed equally and *O. moubata* is no exception. *O. moubata* females and males ingest equivalent amounts of blood (corresponding to 1–3

times their body weight) and remain on the host for a similar time period to complete their blood meal (40–60 min) [16]. This means that both sexes are obliged to overcome the same defensive responses from the host to become engorged; consequently one would expect both sexes to secrete a similar array of anti-hemostatic salivary molecules. However, the results reported here suggest that both sexes secrete a different array of proteins and this raises the question of what the biological significance of this difference might be.

Also, although the classical histological and ultrastructural studies of argasid salivary glands (*Argas persicus*, *Argas arboreus* and *O. moubata*) did not report differences between the sexes as regards their salivary gland structure [60–63], a more recent work by Mans et al. [64] revealed that the *Ornithodoros savignyi* salivary glands seem to be more complex than previously thought, involving more granular cell types than those described on a morphological basis. These authors suggest that alternative classification methodologies that rely on the physical expression patterns of the salivary gland proteome might be more reliable as markers of a specific granular cell type. Thus, it could be speculated that different granular cell types secreting different proteins in male and female *O. moubata* salivary glands would account for the difference between both saliva proteomes found here.

Regardless of the mechanism by which this differential secretion might be generated, the biological significance of such differences remains unknown. It could be related to the post-feeding processing of the ingested blood and/or to attraction and mating, which in *O. moubata* occurs soon after molting, outside the host and before feeding [65]. However, for the time being neither our current results nor works cited in the literature offer evidence to support or rule out such a notion. Answering these questions will require more in-depth studies.

Finally, since the results of the present proteomic analysis of *O. moubata* saliva were somewhat controversial, we sought further confirmation of them. With this in mind, we analyzed the presence/absence in the saliva samples of actin and enolase by Western blot, using custom-made hyperimmune sera against the corresponding recombinant proteins. We chose actin and enolase as targets because: (i) they have been classified as intracellular/housekeeping, lacking prediction for unconventional secretion ways; (ii) while actin was found in both sexes, enolase was found in males only; and (iii) their whole cDNA coding sequences were available in GeneBank from other authors or from our own work [31]. The results of the immune-detection confirmed those of proteomics regarding actin and enolase and lent supplementary support to the main conclusions drawn from this work (see below). Furthermore, this experiment showed that not all the secreted proteins were immunogenic in natural contacts, confirming previous observations [19]. In the case of enolase and actin, this could be due to the fact that they are highly conserved proteins and perhaps the host does not recognize them as non-self. However, they were both recognized after forcing the immune system of the host by immunization with adjuvants. While interesting, this is not the first time this phenomenon has been observed with tick salivary proteins. Kotsyfakis et al. [66] reported a similar type of behavior for the sialostatin L2 of *Ixodes scapularis*, introducing the concept of the “silent” salivary antigen and proposing these silent antigens as promising anti-tick vaccine targets. More recently, in *O. moubata*

García-Varas et al. [16] found another “silent” salivary antigen, the so-called Om44, which is a P-selectin antagonist ligand that proved to be a good candidate target for anti-*O. moubata* vaccines.

5. Conclusions

Here we report a “first pass” proteome analysis of the saliva from a soft tick, *O. moubata*. We identified 193 different proteins showing that *O. moubata* saliva has a broad and complex composition, in good agreement with the complexity of the argasid and ixodid sialomes described previously. Only 10 of these proteins appeared in both sexes, revealing a large difference in the saliva composition between males and females, which was further supported by differential immune detection. This is the first time this difference has been shown for a soft tick and needs further investigation to address its biological significance. Although the most abundant proteins in *O. moubata* saliva were some bona fide secreted proteins (mainly lipocalins), in terms of protein numbers the majority of the proteins identified were intracellular/housekeeping proteins. The presence of this kind of proteins in a secreted fluid indicated that they were probably secreted by non-classical pathways and further suggested that they might be playing unexpected functions at the tick–host interface. This will also require more investigation. These findings contribute to increasing our knowledge of soft tick sialomes and may help in the identification of novel secreted salivary proteins and functions at the tick–host interface.

Significance

This is the first description of the proteome of the argasid tick *O. moubata* saliva showing: (i) the broad and complex composition of the salivary fluid of this tick, in good agreement with the complexity of the argasid and ixodid sialomes described previously; (ii) a remarkable difference in the saliva proteomes of females and males, whose biological significance must be further investigated, and (iii) the presence in the salivary fluid of a wide range of proteins known to be housekeeping/intracellular, which lack classical secretion signals and could have been secreted in unconventional ways, including exosome secretion.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.015>.

Acknowledgments

Financial support: Project AGL2010-18164, from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain; Project CSI062A11-2, from the Regional Government of Castilla y León, Spain.

REFERENCES

- [1] Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 2004;129:S3–S14.

- [2] Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 2009;14:2051–88.
- [3] Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Missé D, Pagès F, Fusai T, et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host–vector interactions. *Parasit Vectors* 2011;4:187–204.
- [4] Chemlar J, Calvo E, Pedra JHF, Francischetti IM, Kotsyfakis M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J Proteomics* 2012;75:3842–54.
- [5] Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. In: Bowman AS, Nuttall P, editors. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 186–204.
- [6] Randolph SE. Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* 2009;136:1403–13.
- [7] Maritz-Olivier C, Christian Stutzer C, Jongejan F, Neitz AWH, Gaspar ARM. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol* 2007;23:397–407.
- [8] Karim S, Singh P, Ribeiro JM. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* 2011;6(12):e28525, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028525>.
- [9] Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 2011;12:136–47.
- [10] Vial L. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 2009;16:191–202.
- [11] Díaz-Martín V, Manzano-Román R, Siles-Lucas M, Oleaga A, Pérez-Sánchez R. Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*. *Vet Parasitol* 2011;178:163–72.
- [12] Cutler S. Possibilities for relapsing fever re-emergence. *Emerg Infect Dis* 2006;2:369–74.
- [13] Costard S, Wieland B, de Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, et al. African swine fever: how can global spread be prevented? *Phil Trans R Soc B* 2009;364:2683–96.
- [14] Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B. African swine fever: an epidemiological update. *Transbound Emerg Dis* 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x>.
- [15] Astigarraga A, Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A. A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *Vet Parasitol* 1995;60:133–47.
- [16] García-Varas S, Manzano-Román R, Fernández-Soto P, Encinas-Grandes A, Oleaga A, Pérez-Sánchez R. Purification and characterization of a P-selectin binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int J Parasitol* 2010;40:313–26.
- [17] Oleaga A, Escudero-Población A, Camafeita E, Pérez-Sánchez R. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:1149–59.
- [18] Pérez-Sánchez R, Oleaga A, Siles-Lucas M, Díaz-Martín V, De La Torre E, Hernández-González A, et al. Aplicación de eucalizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de *Ornithodoros moubata*. *Proteómica* 2010;5:143–5.
- [19] Baranda JA, Pérez-Sánchez R, Oleaga-Pérez A, Encinas-Grandes A. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *J Parasitol* 1997;83:831–8.
- [20] Ribeiro JM, Endris TM, Endris R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol* 1991;100A:109–12.
- [21] Oliveira CJF, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS, et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1a and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol* 2008;38:705–16.
- [22] De la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Pérez-Sánchez R, Hernández-González A, et al. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *J Proteomics* 2011;74:1534–44.
- [23] Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. Large scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 2002;12:1231–45.
- [24] Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1265–72.
- [25] Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011;11:535–53.
- [26] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol Biol* 2004;340:783–95.
- [27] Dyrlov Bendtsen J, Juhl Jensen L, Blom N, von Heijne G, Brunak S. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 2004;17:349–56.
- [28] Eisenhaber B, Bork P, Yuan Y, Loeffler G, Eisenhaber F. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. *TIBS* 2000;25:340–1.
- [29] Francischetti IM, Mans BJ, Meng Z, Gudderra N, Veenstra TD, Pham VM, et al. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochem Mol Biol* 2008;38:1–21.
- [30] Francischetti IM, Meng Z, Mans BJ, Gudderra N, Hall M, Veenstra TD, et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *J Proteomics* 2008;71:423–512.
- [31] Díaz-Martín V, Manzano-Román R, Oleaga A, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Vet Parasitol* 2012;191:301–14.
- [32] Manzano-Román R, Díaz-Martín V, Oleaga A, Siles-Lucas M, Pérez-Sánchez R. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet Parasitol* 2012;185:248–59.
- [33] Baranda JA, Pérez-Sánchez R, Oleaga A, Manzano R, Encinas-Grandes A. Purification, N-terminal sequencing and diagnostic value of the major antigens of *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. *Vet Parasitol* 2000;87:193–206.
- [34] Chinzei Y, Minoura H. Host immunoglobulin G titre and antibody activity in haemolymph of the tick, *Ornithodoros moubata*. *Med Vet Entomol* 1987;1:409–16.
- [35] Wang H, Nuttall P. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 1994;109:525–30.
- [36] Mans BJ, Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schwan TG, Pham VM, et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem Mol Biol* 2008;38:42–58.
- [37] Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 1990;248:593–6.

- [38] van de Loch A, Stubbs MT, Bode W, Friedrich T, Bollschweiler C, Höffken W, et al. The ornithodorin–thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J* 1996;15:6011–7.
- [39] Roversi P, Lissina O, Johnson S, Ahmat N, Paesen GC, Ploss K, et al. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *J Mol Biol* 2007;369:784–93.
- [40] Mulenga A, Macaluso KR, Simser JA, Azad AF. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. The American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:911–9.
- [41] Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog* 2010;11:e1001205.
- [42] Radisky DC, Stallis-Mann M, Hirai Y, Bissell MJ. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat Rev* 2009;10:228–34.
- [43] Madureira P, Vieira M, Magalhães V, Camelo A, Oliveira L, Ribeiro A, et al. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol* 2007;178:1379–87.
- [44] Avilán L, Gualdrón-López M, Quiñones W, González-González L, Hannaert V, Michels PA, et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites—perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Res* 2011:932549 [Epub 2011 Apr 7].
- [45] Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 2008;18:199–209.
- [46] Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:11–5.
- [47] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907–20.
- [48] Raimondo F, Morosi L, Chinello C, Magni F, Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* 2011;11:709–20.
- [49] Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:575–81.
- [50] Mans BJ, Ribeiro JMC. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. *Insect Biochem Mol Biol* 2008;38:862–70.
- [51] Mans BJ, Ribeiro JMC. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem Mol Biol* 2008;3:841–52.
- [52] Mans BJ, Ribeiro JMC, Anderson JF. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *J Biol Chem* 2008;283:18721–33.
- [53] De la Torre-Escudero E, Manzano-Román R, Pérez-Sánchez R, Siles-Lucas M, Oleaga A. Cloning and characterization of a plasminogen-1 binding, surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet Parasitol* 2010;173:76–84.
- [54] Bowman AS, Ball A, Sauer JR. Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role to pathogen trafficking and transmission. In: Bowman AS, Nuttall P, editors. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 73–91.
- [55] Bior AD, Essenberg RC, Sauer JR. Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002;32:645–55.
- [56] Packila M, Guilfoile PG. Mating, male *Ixodes scapularis* express several genes including those with sequence similarity to immunoglobulin-binding proteins and metalloproteases. *Exp Appl Acarol* 2002;27:151–60.
- [57] Aljamali MN, Ramakrishnan VG, Weng H, Tucker JS, Sauer JR, Essenberg RC. Microarray analysis of gene expression changes in feeding female and male lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L). *Arch Insect Biochem Physiol* 2009;71:236–53.
- [58] Hajnická V, Vancová I, Kocáková P, Slovák M, Gasperík J, Sláviková M, et al. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 2005;130(Pt 3):333–42.
- [59] Wang H, Paesen G, Nuttall P, Barbour A. Male ticks help their mates to feed. *Nature* 1998;391:753–4.
- [60] Coons LB, Roshdy MA. Ultrastructure of granule secretion in salivary glands of *Argas (Percicargas) arboreus* during feeding. *Z Parasitenkd* 1981;65:225–34.
- [61] El Shoura SM. Ultrastructure of salivary glands of *Ornithodoros (Ornithodoros) moubata* (Ixodoidea: Argasidae). *J Morphol* 1985;186:45–52.
- [62] Roshdy MA. The subgenus *Percicargas* (Ixodoidea, Argasidae, *Argas*). 15. Histology and histochemistry of the salivary glands of *A. (P.) persicus* (Oken). *J Med Entomol* 1972;9:143–8.
- [63] Roshdy MA, Coons LB. The subgenus *Percicargas* (Ixodoidea: Argasidae: *Argas*). 23. Fine structure of the salivary glands of unfed *A. (P.) arboreus* Kaiser, Hoogstraal, and Kohls. *J Parasitol* 1975;61:743–52.
- [64] Mans BJ, Venter JD, Coons LB, Louw AI, Neitz AWH. A reassessment of argasid tick salivary gland ultrastructure from an immuno-cytochemical perspective. *Exp Appl Acarol* 2004;33:119–29.
- [65] Horigane M, Shinoda T, Honda H, Taylor D. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acar: Argasidae). *Insect Mol Biol* 2010;19:501–15.
- [66] Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, et al. Cutting edge: immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol* 2008;181:5209.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*

Verónica Díaz-Martín^a, Raúl Manzano-Román^a, Ana Oleaga^a, Antonio Encinas-Grandes^b, Ricardo Pérez-Sánchez^{a,*}

^a Parasitología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008, Salamanca, Spain

^b Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2012

Received in revised form 7 September 2012

Accepted 14 September 2012

Keywords:

Enolase

Ornithodoros moubata

Saliva

Plasminogen

Fibrinolysis

P-selectin

ABSTRACT

Significant amounts of enolase have recently been found in the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*, raising the question as to what the function of enolase in the tick–host interface is. Enolase is a multifunctional glycolytic enzyme known to act as a plasminogen receptor on cellular surfaces, promoting fibrinolysis and extracellular matrix degradation. Fibrinolysis could be important for ticks to dissolve clots that might be formed during feeding as well as to prevent clotting of the ingested blood meal in the tick midgut. Additionally, enolase-mediated extracellular matrix degradation could contribute to the tick feeding lesion. Moreover, previous observations suggested an additional antihemostatic role for *O. moubata* enolase as a P-selectin antagonist ligand. Accordingly, the aim of the present study was to investigate the potential role of the *O. moubata* salivary enolase as a plasminogen receptor and P-selectin ligand, and to evaluate its potential as an antigen target for anti-*O. moubata* vaccines. The study included the cloning, sequencing and recombinant production of the *O. moubata* enolase, plasminogen binding and activation assays, P-selectin binding assays, animal immunization trials, and RNAi knockdown of the enolase gene. Here we confirmed that enolase is secreted to the saliva of the tick and provide convincing evidence for a role of this salivary enolase as a plasminogen receptor, most likely stimulating host fibrinolysis and maintaining blood fluidity during tick feeding. The RNAi experiments and immunization trials indicated that enolase could be also involved in the regulation of tick reproduction, suggesting new potential control strategies. Finally, the P-selectin binding experiments demonstrated that this enolase is not a P-selectin ligand.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks are haematophagous ectoparasites of terrestrial vertebrates that affect human and animal health, mainly because they transmit a large variety of infectious agents to their hosts (de la Fuente et al., 2008). In order to obtain a blood meal, ticks must modulate the host's haemostatic responses, including vascular constriction, platelet aggregation, coagulation and fibrinolysis (Maritz-Olivier et al., 2007; Francischetti et al., 2009).

Fibrinolysis is the natural process of fibrin clot solubilization. Fibrinolysis is initiated by plasminogen activators, such as tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase (uPA), which convert plasminogen to plasmin. Once activated, plasmin degrades the fibrin mesh, dissolving the clot. Plasmin is also involved in degradation of extracellular matrix material, which is relevant for angiogenesis and wound healing, and also for the dissemination of invasive pathogenic microorganisms (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Collen and Lijnen, 2005; Avilán et al., 2011).

For ticks, fibrinolysis is important for dissolving any clot that might be formed during feeding as well as for preventing clotting of the ingested blood meal in the tick midgut (Maritz-Olivier et al., 2007). It may therefore be

* Corresponding author. Tel.: +34 923219606; fax: +34 923219609.
E-mail address: ricardo.perez@irnasa.csic.es (R. Pérez-Sánchez).

expected that apart from inhibitors of clotting and platelet aggregation and vasodilators, tick saliva would also contain molecules that regulate plasminogen activation and fibrinolysis. This area of tick research has been little explored, but some salivary profibrinolytic molecules have been described in hard ticks, including two metalloproteases with fibrinolytic activity and a plasminogen activator called longistatin (Francischetti et al., 2003; Maritz-Olivier et al., 2007; Anisuzzaman et al., 2011).

Regarding enolase, this is an integral enzyme in the glycolysis and gluconeogenesis pathways. Although it probably evolved as an enzyme involved in sugar metabolism, enolase is a well known multifunctional protein in both prokaryotes and eukaryotes. Despite the lack of classic protein sorting machinery or cell membrane anchoring moieties, enolase is not only expressed in the cytosol but also at the cell surface and in the extracellular environment as a secreted protein (Pancholi, 2001; Avilán et al., 2011).

Specifically, surface enolase has been shown to act as a plasminogen receptor in a variety of eukaryotic cells, including neuronal, cancer, epithelial, endothelial and hematopoietic cells (Pancholi, 2001). Enolase is also expressed at the cell surface in many microorganisms, including bacteria, fungi and protozoa, where it interacts with plasminogen and assists in microbial dissemination within hosts (Bergmann et al., 2001, 2003; Itzek et al., 2010; Avilán et al., 2011; Floden et al., 2011; Toledo et al., 2012; Veloso Nogueira et al., 2012). Recently, the enzyme has been found on the tegument surface of the hematic trematode *Schistosoma bovis*, where it also acts as a plasminogen receptor, most likely to avoid blood clot formation on the worm's surface (de la Torre-Escudero et al., 2010). Typically, in these studies the surface localization of native enolase was confirmed by *in situ* protease degradation assay and/or immunoelectron or immunofluorescence microscopy (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011). Plasminogen binding to native enolase was demonstrated by incubating fixed bacteria/parasites with human plasminogen and anti-plasminogen and secondary antibodies (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011; Toledo et al., 2012; Veloso Nogueira et al., 2012). Further characterization of enolase as profibrinolytic plasminogen receptor involved the obtaining of the corresponding recombinant enolases, and the demonstration by ELISA assays that: (i) the recombinants bind plasminogen in a dose-dependent manner (including in occasions the K_d calculation: namely, $K_d \sim 125$ nM for the *Borrelia burgdorferi* enolase; Floden et al., 2011), and (ii) that lysine residues were critical for binding of plasminogen, as the lysine analog ϵ -aminocaproic acid (ϵ ACA) significantly inhibited binding (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011; Toledo et al., 2012; Veloso Nogueira et al., 2012). Finally, demonstration that plasminogen bound to recombinant enolases is converted to active plasmin was performed by amidolytic assays using a plasmin-specific chromogenic substrate (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011).

Secreted enolase has been found in the secretions of several bacteria and protozoan and metazoan parasites (review by Avilán et al., 2011). This secreted enolase seems

to be involved in the degradation of host tissues and immune evasion, as has been observed for the human pathogenic *Streptococcus pyogenes* (Walker et al., 2005) and the insect parasite *Ahipidius ervi* (Falabella et al., 2009).

Regarding ticks, secreted enolase has been identified in the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*, raising the question of what its function there might be (Díaz-Martín et al., submitted for publication). Given the well established role of enolase as a plasminogen receptor in other organisms, it could be surmised that *O. moubata* salivary enolase would act as a host plasminogen receptor in order to promote fibrinolysis and avoid clot formation along the whole process of blood ingestion and distribution throughout the tick midgut. On the other hand, previous observations have suggested that *O. moubata* enolase could be the identity of the so-called Om44 antigen (Pérez-Sánchez et al., 2010). Om44 is an as yet unidentified salivary protein of *O. moubata* known to bind to and antagonise host P-selectin (García-Varas et al., 2010), most likely inhibiting the downstream haemostatic roles of this cell adhesion molecule (Polgar et al., 2005; Zarbock et al., 2007). If enolase were this P-selectin antagonist ligand, then a novel anti-haemostatic function for enolase in the saliva of *O. moubata* would be unveiled. Demonstration of one or both of these hypothetical anti-haemostatic functions for the *O. moubata* salivary enolase should contribute to a better understanding of the tick–host relationship and would convert salivary enolase into a potential antigen target for the development of anti-*O. moubata* vaccines.

Accordingly, the aim of the present work was the molecular and functional characterization of the *O. moubata* enolase and the evaluation of its potential as an antigen target for anti-*O. moubata* vaccines, including the following objectives: (i) the cloning and sequencing of *O. moubata* enolase; (ii) assessment of its possible function as a plasminogen receptor and/or a P-selectin ligand, (iii) examination of the phenotypic effects of enolase gene knockdown by RNAi technology, and (iv) testing the recombinant enolase antigen in immunization trials.

2. Material and methods

2.1. Ticks and tick material

The *O. moubata* ticks used in this work came from a colony maintained in our laboratory that was established in the mid 1990s from specimens submitted from the Institute for Animal Health, Pirbright, Surrey, UK. The ticks are fed regularly on rabbits and kept at 28 °C, 85% relative humidity and 16 h light/8 h darkness.

Total RNA was purified from the salivary glands of unfed adult ticks. The purification of RNA was done using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel), following the manufacturer's instructions, and preserved at –80 °C.

Tick saliva and salivary gland extracts (SGE) were obtained from unfed adult ticks. Saliva collection was done as described in Baranda et al. (1997), and Díaz-Martín et al. (submitted for publication). Briefly, batches of five ticks were held with their dorsum adhered by double sided sticky tape on a glass slide, and 1 μ l of a 1% solution

of pilocarpine hydrochloride (Sigma; St. Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 was injected into the tick genital pore with a 5 μ l Hamilton syringe. Shortly after stimulation, small droplets of saliva started to be secreted, which were immediately harvested from the tick mouthparts using a micropipette, and deposited on 200 μ l of ice-cooled PBS. Saliva was continually collected from the five ticks in the batch until perceptible emission stopped, some 30–40 min after pilocarpine stimulation. The saliva was then filtered through a 0.22- μ m pore filter (Costar-Corning Inc., NY, USA) and stored at -20°C .

The obtaining of SGE was done as described by Oleaga et al. (2007). For this, adult ticks were dissected in a plastic Petri plate filled with cold PBS and their salivary glands were removed, rinsed three times with fresh PBS, and deposited in PBS in an ice-cooled test tube. Then, they were frozen (-20°C) and thawed five times and centrifuged for 30 min at $18,000 \times g$. The supernatant was recovered, filtered through a 0.2 μ m filter (Costar-Corning Inc.), and termed SGE. The protein concentrations of the SGE and saliva samples were estimated by measuring their absorbance at 280 nm in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). This absorbance based assay was chosen owing to its ease of use, minimal amounts of sample required, rapidity and because the similar results obtained when compared to the colorimetric Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) developed for SGE and saliva samples (unpublished data).

2.2. RT-PCR amplification, cloning and sequencing of enolase cDNA

Total RNA isolated from salivary glands was used as starting material. Reverse transcription was performed using the Transcriptor Reverse transcriptase and the “oligo dT-anchor” primer supplied in the 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed on this oligo dT-anchor primed cDNA using the following primer set: the sense primer was a degenerate oligonucleotide (dOmEno5, 5'-ATGCCRATCMMSMARRTWYWTGC) designed on an alignment of the enolase sequences from the following acarids: *Ixodes scapularis* (GeneBank: XM.002408335.1), *Aleuroglyphus ovatus* (GeneBank: EU106613.1) and *Glycyphagus domesticus* (GeneBank: AY288683.1); the anti-sense primer was the “anchor” primer supplied in the 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche). PCR was performed in 35 cycles at 94°C for 15 s, 43°C for 30 s, and 72°C 40 s for the 5 first cycles, and 94°C for 15 s, 53°C for 30 s, and 72°C 40 s for the remaining 30 cycles. The PCR product was electrophoresed in 1% agarose gel showing one only band around 1300 pb. This band was purified from the gel using the StrataPrep DNA Gel Extraction kit (Stratagene), cloned into the pSC-A vector using the StrataClone PCR Cloning kit (Stratagene), and sequenced on both strands using the standard primers T3 (5'-AATTAACCCCTACTAAAGG) and T7 (5'-TAATACGACTACTATAGG). Three different clones of the insert were sequenced to rule out sequencing errors.

2.3. Bioinformatic analysis of the enolase amino acid sequence

The deduced amino acid sequence was used to search for orthologues in the non-redundant Genbank protein sequence database by BLASTP analysis. The retrieved sequences, all of them with *E*-values equal to zero, included orthologues from species as diverse as hard ticks and *Homo sapiens*. Among them, the sequences belonging to haematophagous arthropod species and *Homo sapiens* were aligned using ClustalW. Using this alignment, neighbour-joining analysis was performed using the Mega5 package (Tamura et al., 2011). The human sequence was used as an out-group. Gaps were treated as pairwise deletions; amino acid distances were calculated using the Poisson model, and branch supports were estimated using bootstrap analysis (10,000 bootstraps). In addition, the *O. moubata* enolase sequence was analysed for conserved motifs, secretion signals, transmembrane helices or glycosyl-phosphatidyl anchor sites, respectively using the following servers:

<http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>,
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>,
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> and
<http://gpi.unibe.ch/>.

2.4. Recombinant protein expression and purification

A PCR fragment containing the whole coding sequence of the *O. moubata* enolase was obtained using the construction in pSC-A as a template and two new primers: BamH1OmEno5 (5'-GGATCCATGCCTATCACGAAGATTAATGC) and BamH1OmEno3 (5'-GGATCCTAAAGCGGGGTGCTGAAATTG). These primers contained the restriction site for *Bam*HI (underlined) to assist cloning into the expression vector pQE-30 (Qiagen), which adds a histidine tag to the N-terminal end of the recombinant protein. PCR was performed in 35 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C 40 s. The amplified PCR product was purified from 1% agarose gels using the DNA Gel extraction kit (Stratagene) and cloned into the pSC-A vector. Then, it was digested with *Bam*HI, purified as before, ligated to the *Bam*HI-predigested pQE-30 vector and transformed into XL-1B cells. Single recombinant clones were selected and plasmid DNA was extracted and sequenced using the pQSEC primer (5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG) to confirm the presence and the correct orientation of the inserts. The proper recombinant plasmid was transformed into *E. coli* M15 cells and expression was induced with 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 4 h at 37°C . The induced cells were harvested, lysed and the recombinant enolase (rOmEno) was purified by nickel affinity chromatography under denaturing conditions in a similar way as described previously (Díaz-Martín et al., 2011). Namely, the induced cells were harvested and sonicated in binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9). After a 20 min centrifugation step at $10,000 \times g$, the lysate pellet was solubilised in binding buffer containing 8 M urea and re-centrifuged as before. The new supernatant was passed through the HIS-Select

HF nickel Affinity Gel (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Before elution of the recombinant protein, urea was eliminated by washing the column with washing buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) containing decreasing concentrations of urea (6M, 4M, 2M and 0M) to facilitate protein refolding. Then, the rOmEno was eluted with elution buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9), and dialysed overnight against PBS at 4°C. Following this, the concentration of the soluble protein was measured using the DC Protein assay kit (Bio-Rad) and purity was checked by SDS-PAGE following standard procedures. The identity of the recombinant was verified by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and database searching. For this, the corresponding band was sliced from the gel and submitted to the Proteomic Service of the Prince Felipe Research Center, Valencia (Spain).

2.5. Plasminogen binding assays

To determine whether rOmEno and *O. moubata* saliva binds plasminogen, an ELISA was performed following a similar protocol to that described by de la Torre-Escudero et al. (2010). Multiwell plates (Costar-Corning Inc.) were coated 100 µl/well of the following proteins diluted in 50 mM carbonate buffer pH 9.6: 20 µg/ml of saliva, 10 µg/ml of rOmEno, 10 µg/ml of rOmEno heated in the presence of 2% DTT, 10 µg/ml of bovine α-casein (Sigma, St. Louis, MO, USA; C6780), 10 µg/ml of BSA (Sigma; A7030), 10 µg/ml of gelatin (Sigma; G9391) and 10 µg/ml of bovine gamma globulin (BGG) (Sigma; G5009). BSA, gelatin and BGG were included as negative controls, and casein as positive control since this protein is reported to bind plasminogen (Marcus et al., 1993; Heegaard et al., 1994, 1997). After coating, the wells were washed three times with phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), and blocked by incubation with 3% BSA in PBS. After three new washes with PBS-T the wells were incubated with increasing amounts (from 0 to 3 µg/well) of human glu-plasminogen (Acris Antibodies, Herford, Germany; BA522) diluted in PBS. The wells were washed again and incubated successively with sheep anti-human plasminogen diluted 1/2000 in PBS-T (Acris Antibodies; BP749) and peroxidase-conjugated donkey anti-Sheep IgG diluted 1/4000 in PBS-T (Sigma, A3415). All incubations were performed for 1 h at 37°C. Ortho-phenylenediamine (Sigma; P9029) was used as a chromogen substrate for peroxidase and absorbance was read at 492 nm in the Multiskan Go Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). In parallel, to determine the role of lysines in the plasminogen-enolase and plasminogen-saliva interactions, competition experiments were carried out by including 40 mM of the lysine analogue ε-aminocaproic acid (εACA) (Sigma; A2504) during the plasminogen-binding reaction. The 40 mM concentration was chosen according to the works by de la Torre-Escudero et al. (2010) and Veloso Nogueira et al. (2012).

2.6. Plasminogen activation assays

Two types of plasminogen activation assays were performed, in fluid phase and with enolase immobilized on a solid phase.

For the fluid phase assay we followed a protocol similar to that of de la Torre-Escudero et al. (2010). The assay was carried out in 96 well plates. In each well, the reaction mixture contained: 1 µg of rOmEno or 2 µg of saliva or 1 µg of BSA (negative control), 2 µg of human plasminogen, 0.15 mM of the plasmin-specific chromogenic substrate D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride (Sigma; V0882), and 15 ng of human tPA (Acris Antibodies; PA1272X) in a total volume of 100 µl of PBS. Plates were incubated at 37°C for 4 h and the hydrolysis of the chromogenic substrate was monitored by measuring absorbance at 405 nm in the Multiskan Go Microplate Spectrophotometer. In parallel, several negative control wells were run in which the different components of the mixture were omitted. Each condition was analyzed in quadruplicate.

For the solid phase assay, a protocol similar to that described by Floden et al. (2011) was followed. Multiwell plates were coated overnight at 4°C with 1 µg/well of rOmEno, 2 µg/well of saliva and 1 µg/well of BSA (negative control) diluted in 100 µl PBS. Plates were washed once with PBS-T, blocked for 2 h at room temperature with 2% BSA in PBS and then washed three times with PBS-T. Next, 2 µg/well of human plasminogen in 100 µl of PBS was added and incubated for 2 h at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T, and then 15 ng/well of human tPA was added. Next, the plasmin-specific substrate D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride was added at a final concentration of 0.15 mM in PBS. Plates were incubated for 2 h at 37°C, and absorbance was read at 405 nm.

2.7. P-selectin-binding assays

To assess whether the *O. moubata* enolase was able to bind to P-selectin, two different assays were performed. The first one was an ELISA similar to that described in García-Varas et al. (2010). Multiwell plates were coated overnight at 4°C with 10 µg/well of SGE (positive control), 10 µg/well of saliva, 1 µg/well of rOmEno and 1 µg/well of BSA (negative control), diluted in 100 µl of 50 mM carbonate buffer, pH 9.6. The wells were washed once with PBS-T, blocked with 2% BSA in PBS for 1 h at 37°C and washed again three times with PBS-T. Then, the plates were incubated with 250 ng/well of human P-selectin-IgG chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; 137-PS) in 100 µl of PBS containing 2 mM CaCl₂ (Leppänen and Cummings, 2010) for 2 h at 37°C. After three new washes with PBS-T, the plates were incubated with peroxidase-conjugated anti-Human IgG (Sigma; A0170) in PBS-T at 1/2000 for 1 h at 37°C. Ortho-phenylenediamine was used as a chromogen substrate for peroxidase and absorbance was read at 492 nm. For all coating antigens, two control reactions were included in which the human P-selectin-IgG chimera or the peroxidase-conjugated anti-Human IgG antibody were omitted.

In the second assay, an immunoprecipitation (IP) of the P-selectin ligand from *O. moubata* saliva was performed followed by western blot analysis of the sediment of the IP with an anti-rOmEno hyperimmune serum to assess whether the captured molecule would be recognized as enolase. For the IP, an adaptation of the protocol reported by García-Varas et al. (2010) was developed: 100 µg of protein G sepharose 4B (Sigma; P3296) were sensitized with 10 µg of human P-selectin-IgG chimera over 2 h at room temperature with gentle shaking in 200 µl of PBS. After centrifugation and washing, the sensitized beads were incubated with 1 mg of saliva in a total volume of 500 µl of PBS containing 2 mM CaCl₂ for 2 h at 37 °C with gentle shaking. Following this, the sample was centrifuged and the supernatant was removed and preserved. The pellet was washed five times with PBS containing 2 mM CaCl₂ and resuspended in 100 µl of PBS. To discard direct binding of salivary components to protein G, parallel assays were carried out using non-sensitized protein G-sepharose 4B. Samples of the IP supernatants and pellets were analyzed by SDS-PAGE and silver staining. For the western blotting assays, similar SDS-PAGE gels were electrotransferred to nitrocellulose sheets. The sheets were incubated for 1 h at 37 °C with an anti-rOmEno hyperimmune serum raised in rabbit (see below), diluted 1/100. Then, they were incubated for 1 h at 37 °C with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma, A0545), diluted 1/1000, and the reaction was revealed with 4-chloro-1-naphthol (Sigma, C8890).

2.8. Synthesis of double stranded (ds)RNAs

Two sets of oligonucleotide primers containing T7 promoter sequences for the *in vitro* transcription and synthesis of dsRNA were designed to amplify the cDNA encoding *O. moubata* enolase and the cDNA encoding bacterial luciferase (Promega, Madison, WI, USA), whose complementary dsRNA was used as negative control (Boldbaatar et al., 2010): the enolase primers were T7Eno55, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGATTGGCAGCGTTACTGA and T7Eno33, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTCTTCCCTGCAAAGACTGCT; the luciferase primers were T7Lucif55, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGAAGACGCCAAAAACAT and T7Lucif33, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTTACAATTTGGACTTTCCGC.

PCR amplification was performed in 5 cycles of 94 °C for 40 s; 57 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min, plus 30 cycles of 94 °C for 40 s; 63 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min. The PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels and the corresponding bands were purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's protocol. Following this, dsRNAs were synthesized using the Megascript RNAi Kit (Promega) according to the procedures outlined by the manufacturer. The dsRNAs were quantified by spectrometry at 260 nm, their integrity checked in 1% agarose gels, and stored at –20 °C until use.

2.9. Injection of ticks with dsRNA, and analysis of gene knockdown and associated phenotype

O. moubata ticks were injected with 1 µl of enolase dsRNA (10¹⁰–10¹¹ molecules per µl) in the lower right

quadrant of the ventral surface of their exoskeleton, using a Hamilton syringe with a 1-in., 33 gauge needle. In parallel, control ticks were injected with luciferase dsRNA and with injection buffer only (10 mM Tris-HCl, pH 7, 1 mM EDTA). Thirty females, thirty males and thirty nymphs-5 were used in each group (treated and controls), and after injection they were kept in the culture chamber at 28 °C, 85% relative humidity and 16 h light/8 h darkness. Based on previous observations (Manzano-Román et al., 2012), at 5 days after injection batches of 5 ticks were dissected, their whole internal contents were removed and pooled, and total RNA was purified as described previously. Gene expression knockdown was confirmed by the determination of mRNA expression levels of the enolase gene by real-time PCR using the One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit from Takara and the 7900HT Fast Real-Time system (Applied Biosystems). The specific oligonucleotide primers for enolase amplification were as follows: forward, 5'-CAGATTGGCAGCGTTACTGA and reverse, 5'-TCTTCCCTGCAAAGACTGCT. The *O. moubata* actin (GenBank: AB208021.1) gene was amplified as a control gene unrelated to the sequence targeted by RNAi using the following primer set: forward, 5'-GCTACGTGGCTCTGGACTTC and reverse, 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCCTT. The enolase mRNA levels were normalized against actin using the comparative Ct method and the significance of gene silencing was determined by comparison of the mRNA levels in enolase-dsRNA- and luciferase-dsRNA-injected ticks using Student's *t* test. Values of *p* < 0.05 were considered significant.

To analyze the silencing phenotype, the remaining 25 ticks in all groups were allowed to feed on rabbits at 6 days after the injection of buffer or dsRNA. The ticks were collected, weighed at 24 h after feeding, and allowed to reproduce or moult. The amount of blood ingested, the number of eggs laid, egg viability and the rates of moult and mortality were measured and summarised as means ± standard errors. The differences between ticks injected with enolase-dsRNA and those injected with luciferase-dsRNA were assessed by Student's *t* test. Values of *p* < 0.05 were considered to be significant. The whole experiment was repeated once.

2.10. Vaccination trials

Three New Zealand white rabbits were vaccinated with the *O. moubata* recombinant enolase administered with Freund's adjuvants and three additional rabbits (control group) were vaccinated with PBS in Freund's adjuvants. Each animal was vaccinated subcutaneously at 15-day intervals with three doses of 100 µg/dose of the recombinant antigen administered at two inoculation points. The first dose was administered emulsified in an equivalent volume of Freund's complete adjuvant (FCA); the second with Freund's incomplete adjuvant (FIA) and the third dose with no adjuvant. Rabbits were bled immediately before the administration of the first dose and at 7 days after the third one (immediately before infestation). Blood samples were allowed to clot and sera were removed and stored at –80 °C. IgG antibody levels against the recombinant enolase were titrated by ELISA in 2-fold dilution serum series

according to standard procedures. These sera were used in the western blotting assays described in Section 2.7, in which they showed their specificity for native and recombinant enolase.

At seven days after the third antigen dose, all rabbits were infested with 15 females, 25 males, 100 nymphs-4, 100 nymphs-3 and 100 nymphs-2. The parasites were allowed to feed on the rabbits for a maximum of 2 h and those that did not detach themselves were removed from the animals. The degree of protection was determined by measuring standard parameters to evaluate protection levels against ticks (Manzano-Román et al., 2007). These parameters were feeding time, the amount of ingested blood, the number of eggs laid, egg viability, the rate of moulting of the immature stages, and the mortality rate. The values obtained for the parasites fed on the animals from each group were summarised as means \pm standard errors. Statistical differences between the vaccinated and control groups were assessed by one-way ANOVA, followed by Dunnett's *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Amplification, cloning and sequencing of enolase cDNA

Amplification of *O. moubata* enolase cDNA by RT-PCR resulted in a cDNA molecule of 1302 nucleotides encoding a protein of 433 amino acids, with a theoretical molecular weight and *pI* of 46,958.61 Da and 6.65, respectively. The protein sequence had 9.5% of lysine residues and did not show a signal peptide, transmembrane helices or glycosyl-phosphatidyl inositol anchors (Fig. 1). The new sequence was deposited in GenBank under accession number GU594041.1.

3.2. Phylogenetic analysis of the *O. moubata* enolase protein

BLASTP analysis of the non-redundant Genbank protein database using the amino acid sequence of *O. moubata* enolase retrieved numerous proteins from a wide range of species, ranging from hard ticks to humans, all of them with *E*-values equal to zero. Among all these sequences, we selected and aligned the enolases from several haematophagous arthropods (2 hard ticks, 3 mosquitoes, 1 sand fly, 1 tse-tse fly, 1 louse) and the enolase from humans with that of *O. moubata* (Fig. 1). *O. moubata* enolase showed 82–80% amino acid identity with the enolases of hard ticks; between 77% and 74% identity with those of insects, and 73% identity with human enolase, showing a high degree of conservation. Fig. 1 also shows the conservation in all these sequences of the following motifs: (i) the four amino acids involved in Mg^{2+} binding (S^{40} , D^{245} , E^{294} and D^{319}), (ii) the seven amino acids for substrate (2-phosphoglycerate) binding (H^{158} , E^{210} , K^{344} , $HRS^{372-374}$ and K^{395}), and (iii) the fourteen amino acids constituting the so-called enolase signature (LLKVNQIGSVTEA, positions 341–354).

The phylogenetic analysis of these amino acid sequences is shown in Fig. 2. A strong support value (95%) was found for a clade containing both soft and hard tick sequences, whilst a second clade would include all the insect sequences tested (support value 98%).

The *O. moubata* enolase cDNA was cloned into the expression vector pQE30. After induction of expression in *E. coli*, the hexahistidine-tagged recombinant protein was purified under denaturing conditions (8 M urea) using nickel affinity chromatography. This purified recombinant protein (rOmEno) showed an estimated molecular weight of 48.3 kDa in SDS-PAGE (Fig. 3). The corresponding band was excised from the gel and analyzed by LC-MS/MS. Searching of the NCBI nr.meatazoa database with Mascot v2.2 (Matrix Science) and the EST.acari database with Protein Pilot v2.0 (Applied Biosystems) identified the recombinant protein as enolase.

3.3. *O. moubata* enolase and saliva bind human plasminogen

Fig. 4 shows that the rOmEno, the DTT-treated rOmEno and saliva bind plasminogen and that this binding increased in parallel with the plasminogen concentration in the reaction mixture in a similar way as do casein, which was included in the assay as a positive control (Marcus et al., 1993; Heegaard et al., 1994, 1997). Regarding the negative controls, gelatine did not bind plasminogen at all, whereas BSA and BGG showed some degree of plasminogen binding, which was considered unspecific background.

The addition of 40 mM of the lysine analogue ϵ ACA (de la Torre-Escudero et al., 2010) reduced the interaction between enolase and plasminogen by 71% and the interaction between saliva and plasminogen by 46% (Fig. 5). These data indicate an important role for lysines in plasminogen binding to enolase and also to whole saliva.

3.4. Plasminogen bound to enolase and saliva can be converted to plasmin

To assess if enolase-bound plasminogen was transformed to active plasmin, we performed first the fluid phase activation assay. The results of this experiment (Fig. 6A) showed a slight production of active plasmin when rOmEno or saliva was included in the reaction mixture, but it was variable and not significant as compared to the control (BSA).

As these results were inconclusive we performed the activation assay with the rOmEno and saliva fixed to a solid phase. As shown in Fig. 6B, rOmEno-bound plasminogen was converted to active plasmin by tPA, whereas in the absence of tPA there was no generation of plasmin. This indicates that rOmEno-bound plasminogen is accessible to plasminogen activators, but also that rOmEno lacks the ability to activate plasminogen by itself. The same result was observed when the rOmEno was substituted by whole saliva. These results show that native enolase has the same actions as the recombinant form, and that – in the absence of plasminogen activators – the saliva of *O. moubata* does

Ornithodoros_moubata	FYKNGKYDLDFKNPKSEEKDHVDQAAALQAIYEGFIKDYPIVSIEDPFEQD	300
Amblyomma_maculatum	FYKDGKYDLDFKNPNSDPNSYLSREQLKEVYEDYIRSYPIVSIEDPFEQD	300
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	FHKDGKYDLDFKNPNSDKSAWLTPDALEGMYQGFIKDFPIVSIEDPFDQD	300
Culex_quinquefasciatus	FHKDGKYDLDFKNPKSDKSAWLSLSPDSLEEMYQGFIKDFPIVSIEDPFDQD	300
Anopheles_gambiae	FHKEGKYDLDFKNPKSDPSAWLTPDALEQMYQGFIKDFPIVSIEDPFDQD	300
Lutzomyia_longipalpis	FHKDGLYDLDFKNPNSDKSLWLSPKLTELMEFVKEFPITSIEDPFDQD	300
Glossina_morsitans	FFKDGQYDLDFKNPSSDKSKWLSPEKLLGLYQEFINEFPIVSIEDAFDQD	300
Pediculus_humanus	FYKNELYNLDFKNPNYDKSQCIDYEKLTTELYMEFLKEFPIVSIEDPFDQD	300
Homo_sapiens	FFRSGKYDLDFKSPD-DPSRYISPDQLADLYKSF IKDYPVVSIEDPFDQD	299
	*.:. *:*:*:*.*. : . : * :* :*.:*:*:*:*:*:*:*:*:	
Ornithodoros_moubata	HWDAWTKFNATAKIQIVGDDLTVTNPKRIQTAVDKNACNCLLLKVNQIGS	350
Amblyomma_maculatum	DWDAWTALNTATQIQIVGDDLTVTNPKRIQTAVDKNACNCLLLKVNQIGS	350
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	HWDAWAKMTANTSIQIVGDDLTVTNPKRIATAVEKKACNCLLLKVNQIGT	350
Culex_quinquefasciatus	HWDAWAKITANTTIQIVGDDLTVTNPKRIATAVEKKACNCLLLKVNQIGS	350
Anopheles_gambiae	HWDAWSKITANTTIQIVGDDLTVTNPKRIATAVEKKACNCLLLKVNQIGS	350
Lutzomyia_longipalpis	HWDAWSKMTAGTNIQIVGDDLTVTNPKRIATAVEKKACNCLLLKVNQIGT	350
Glossina_morsitans	HWDAWSTITANTKIQIVGDDLTVTNPKRIQTAVEKKACNCLLLKVNQIGT	350
Pediculus_humanus	HWQAWSNITSKANIQIVGDDLTVTNPKRIEMAVKNKACNCLLLKVNQIGT	350
Homo_sapiens	DWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGS	349
	. * * * :.: : *:*:*:*:*:*:*:*:* * :.:*:*:*:*:*:*:*:*:	
Ornithodoros_moubata	VTEAIRAHQLAKKNGWGMVSHRSGETEDCTIADIVVGLGTGQIKTGAPC	400
Amblyomma_maculatum	VTESIRAHQLAKKNGWGMVSHRSGETEDSTIADIVVGLSTGQIKTGAPC	400
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	VTESINAHLLAKKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLSTGQIKTGAPC	400
Culex_quinquefasciatus	VTESINAHLLAKKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLSTGQIKTGAPC	400
Anopheles_gambiae	VTESINAHLLAKKNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLSTGQIKTGAPC	400
Lutzomyia_longipalpis	VTESIKAHNLAKSNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLSTGQIKTGAPC	400
Glossina_morsitans	VTESIKAHLLARENGWGMVSHRSGETEDSF IADLVVGLSTGQIKTGAPC	400
Pediculus_humanus	VTESIKAHLLAKSNGWGMVSHRSGETEDSF IADLVVGLGTGQIKTGAPC	400
Homo_sapiens	VTESLQACKLAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPC	399
	***:.* **: *:*:*:*:*:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*:	
		<u>% Identity</u>
Ornithodoros_moubata	RSERLAKHNQLLRIEEEELGSKAVFAGKNFRHPA---	433
Amblyomma_maculatum	RSERLCKYNQLLRIEEEQLGGNAVYAGKNFRQPL---	433
Ixodes_scapularis	-----	
Aedes_aegypti	RSERLAKYNQILRIEEEELGSDAKFAGKNFRHPQ---	433
Culex_quinquefasciatus	RSERLAKYNQILRIEEEELGSGAKFAGKKFRHPQ---	433
Anopheles_gambiae	RSERLAKYNQILRIEEEELGAGAKFAGKSFRHPQ---	433
Lutzomyia_longipalpis	RSERLAKYNQILRIEEEELGAGAKFAGKSFRKQP---	433
Glossina_morsitans	RSERLAKYNQILRIEEEELGSTAKYAGKNFRSPLSPK	436
Pediculus_humanus	RSERLAKYNQILRQEELGPNAKYAGKNFRNP----	432
Homo_sapiens	RSERLAKYNQLLRIEEEELGSKAKFAGRNFRNPLAK-	434
	****.*:*:*:*:*:*:*:* * :*:*:*:* * * * * *	

Fig. 1. (continued).

not contain any molecule capable of activating plasminogen by itself.

3.5. Enolase does not bind human P-selectin

The ELISA results offered in Fig. 7A show that whilst the SGE and saliva bind human P-selectin, rOmEno does not. Immunoprecipitation results in Fig. 7B show that

the salivary Om44 protein (García-Varas et al., 2010) is actually captured by the P-sel-IgG chimera (lane 4); however, this protein was not recognized by the anti-rOmEno hyperimmune serum (Fig. 7C, lane 4) whilst this serum clearly recognized both the rOmEno (lane 7) and the native enolase present in the starting saliva sample and in the saliva from IP supernatants (lanes 2, 3 and 5, respectively).

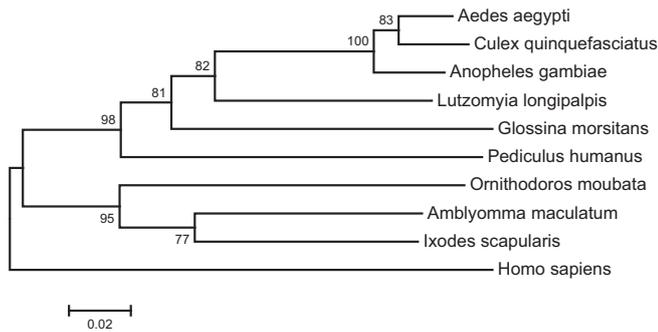


Fig. 2. Neighbour-joining analysis of the enolases from *Ornithodoros moubata* (GU594041), *Amblyomma maculatum* (AEO34612.1), *Ixodes scapularis* (XP_002408379.1), *Aedes aegypti* (XP_317672.2), *Culex quinquefasciatus* (XP_001842618.1), *Anopheles gambiae* (XP_317672.2), *Lutzomyia longipalpis* (ABV60328.1), *Glossina morsitans morsitans* (ADD19380.1), *Pediculus humanus corporis* (XP_002430191.1) and *Homo sapiens* (BAD96912.1). Evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. Branch support values (10,000 bootstraps) for nodes are indicated.

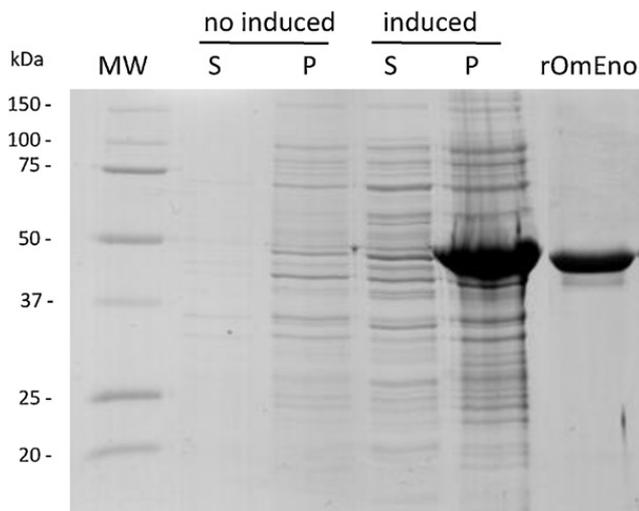


Fig. 3. Coomassie blue-stained SDS-PAGE showing the supernatants (S) and pellets (P) of lysed *E. coli* M15 cells transformed with the pQE30-OmEno plasmid before (no induced) and after the induction of expression of the recombinant protein with IPTG (induced); rOmEno, purified recombinant.

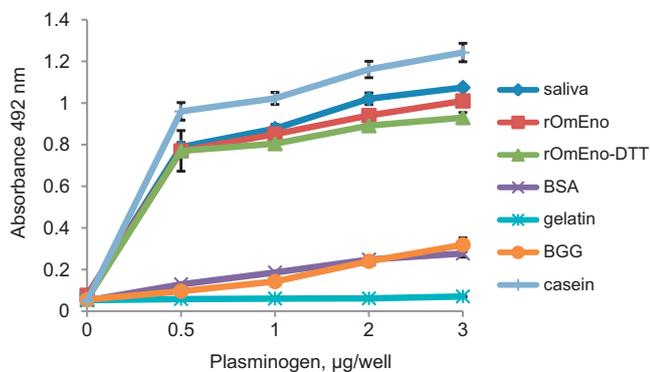


Fig. 4. *O. moubata* saliva and enolase bind plasminogen. Binding of increasing amounts (0–3 µg/well) of plasminogen to 2 µg/well of saliva, 1 µg/well of rOmEno, 1 µg/well of DTT-treated rOmEno, and to 1 µg/well of the following control proteins: BSA, gelatine, bovine gamma globulin (negative controls) and casein (positive control). Data represent the means and standard errors from a representative experiment (1 of 3) with four replicates per condition.

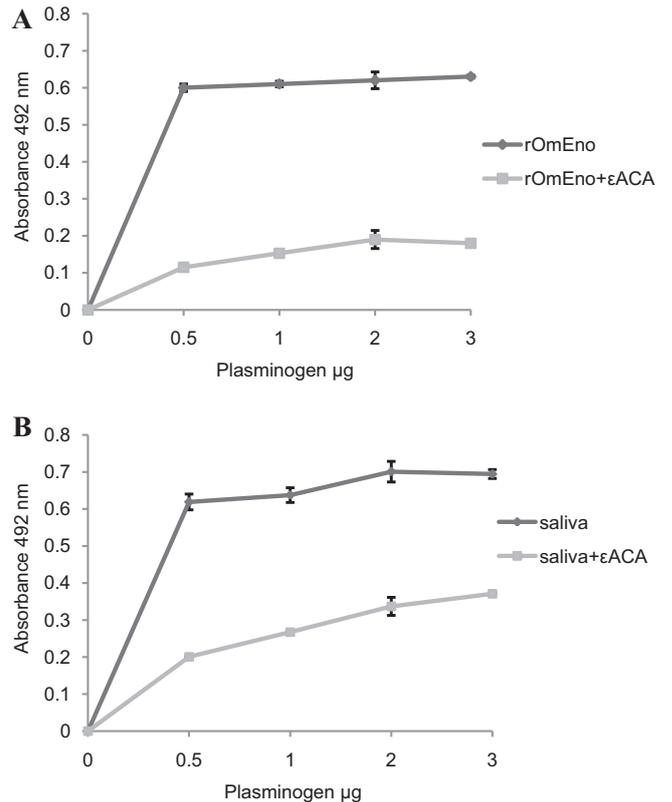


Fig. 5. Role of lysines in plasminogen binding to enolase (A) and to saliva (B). Increasing amounts of plasminogen (0–3 µg/well) were added to rOmEno- or saliva-coated wells in the presence (40 mM) or absence of εACA (lysine analogue). Values represent plasminogen binding to rOmEno and saliva minus background absorbance for BSA. Data represent means and standard errors from a representative experiment (1 of 3) with four replicates per condition.

As a whole, these results indicate that enolase is neither a ligand for human P-selectin nor the identity of the Om44 protein.

3.6. Enolase gene knockdown interferes with tick reproduction

The injection of buffer and luciferase dsRNA did not modify enolase mRNA levels. By contrast, the injection of enolase dsRNA caused a significant reduction in enolase mRNA levels, ranging from 38% in females, to 53% in males and 61% in nymphs-5 when compared to control dsRNAs (Table 1).

Table 1

Enolase gene expression knockdown achieved by injecting enolase double stranded RNA (dsRNA). Enolase mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized against actin using the comparative Ct method. Mean ± standard error of the percentage reduction in enolase mRNA in ticks injected with enolase-dsRNA respect ticks injected with luciferase ds-RNA. These results are representative of two replicate experiments.

Treatment	% Enolase gene knockdown		
	Female	Male	Nymph-5
Enolase-dsRNA	38 ± 14*	53 ± 3.1*	61 ± 1.3*

* $p < 0.05$ with respect to the luciferase-dsRNA-injected ticks.

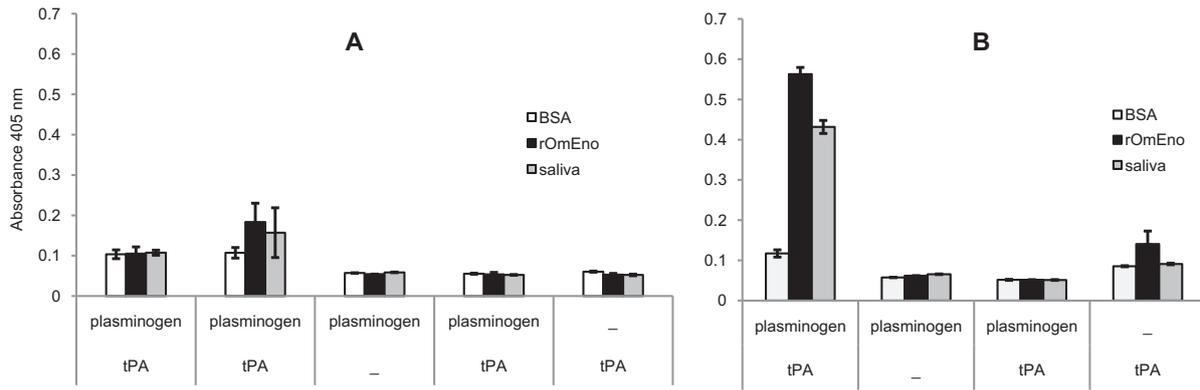


Fig. 6. Plasminogen activation assays. (A) Fluid phase assay: each well contained either 1 μg of rOmEno or 2 μg of saliva or 1 μg of BSA (negative control), and 2 μg of human plasminogen, 0.15 mM of the plasmin-specific chromogenic substrate, and 15 ng of human tPA in a total volume of 100 μl of PBS. Plates were incubated at 37 °C for 4 h and proteolytic activity was measured by absorbance at 405 nm. In parallel, four series negative control wells were run in which either the BSA/rOmEno/saliva or plasminogen or tPA or the substrate were omitted (-). (B) Assay with immobilized proteins: microtitre plates were coated with rOmEno, saliva or BSA (negative control), and incubated with plasminogen (2 μg/well), tPA (15 ng/well) and a plasmin-specific chromogenic substrate (0.15 mM). Plates were incubated at 37 °C for 2 h and proteolytic activity was measured by absorbance at 405 nm. In both panels, data represent means and standard errors from a representative experiment (1 of 3) with four replicates per condition.

Table 2 shows the phenotypic effects observed in ticks treated with buffer, luciferase dsRNA and enolase dsRNA. The injection of enolase dsRNA slightly reduced feeding performance in females (8.6%) and males (18.8%), and egg

production in females (22.7%), although not significantly. By contrast, it significantly reduced egg viability to 49.2% as compared to the treatment with luciferase dsRNA. The injection of enolase dsRNA did not affect tick mortality

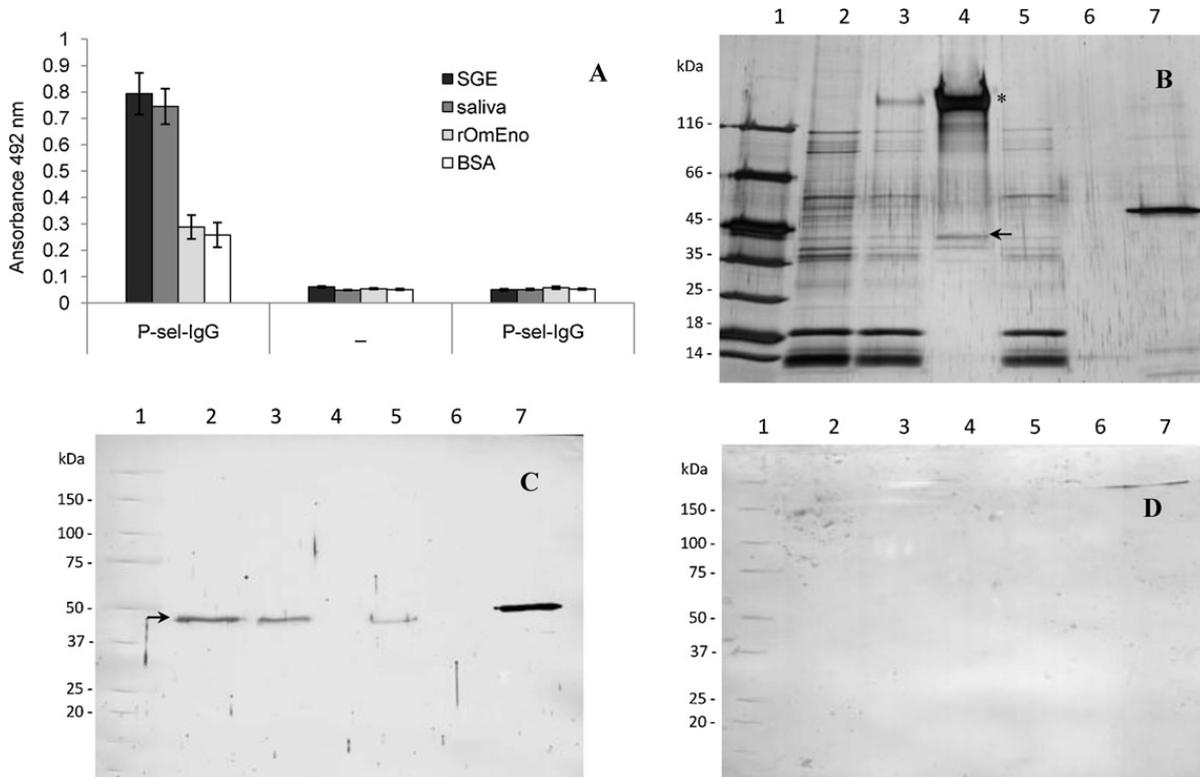


Fig. 7. Enolase does not bind P-selectin. (A) Reactivity of SGE, saliva, rOmEno and BSA in ELISA after successive incubations with recombinant human P-selectin-IgG chimera (P-sel-IgG) and peroxidase-conjugated anti-human IgG (anti-IgG). In the control reactions, incubation with P-sel-IgG or with anti-IgG was omitted. The assay is typical of three experiments. Data represent the means and standard errors from four replicates per condition. (B) SDS-PAGE showing the immunoprecipitation (IP) results: lane 1, MW markers; lane 2, *O. moubata* saliva; lanes 3 and 4, supernatant and pellet of the IP using sensitized protein G beads; lanes 5 and 6, supernatant and pellet of the IP using unsensitized protein G beads; lane 7, 1 μg of rOmEno. Arrow shows the immunoprecipitated 44 kDa band; asterisk shows the P-selectin-IgG chimera. (C) Western blot showing the antigens recognized on the IP supernatants and pellets by the anti-rOmEno hyperimmune serum: lane 1, prestained MW markers; lane 2, *O. moubata* saliva; lanes 3 and 4, supernatant and pellet of the IP using sensitized protein G beads; lanes 5 and 6, supernatant and pellet of the IP using unsensitized protein G beads; lane 7, 1 μg of OmEno. Arrows show the native enolase band in saliva. (D), Western blot using the pre-immune rabbit serum (negative control).

Table 2

Effect of enolase gene knockdown. Mean \pm standard error of the parameters measured in *O. moubata* females, males and nymphs-5 injected with buffer, luciferase dsRNA and enolase dsRNA and feed on a naïve rabbit at 6 days after injection. Treatment groups included 25 tick specimens of each developmental stage. These results are representative of two replicate experiments.

Parameter	Developmental stage	Treatment	Parameter measure
Ingested blood (mg)	Female	Buffer	199.4 \pm 22.7
		Luciferase	203.5 \pm 24.9
		Enolase	185.9 \pm 21.4 (8.6)
	Male	Buffer	26.3 \pm 3.1
		Luciferase	25.5 \pm 5.1
		Enolase	20.7 \pm 3.6 (18.8)
	Nymph-5	Buffer	58.4 \pm 9.4
		Luciferase	58.9 \pm 9.8
		Enolase	60.9 \pm 6.7
No. of eggs laid per tick	Female	Buffer	116.2 \pm 25.3
		Luciferase	123.7 \pm 30.4
		Enolase	95.9 \pm 26.9 (22.7)
% Viability	Egg	Buffer	78.4 \pm 7.7
		Luciferase	83.7 \pm 3.3
		Enolase	42.5 \pm 9.7 (49.2)*

* $p < 0.05$ with respect to the luciferase group. Numbers between brackets indicate percentage of reduction in ticks treated with enolase dsRNA, compared with ticks treated with luciferase dsRNA.

or nymph-5 moulting, since enolase-treated ticks moulted and survived as well as the ticks injected with buffer or luciferase dsRNA (not shown).

3.7. Protective value of recombinant enolase against *O. moubata*

The expression and purification of the recombinant protein resulted in the production of the polypeptide rOmEno, which migrated as a single band of 48.3 kDa in reducing SDS-PAGE (Figs. 3 and 7B), in good agreement with the predicted molecular mass for the 6xHis-tagged recombinant polypeptide (48.1 kDa).

The recombinant protein was used for the vaccination of rabbits. The sera from the vaccinated animals reached anti-enolase IgG antibody titres of 1/12,800 and reacted specifically with both the recombinant polypeptide and native enolase in the saliva samples (Fig. 7C). The sera from control rabbits did not react with the recombinant protein or saliva (Fig. 7D).

The protective effect of vaccination was assessed by infesting each rabbit with 15 females, 25 males, 100 nymphs-4, 100 nymphs-3 and 100 nymphs-2 (Table 3). No significant differences were observed between the vaccinated and control groups for any developmental stage in the feeding time (not shown) and the amount of blood ingested. The moulting rates of the nymph stages ranged between 90% and 100%, and no significant differences in this parameter between groups were observed (not shown). However, regarding oviposition, the females fed on vaccinated rabbits deposited 18.1% fewer eggs than the female ticks fed on control rabbits. The mortality rates at 2 months post-feeding were similar to the controls for males, females and nymphs-2 but reached significant values for nymphs-4 and nymphs-3 (20.5% and 16.5%, respectively).

4. Discussion

Recently, a proteomic analysis of the saliva of *O. moubata* carried out by us revealed the presence in this fluid of

significant amounts of enolase (Díaz-Martín et al., submitted for publication). This implies that enolase is secreted to saliva and inoculated into the host during feeding. To our knowledge, this is the first report of a tick enolase being secreted into the host and thus far its function in the tick–host interface is unknown. Nevertheless, in agreement with the statement of Ribeiro et al. (2011) for tick salivary proteins, if it is secreted into the host it would probably act as an antihaemostatic, anti-inflammatory, immunomodulatory, or even anti-angiogenic agent.

Enolase was first known as a key enzyme in the glycolytic pathway in the cells of a wide range of organisms, ranging from bacteria to higher animals. Currently, it is widely recognised as a multifunctional protein that plays different functions in intracellular and extracellular microenvironments. In particular, when present in extracellular environments, enolase mediates the activation of enzymes involved in the invasion of tissues by pathogens and tumour cells, and in the modulation of host haemostatic and immune responses (Falabella et al., 2009; de la Torre-Escudero et al., 2010; Avilán et al., 2011). One such enzyme is plasminogen/plasmin, which plays a key role in fibrinolysis and extracellular matrix disintegration (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Collen and Lijnen, 2005).

Accordingly, a likely function for the salivary enolase of *O. moubata* at the tick–host interface could be as a plasminogen receptor that promotes fibrinolysis and maintains blood fluidity during blood ingestion and distribution in the tick midgut.

Additionally, on the basis of our previous findings we considered the possibility of a second anti-haemostatic function for this salivary enolase as an antagonist ligand of host P-selectin. *O. moubata* saliva contains an unidentified protein of 44 kDa (Om44) that binds to and blocks P-selectin (García-Varas et al., 2010). When we attempted the identification of Om44 by MALDI-TOF MS/MS, the best protein hit was enolase, suggesting it could be the unknown salivary ligand of P-selectin (Pérez-Sánchez et al., 2010).

Table 3Mean \pm standard error of the parameters measured in *O. moubata* specimens fed on control rabbits ($n = 3$) and rabbits vaccinated with rOmEno ($n = 3$).

Parameter	Developmental stage	Group	Parameter measure
Ingested blood (mg)	Male	Control	23.8 \pm 0.4
		rOmEno	24.20 \pm 1.0
	Female	Control	217.6 \pm 6.5
		rOmEno	204.7 \pm 7.1 (5.6%)
	Nymph-4	Control	40.1 \pm 0.3
		rOmEno	47.9 \pm 0.3
	Nymph-3	Control	14.7 \pm 0.2
		rOmEno	17.7 \pm 0.1
	Nymph-2	Control	6.7 \pm 0.1
		rOmEno	6.3 \pm 0.1 (5.9%)
No. eggs laid	Female	Control	172 \pm 17.8
		rOmEno	141 \pm 18.8 (18.1%)
% Viability	Egg	Control	83.4 \pm 3.4
		rOmEno	82.3 \pm 5.9
% Mortality	Male	Control	4.4 \pm 0.1
		rOmEno	3.9 \pm 1.0
	Female	Control	13.3 \pm 2.4
		rOmEno	17.4 \pm 1.1
	Nymph-4	Control	1.5 \pm 0.1
		rOmEno	20.5 \pm 0.9*
	Nymph-3	Control	0 \pm 0
		rOmEno	16.5 \pm 1.6*
	Nymph-2	Control	1.5 \pm 0.1
		rOmEno	2.5 \pm 0.1

* $p < 0.05$ with respect to the control group. Numbers between brackets indicate percentage of reduction in vaccinated group compared to control group.

Consequently the main purpose of the present work was to check whether the salivary enolase of *O. moubata* might have a function as a plasminogen receptor and/or P-selectin ligand. To accomplish this, we first cloned and sequenced the enolase cDNA, produced the recombinant protein, and performed plasminogen-binding and -activation assays, as well as P-selectin-binding assays.

Starting by the results of the P-selectin binding assays (Fig. 7), these clearly demonstrated that the salivary enolase is not the ligand of P-selectin because the rOmEno did not bind to P-selectin and because the true ligand, which was present in the IP pellet, was not recognised by the specific anti-enolase hyperimmune serum.

The deduced 433 amino acid sequence of *O. moubata* enolase was compared with two enolases from hard ticks (the only tick enolase sequences currently available) and with the enolases from other haematophagous arthropods. This comparison revealed a high degree of conservation (from 74% to 82% sequence identity), including full conservation of the metal- and substrate-binding motifs and the enolase signature (LLKVNQIGSVTEA).

Similarly to other enolases, *O. moubata* enolase lacks conventional secretion signals or membrane anchor regions, and exactly how the enolase of *O. moubata* and other enolases are secreted or surface-exposed remains unknown (Avilán et al., 2011). It has been suggested that enolases could be secreted in exosomes and other vesicles (Olver and Vidal, 2007), and that secreted enolases can in turn re-associate with the cell membrane (Bergmann et al., 2001). This re-association of secreted proteins without typical membrane anchors seems to be a fairly common phenomenon and has been observed for an increasing number of both eukaryotic and bacterial enolases (Pancholi and Chhatwal, 2003; Floden et al.,

2011). In fact, a hydrophobic domain in human enolase (AAVPSGASTGI) suggested to play a role in its membrane association (Pancholi, 2001) is identical in the *O. moubata* enolase and in the majority of the enolases from the haematophagous arthropods depicted in Fig. 1. Thus, it is tempting to speculate that this motif would allow *O. moubata* salivary enolase to associate with the membranes of the host cells (i.e., platelets, leukocytes), focusing its presumed anti-haemostatic actions at the tick bite site. Evidently, this requires experimental demonstration.

Regarding the potential anti-haemostatic activities of the *O. moubata* enolase, our results (Fig. 4) demonstrate that the recombinant protein can bind plasminogen (even after treatment with DTT), and that the rOmEno-plasminogen interaction involves lysine residues in the rOmEno, as seems to be the rule for other enolases (de la Torre-Escudero et al., 2010; Floden et al., 2011; Toledo et al., 2012). The fact that DTT-treated enolase also acted as plasminogen-binding protein was not completely unexpected because other similarly treated recombinant enolase also bound plasminogen (de la Torre-Escudero et al., 2010). This result suggests that disulphide bonds, if present, do not participate in plasminogen binding.

When comparing the activity of the recombinant enolase and saliva, 1 μ g of recombinant enolase gives a similar signal than 2 μ g of saliva (Fig. 4). This should not be interpreted as if enolase was 50% of the salivary protein. Theoretically, it could be expected that 2 μ g of saliva have a lower amount of plasminogen-binding protein than 1 μ g of recombinant enolase, where all the protein is plasminogen-binding. Accordingly, 1 μ g of the recombinant protein should give even a higher signal than the 2 μ g of saliva. As this was not the case, an explanation could be that enolase had a lower affinity for plasminogen than other

plasminogen binding proteins potentially present in the tick saliva. A similar situation was reported by Floden et al. (2011) for the *B. burgdorferi* enolase and ErP proteins, both of them being expressed in the bacterial surface and whose K_d are 125 nM and 25 nM, respectively.

Once demonstrated that the *O. moubata* enolase binds plasminogen, we assessed if this enolase-bound plasminogen was transformed to active plasmin. The results of the fluid phase activation assay suggested some degree of activation and plasmin generation, but these results were too variable to be conclusive (Fig. 6A). By contrast, the results of the assay with immobilized enolase clearly demonstrated that the plasminogen bound to both the rOmEno and the native enolase (present in the whole saliva) is transformed to active plasmin by plasminogen activators. Although the presence in the saliva of additional plasminogen-binding proteins cannot be ruled out, these results support the idea that, *in vivo*, *O. moubata* enolase is a real plasminogen receptor capable of promoting fibrinolysis and, probably, the degradation of extracellular matrix material, which in turn would contribute to the feeding lesion. As a whole, these results also suggest that only the immobilized enolase participates in the activation of plasminogen, which would make sense with the idea of focusing the enolase profibrinolytic activity at the tick bite site by means of re-association of tick enolase to host cell membranes. Furthermore, the results of plasminogen activation assays also indicated that the saliva of *O. moubata* does not contain molecules capable of activating plasminogen by themselves. This is different from the case of hard ticks, or at least as regards *Haemaphysalis longicornis*, whose saliva contains a novel protein, longistatin, which activates clot-bound plasminogen to plasmin in the same way as tPA and, additionally, degrades fibrinogen, exerting the functions of both a plasminogen activator and an anticoagulant (Anisuzzaman et al., 2011). Although the current results do not allow establishing whether this difference represents an advantageous strategy for *O. moubata* respect hard ticks, it could be speculated that using a glycolytic cheap protein as enolase (Floden et al., 2011) for an additional extracellular function would be advantageous in terms of energy saving.

Further exploration of the function of *O. moubata* enolase involved RNAi gene-silencing experiments, with the observation of percentages of enolase gene knockdown comparable to those obtained for other *O. moubata* genes in previous works (Manzano-Román et al., 2012). However, the effect of enolase gene silencing on tick feeding performance was low (males) or negligible (females and nymphs-5). The reduced effect of gene silencing on the feeding of an argasid could be explained in terms of their “fast feeder” physiology, in comparison with that of hard ticks. In soft ticks, all salivary components are pre-synthesised and stored in their salivary gland granules, whilst hard ticks need to synthesize part of those components during the actual feeding process (Bowman et al., 2008). Therefore, enolase gene silencing may not influence the amount of enolase protein already stored and hence feeding might be only slightly affected or even not at all. Interestingly, enolase gene silencing significantly affected reproduction, since the treated females deposited about

22% fewer eggs, and 50% of those eggs were unfertile. Although we did not investigate enolase gene transcription in eggs, the inhibition of hatching after enolase gene silencing provides evidence for the involvement of enolase in egg development.

Regarding the vaccination trial, the recombinant enolase was seen to be immunogenic when administered with Freund's adjuvants and induced high titres of specific antibodies, which recognized both the recombinant antigen and the native enolase in saliva, thus confirming the secretion of this protein to an extracellular fluid (Fig. 7C). However, in spite of the exposure of this salivary enolase at the host–tick interface and its likely role as a plasminogen receptor and a plasminogen activation enhancer, the effect of vaccination on tick feeding was insignificant. Probably, the redundant anti-haemostatic molecules that are usually present in the tick salivary repertoire (Maritz-Olivier et al., 2007; Fontaine et al., 2011; Chmelar et al., 2012) could compensate the expected antibody-mediated loss of function of the salivary enolase. By contrast, vaccination caused a reduction in egg laying similar to that caused by gene silencing, reinforcing the notion that enolase may be involved in egg development and oviposition. In addition, vaccination also caused a significant increase in the mortality rates of nymphs-3 and nymphs-4. Intriguingly, for these two developmental stages, the specimens fed on vaccinated rabbits ingested 20% more blood than the specimens fed on control rabbits, whilst the remaining developmental stages fed equally on vaccinated and control rabbits (Table 3). Therefore, it could be speculated that the higher amount of anti-enolase antibodies ingested by these developmental stages is related with their increased mortality. Obviously, this idea will require experimental demonstration.

Although preliminary, the present results are encouraging and deserve further studies using different adjuvants and immunization strategies to enhance the vaccination effects. On the other hand, the *O. moubata* enolase shows a high degree of sequence similarity to enolases from other sources, including mammals. This would seem to reduce the attractiveness of using tick enolase as an immunogen to vaccinate pigs. Extensive studies would be required to test for autoimmune reactions.

In sum, to our knowledge this is the first report describing the cloning, sequencing and recombinant production of a tick enolase. We also confirm that this protein can play an important role at the host–tick interface as a plasminogen receptor, most likely by stimulating host fibrinolysis and maintaining blood fluidity during tick feeding. The hypothesis that this enolase behaves as an antagonist ligand for host P-selectin can be ruled out. Additionally, RNAi experiments and immunization trials indicated that enolase could be involved in the regulation of tick reproduction, suggesting new potential control strategies.

Acknowledgements

This work has been financed by project CSI062A11-2 from the Regional Government of Castilla y Leon (Spain), and project AGL2010-18164 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. VD-M is a recipient of a

JAEPredoc fellow from the CSIC-FSE and RM-R was funded by the JAEDoc program (CSIC-FSE).

References

- Anisuzzaman, Islam, M.K., Alim, M.A., Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., Tsuji, N., 2011. Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathog.* 7, e1001312.
- Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P.A., Concepción, J.L., 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 Res.* 2011, 932549.
- Baranda, J.A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1997. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *J. Parasitol.* 83, 831–838.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2001. alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 40, 1273–1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2003. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 49, 411–423.
- Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Tanaka, T., Xuan, X., Fujisaki, K., 2010. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. *J. Insect Physiol.* 56, 1587–1598.
- Bowman, A.S., Ball, A.B., Sauer, J.R., 2008. Tick salivary glands: the physiology of ticks water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 73–91.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129, 307–321.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J.H.F., Fracischetti, I.M.B., Kotsyfakis, M., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026>.
- Collen, D., Lijnen, H.R., 2005. Thrombolytic agents. *Thromb. Haemost.* 93, 627–630.
- 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. *Front. Biosci.* 13, 6938–6946.
- de la Torre-Escudero, E., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., 2010. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* 173, 76–84.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2011. Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*. *Vet. Parasitol.* 178, 163–172.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2012. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between sexes. *J. Proteomics*, submitted for publication.
- Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 801–813.
- Floden, A.M., Watt, J.A., Brissette, C.A., 2011. *Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein. *PLoS ONE* 6, e27502.
- Francischetti, I.M., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2003. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)olytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem. Biophys. Commun.* 305, 869–875.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14, 2051–2088.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier, C., Almeras, L., 2011. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host–vector interactions. *Parasit. Vectors* 4, 187–204.
- García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2010. Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int. J. Parasitol.* 40, 313–326.
- Heegaard, C.W., Rasmussen, L.K., Andreasen, P.A., 1994. The plasminogen activation system in bovine milk: differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding to casein and urokinase receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1222, 45–55.
- Heegaard, C.W., Andreasen, P.A., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., 1997. Binding of plasminogen and tissue type plasminogen activator to dimeric s2-casein accelerates plasmin generation. *Fibrinolysis Proteolysis* 11, 29–36.
- Itzek, A., Gillen, C.M., Fulde, M., Friedrichs, C., Rodloff, A.C., Chhatwal, G.S., Nitsche-Schmitz, D.P., 2010. Contribution of plasminogen activation towards the pathogenic potential of oral streptococci. *PLoS ONE*, 5.
- Leppänen, A., Cummings, R., 2010. Fluorescence-based solid-phase assays to study glycan-binding protein interactions with glycoconjugates. *Methods Enzymol.* 478, 241–264.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R., 2012. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet. Parasitol.* 185, 248–259.
- Manzano-Román, R., García-Varas, S., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2007. Purification and characterization of a 45-kDa concealed antigen from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* that induces lethal anti-tick immune responses in pigs. *Vet. Parasitol.* 145, 314–325.
- Marcus, G., Hitt, S., Harvey, S.R., Tritsch, G.L., 1993. Casein, a powerful enhancer of the rate of plasminogen activation. *Fibrinolysis* 7, 229–236.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A.W., Gaspar, A.R., 2007. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* 23, 397–407.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1149–1159.
- Olver, C., Vidal, M., 2007. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcell. Biochem.* 43, 99–131.
- Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 902–920.
- Pancholi, V., Chhatwal, G.S., 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 391–401.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Díaz-Martín, V., De La Torre, E., Hernández-González, A., Manzano-Román, R., 2010. Aplicación de equalizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de *Ornithodoros moubata*. *Proteómica* 5, 143–145.
- Polgar, J., Matuskova, J., Wagner, D.D., 2005. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1590–1596.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12, 136.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Toledo, A., Coleman, J.L., Kuhlow, C.J., Crowley, J.T., Benach, J.L., 2012. The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 80, 359–368.
- Veloso Nogueira, S., Smith, A.A., Qin, J.H., Pal, U., 2012. A surface enolase participates in *Borrelia burgdorferi*-plasminogen interaction and contributes to pathogen survival within feeding ticks. *Infect. Immun.* 80, 82–90.
- Walker, M.J., McArthur, J.D., McKay, F., Ranson, M., 2005. Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor? *Trends Microbiol.* 13, 308–313.
- Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R.K., Ley, K., 2007. Platelet–neutrophil-interactions: linking haemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 21, 99–111.

Self-assembled Protein Arrays from an *Ornithodoros moubata* Salivary Gland Expression Library

Raul Manzano-Román,[†] Veronica Díaz-Martín,[†] Maria González-González,[‡] Sergio Matarráz,[‡] Angel Francisco Álvarez-Prado,[‡] Joshua LaBaer,[§] Alberto Orfao,[‡] Ricardo Pérez-Sánchez,[†] and Manuel Fuentes^{*,‡}

[†]Parasitología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

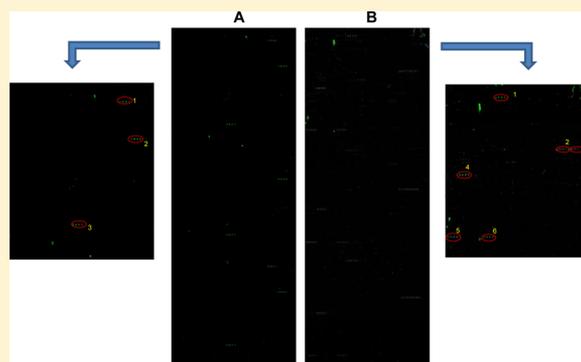
[‡]Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (USAL/CSIC), IBSAL, Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

[§]Virginia G. Piper Center for Personalized Diagnostics, Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287-6401, United States

S Supporting Information

ABSTRACT: Protein interactions play a critical role in the regulation of many biological events and their study in a high-throughput format has become a key area of proteomic research. Nucleic Acid Programmable Protein Arrays (NAPPA) technology allows the construction of protein arrays from cDNA expression libraries in high-throughput cell-free systems to study protein interaction and functions. Tick saliva contains antihemostatic, anti-inflammatory, and immunosuppressive proteins that counteract the host hemostatic, immune, and inflammatory responses allowing the ingestion of host blood and facilitating its infection by the tick-borne pathogens. Identification of such proteins and their functions could help in the selection of antigenic targets for the development of antitick and transmission-blocking vaccines. With that aim, we have prepared a cDNA expression library from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* and subsequently produced a self-assembled protein microarray using 480 randomly selected clones from that library. The reproducibility of the array, its representativeness of the tick salivary protein repertoire, and the functionality of the in situ expressed proteins have been checked, demonstrating that it is a suitable tool for the identification and functional characterization of soft tick salivary molecules that interact with host proteins. Several clones in the array were shown to bind to human recombinant P-selectin. One of them was a likely secreted tick phospholipase A2, which may represent a potential new ligand for P-selectin. As these salivary molecules are likely involved in blood meal acquisition through the modulation of the host immune and hemostatic responses, this new high-throughput tool could open new avenues for development of new therapeutic agents and control strategies against ticks and tick-borne pathogens.

KEYWORDS: protein arrays, ticks, salivary glands, expression libraries, interactions



■ INTRODUCTION

Ticks are obligate hematophagous parasites with great medical and veterinary importance because they transmit a wide diversity of pathogens (protozoa, bacteria and viruses) that impact on human and animal health.^{1–4} Tick feeding is a complex process in which ticks must start a micro hemorrhage and maintain a continuous blood flow toward their mouth parts. To accomplish this, tick salivary glands produce a complex mixture of antihemostatic, anti-inflammatory and immunomodulatory molecules that are inoculated into the host within the tick saliva and counteract the host hemostatic, inflammatory and immune responses.^{5–9} Additionally, the immunosuppressive action of these salivary bioactive molecules is exploited by tick-borne pathogens to infect the host more

efficiently.^{10,11} Therefore, these pharmacologically active molecules from the tick salivary glands could have future applications as novel therapeutic agents or as protective antigens in the development of antitick vaccines aimed at limiting tick infestations and blocking transmission of tick-borne pathogens.^{6,12–16}

This increasing interest on tick salivary molecules has recently stimulated the construction and description of several soft and hard tick sialotranscriptomes and sialoproteomes.^{17–23} In addition, many expressed sequence tag (EST) collections derived from tick salivary glands are now included in the NCBI

Received: July 27, 2012

Published: November 12, 2012

DBEST.²² As a result, our knowledge on tick salivary molecules and their functions has been significantly enlarged in the past few years. In spite of this, most molecules present in the saliva of ticks remain poorly known.^{24,25} The analyses of tick sialotranscriptomes and sialoproteomes have revealed that tick saliva has a much broader complexity than expected, having hundreds of different proteins, many of which are novel, lacking similarities to other proteins in large databases, such as the nonredundant NCBI. In fact, for any tick species with a known sialotranscriptome, less than 5% of the proteins have been expressed and so, their function verified.²² Thus, many tick salivary proteins and protein families are still awaiting functional identification.

The argasid tick *Ornithodoros moubata* is distributed throughout South and East Africa and Madagascar, where it colonizes wild and domestic habitats and feeds mainly on warthogs but also on domestic swine and humans.²⁶ *O. moubata* transmits important human and animal pathogens such as *Borrelia duttoni*, the agent of East African tick-borne relapsing fever, and the African swine fever virus.^{27,28} Therefore, elimination of this tick from at least synanthropic environments (human dwellings and pigsties) would greatly facilitate the prevention and control of these pathogens.

While there are some rather successful vaccines for hard tick genus like *Boophilus* (namely, Gavac or Bm86 vaccine and TickGARD Plus), an effective vaccine against *Ornithodoros* spp. and in general soft ticks is still lacking. Nonetheless, the development of anti-*O. moubata* vaccines based on tick salivary antigens has been previously attempted with partial success.²⁹ It can be expected that a better knowledge of the identity and functions of the *O. moubata* salivary proteins would facilitate the identification of new antigen targets for development of more effective anti-*O. moubata* vaccines.

Protein microarrays have become versatile tools for simultaneous analysis of a great number of proteins immobilized on a solid support allowing their functional and immunogenic characterization.³⁰ Therefore, this technology could be applied to investigate the function of tick salivary molecules at the host-tick interface helping in the identification of new molecules acting as inhibitors of platelet activation and aggregation, leukocyte recruitment or anticlotting agents.

Current technology allows printing of protein microarrays from cDNA expression libraries, and tick cDNA libraries can be easily constructed using recombination technology.^{31–34} Cloning by recombination allows the production of a cDNA entry library from purified poly A+ mRNA and subsequent transfer of this cDNA entry library into expression vectors to generate cDNA expression libraries suitable for construction of protein arrays by Nucleic Acid Programmable Protein Arrays (NAPPA) technology.^{32,35–37}

NAPPA protein microarrays are constructed by spotting the protein-encoding plasmid DNAs at high density on a functionalized glass slide and expressing the encoded proteins *in situ* immediately before their analysis. Protein expression is done using a cell-free expression system, which provides a transcription/translation environment close to that of native protein synthesis and facilitates functional folding and post-translational modifications, allowing multiplexed analysis of hundreds to thousands of protein interactions in a miniaturized format.^{30,37,38}

Since protein interactions are based upon the electrostatic and geometric complementarities of the interacting protein partners in their natively folded 3-D structure, NAPPA has

become one of the more advanced tools for the study of such protein interactions, having been successfully used in, for example, the identification of antigens and tumor markers.^{32,35,37,39–42} These points to the feasibility of using NAPPA to mine tick salivary protein repertoires for antihemostatic, anti-inflammatory, and immunomodulatory molecules, and eventually to identify new antigen targets for antitick vaccines.

Therefore, our purpose in the present work was the construction of protein microarrays from *O. moubata* salivary glands using NAPPA technology, and the validation of such arrays as a reliable high-throughput tool for the identification and characterization of the tick salivary proteins acting at the tick-host interface. Accordingly, our specific objectives were: (1) construction of a cDNA expression library from *O. moubata* salivary glands in an expression vector compatible with cell-free expression systems, (2) subsequent construction of protein microarrays from the cDNA expression library through NAPPA technology, and (3) quality-control analysis of the microarrays to ensure their reliability and usefulness for functional studies of the soft tick salivary proteins, that is, detection and identification of a P-selectin-binding protein partially characterized in a previous work.²⁹

■ MATERIALS AND METHODS

Ticks and Tick Material

O. moubata specimens were obtained from our laboratory colony which was established in the mid 1990s from specimens submitted from the Institute for Animal Health, Pirbright, Surrey, UK. Ticks were regularly fed on rabbits and kept in an environmental chamber at 28 °C, 85% relative humidity, and 16/8 h light/dark cycle.¹⁸

Tick salivary glands were dissected from 450 unfed adults (225 males and 225 females) as described elsewhere.⁴³ After dissection, the salivary glands were immediately submerged in RNA later (Ambion, CA) for preventing RNA degradation and stored at –20 °C until RNA isolation.

Total RNA was extracted from the 450 salivary gland pairs using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). Poly A+ mRNA was purified from the total RNA preparation with the Oligotex mRNA Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Poly A+ mRNA quantification and purity were assessed by spectrometry and its integrity and size distribution were checked by denaturing electrophoresis on agarose gel.

Construction and Quality Assessment of the cDNA Entry and Expression Libraries

cDNA entry library was synthesized from 2 µg of purified poly A+ mRNA using the CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and pDONR222 (Invitrogen) as entry vector. Library construction and assessment of its title and quality were done following the protocols provided by manufacturer. For the estimation of the recombinant clone ratio, digestion reactions of 24 randomly selected clones were done using the enzyme BsrGI (New England Biolabs, Beverly, MA).

The cDNA entry library was then transferred by recombination to the destination expression vector pANT7_GST (DNASU plasmid repository, www.dnasu.org), which allows *in situ* expression of GST-tagged proteins in cell-free systems. With that purpose, the cDNA entry library was amplified and its plasmid DNA was purified using the PureLink HiPure Filter Plasmid MiniPrep Kit (Invitrogen) and used in the LR reaction

for library transfer by recombination. The LR reaction was done according to the manufacturer instructions after some optimization (1:1 ratio of donor:destination vectors in 2 μL of LR clonease during 18 h at 25 °C). The title and quality of the resulting cDNA expression library were checked as described before.

After preparing the expression library, we developed NAPPA protein arrays following the protocols provided by Link and Labaer.⁴⁴

DNA Purification and Quantification from the Selected Clones

Four-hundred eighty colonies from the cDNA expression library were selected at random. These colonies were grown for 24 h at 37 °C in several rounds of 1.5 mL/round of Luria–Bertani medium containing 10% potassium phosphate and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, in 96 deep-well plates. The cells were pelleted by centrifugation at 2500 \times g for 20 min and their plasmid DNA was purified using the 96-well Plasmid Miniprep kit (Whatman) and quantified with the Hoechst dye staining (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instruction.

DNA Sample Preparation, Glass Slide Functionalizing and Array Printing

The previously purified DNAs were precipitated by the addition of 0.8 volumes of isopropanol and pelleted by centrifugation at 4000 \times g for 30 min. The precipitated DNAs were then washed with 80% ethanol and allowed to air-dry. A master mix solution was made up by mixing 33.3 mg/mL of bovine serum albumin (BSA) (SIGMA, St. Louis, MO), 2.5 mg/mL of rabbit polyclonal anti-GST antibody (GE, Uppsala, Sweden) and 2 mM Bis-(Sulfosuccinimidyl) suberate (BS3) (Pierce Co., USA). Every precipitated DNA sample were resuspended in 25 μL of this master mix and transferred to a 384-well microtiter plate.

Microscope glass slides (VWR, Germany) were functionalized with aminosilane according to the protocol described by Ramachandran et al by using 3-(2-aminoethylamino) propyl-methylmethoxysilane (Fluka, Steinheim, Germany).³⁷

The 384-well microtiter plates and the aminosilane functionalized slides were loaded in a MicroGrid II robotic microarray spotter (Isogen, The Netherlands), which was configured to use 48 solid pins that produced 150 μm features. Microarrays were printed by pin-spotting the DNA-containing master mix samples (10 nanolitres per sample containing around 6 ng of plasmid DNA/spot) on the aminosilane functionalized glass slides. The relative humidity was maintained at 60% during the printing process and printer was set up to print arrays in 12 rows \times 11 columns. Each clone was printed in four lineal replicas and the whole set of 480 quadruplicated clones was printed in triplicate subarrays per glass slide. After printing, the arrays were stored in an airtight container with silica packets at room temperature (RT) and protected from light.

In situ Protein Expression in NAPPA Approach

The printed arrays were washed with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 for 15 min with gentle agitation followed by a brief washing step with deionized water for 1 min. The array surface was blocked with Superblock PBS (Pierce, Rockford, IL) for 1 h at room temperature (RT) with gentle agitation followed by a 5 min wash with deionized water. The arrays were dried under a stream of filtered compressed air.

The *in vitro* transcription and translation (IVTT) step was performed as previously described. The *in vitro* transcription/translation lysate master mix was prepared with 200 μL of reticulocyte lysate (Promega, Madison, WI) containing 16 μL of TNT buffer, 8 μL of T7 polymerase, 4 μL of -Met, 4 μL of -Leu or -Cys, 8 μL of RNaseOut (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) and 160 μL of DEPC water. Briefly, a HybriWell (Grace Biolabs Inc., OR) gasket was applied to the slides, the mix was added onto a slide through the gasket port, the HybriWell was gently massaged to uniformly spread out the mix on the array. Port seals were applied to both ports on the HybriWell to avoid evaporation. The arrays were incubated for 1.5 h at 30 °C and 30 min at 15 °C for protein expression and capture by the anti-GST polyclonal antibody. After that, the HybriWell was removed and the array was washed three times with PBS for 5 min on a rocking platform.

Analysis of DNA Printing and Protein Expression on the Microarrays

Prior to the functional experiments, some control assays were performed to ensure the quality and reproducibility of DNA printing and protein expression on the arrays (QC experiments).

To check the performance of DNA printing, the slides were blocked with Superblock PBS (Pierce, Rockford, IL) for 1 h on a rocking shaker and the DNA was stained with 150 $\mu\text{L}/\text{slide}$ of 1:600 (v/v) diluted PicoGreen dye (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). The slides were scanned using a ProScanArray HT scanner (Perkin-Elmer) and the resulting images were analyzed and quantified using the GenePix Software version 6.0 (GenePix, USA).

To verify protein expression on the whole array, the slides were incubated with Superblock PBS (Pierce, USA) during 1 h at RT and after that they were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of mouse anti-GST antibody (Cell Signaling Technologies Inc., MA) in Superblock PBS for 1 h at RT. After three washes of 5 min/wash with washing buffer (PBS 5% milk+0.2% tween 20), the slides were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of HRP-linked antimouse IgG (Amersham) for 1 h at RT and washed again three times with PBS (5 min/wash). Signal development was done by incubating with 200 $\mu\text{L}/\text{slide}$ of tyramide signal amplification reagent (Perkin-Elmer) for 10 min at RT. In all incubation steps a coverslip (Lifter slips, Erie) was applied on the slides. Finally, the slides were rinsed with deionized water, dried using compressed air, and scanned. The corresponding array images were analyzed as described before. In parallel, two negative control reactions were performed: in one of them the anti-GST antibody incubation step was omitted and the arrays were incubated with only Superblock PBS. In the other, the T7 polymerase was omitted in the IVTT step.

Assays for Determining the Functionality of the *In situ* Expressed Protein

To check the functionality of the *in situ* expressed proteins from the cDNA tick salivary gland library, two types of analyses were performed. In the first one, the slides were incubated overnight at 4 °C with a 1/500 (v/v) dilution in washing buffer of a rabbit polyclonal serum (anti-Om44) that recognizes a partially characterized salivary antigen, termed Om44, known to act as a P-selecting ligand.²⁹ After that, the slides were rinsed gently 3 times with washing buffer and incubated for 1 h at RT with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of HRP-linked antirabbit IgG (Sigma). In parallel, negative control microarrays were similarly processed in which the rabbit anti-Om44 serum was substituted by the preimmune

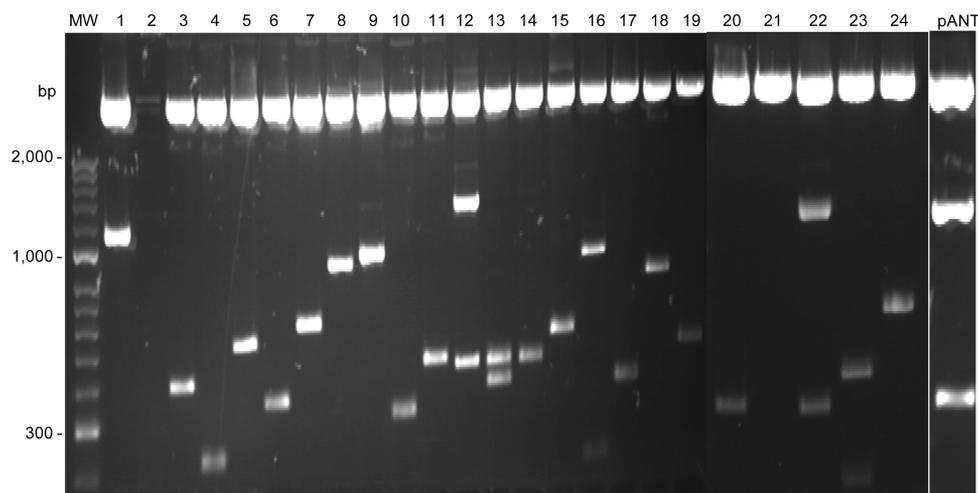


Figure 1. Analysis of the expression library quality by enzymatic digestion. Ethidium bromide stained 1% agarose gel showing BsrGI digestion patterns of plasmid DNAs from 24 randomly selected clones. Up to 20 out of the 24 clones (83%) had an insert (lanes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23 and 24), and all of these inserts were larger than 250 bp. MW, molecular weight standards (numbers in the left side indicate the size in base pairs). pANT is the pANT7_GST expression vector digested with BsrGI showing the three expected bands of 4.2 kbp, 1.2 kbp and 402 bp.

serum of the same rabbit. In the second assay, the slides were probed with a recombinant human P-Selectin/Fc chimera (R&D Systems) in order to detect P-selectin ligands. For this assay, the IVTT step was performed with and without adding 6 μL of canine pancreatic microsomal membranes (CMMs) (Promega) to 135 μL IVTT reactions. The slides were blocked as described before and incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the P-selectin/Fc chimera in superbloc reagent plus either 100 μM CaCl_2^{2+} or 2 mM CaCl_2^{2+} for 1 h at room temperature. After rinsing the slides three times with the washing buffer, they were incubated for 1 h at RT with a 1/6,000 dilution of HRP-linked antihuman IgG (Sigma). Negative control microarrays were similarly processed in which the P-selectin/Fc chimera was substituted by the superbloc reagent only. In assays, signal development and array image acquisition and analysis were done as described above.

Microarray Data Normalization and Processing

Data resulting from the arrays incubated with the secondary antibodies only, and data from arrays incubated with the specific antibodies (anti-GST or anti-Om44) or the P-selectin/Fc chimera but produced without T7 polymerase in the *in* IVTT step were considered as negative.

For the anti-GST reactions, a cutoff value was defined as the mean plus 3 standard deviation (s.d.) of data from the first negative control microarrays (namely, those produced using the complete transcription/translation master mix but incubated without anti-GST antibody). For the anti-Om44 and the P-selectin/Fc chimera reactions, the cutoff value was defined as the mean plus 3 s.d. of data from the microarrays produced using the complete transcription/translation master mix and incubated with the rabbit preimmune serum or the superbloc reagent without the chimera, respectively.

For normalization metrics, characterization of raw array signal data, and regional biases detection, the guidelines of Borrebaeck and Wingren were followed.⁴⁵

In-tube Cell Free Protein Expression Analysis by Western Blot

As will be described in the Results section, the anti-Om44 serum recognized 8 clones in the screening of the arrays, and 5

of these clones could be identified after nucleotide sequencing (namely, ribosomal protein S60, Heat shock protein 90, 7DB protein, Actin and Fosfolipase A2; see Results section). These 5 clones were selected for in-tube cell-free expression and later analysis by Western blot.

Recombinant protein expression was done according to the instructions of the TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, WI). After that, 2 μL of the expression mixtures containing the corresponding GST-tagged recombinant proteins were resolved in polyacrilamide gels and transferred to nitrocellulose sheets. The sheets were sequentially incubated either with the mouse anti-GST and the antimouse IgG antibodies or with the rabbit anti-Om44 and the antirabbit IgG antibodies following standard procedures. The reactions were developed with 4-Chloro-1-naphthol and stopped with distilled water.

Plasmid DNA Sequencing

A set of 20 clones of the expression library (randomly selected) that had been shown to contain an insert (BsrGI digestion positive clones; Figure 1); the 8 clones that were recognized by the anti-Om44 serum in the array screening and the 9 positive clones in the P selectin binding assays were selected for sequencing. For this, plasmid DNAs were purified and their inserts were sequenced in both strands using primers flanking the recombination regions (Forward: 5'-CCCATTGTATGG-GATCTGATC; Reverse: 5'-CCGCAAGCTTGTTCATCAAC-CACTT).

RESULTS AND DISCUSSION

Quality and Representativeness of the Constructed Libraries

The resulting cDNA entry library showed more than 90% of recombinant clones, and more than 90% of them were shown to have inserts larger than 250 bp. The subsequent cDNA expression library had 7.5×10^6 recombinant clones per milliliter; more than 80% of these recombinants had an insert and all these inserts were higher than 250 pb (Figure 1).

These results were inside the range of good quality parameters indicated by the library construction kit manufac-

turer. Therefore, it can be said that both libraries had good quality and all quality parameters were well preserved across the LR reaction.

A total of 37 clones from the expression library were sequenced: A set 20 clones, randomly selected, that were shown to contain inserts in the QC analysis experiments, 8 clones that were recognized by the anti-Om44 serum and 9 clones that bound the P-selectin/Fc chimera.

All of them but two contained different, nonoverlapping, inserts sequences. These sequences were subjected to BLAST analysis at the NCBI database to check whether they were representative of tick salivary proteins. Eighteen clones (48.7%) could be identified and were shown to code for known tick salivary proteins (i.e., salivary lipocalins as TSGP4, antihemostatic factors as moubatin, as well as actin, thioredoxin, phospholipase A2 and several ribosomal proteins), which highlighted the tick origin of the inserts. The remaining sequences (51.3%) did not show a significant similarity to known tick mRNA sequences and could not be properly identified.

This high ratio of nonidentified inserts was not surprising; in fact a similar ratio was also observed in other recently explored tick sialotranscriptomes and sialoproteomes, which have hundreds of different proteins, many of them novel ones, lacking similarities to other proteins in large databases, such as the nonredundant NCBI.^{19,20,22,46} Therefore, it could be assumed that the cDNA expression library had good quality and representativeness and, consequently, we proceeded with the microarray printing.

For a suitable microarray management, we randomly selected 480 colonies (the equivalent to five 96-well microtiter plates) for plasmid purification and DNA printing. We obtained more than 15 μg of plasmid DNA per clone for up to 300 clones, and between 10 and 15 μg of plasmid DNA per clone for the most part of the remaining 180 clones. As will be mentioned later, these DNA amounts resulted of critical importance for adequate efficiency of DNA printing and *in situ* cell-free expression of the encoded proteins on the slides.

Protein Array Printing and Reproducibility

At present, one of the most important challenges for tick biology researchers is to assign a function to the newly detected genes in high-throughput experiments since gene function can be directly inferred from the coding sequences for only a small fraction of those new genes.

The identification of potential protein interactions is a substantial part in the understanding of protein function, and protein microarrays enable direct detection of intermolecular interactions and functional screening of cDNA libraries.^{31,47} Thus, we have applied the next generation of self-assembled NAPPAs array technology for the *in situ* expression of tick salivary gland proteins using a novel chemistry that relies on the surprising (and unexplained) ability of bovine serum albumin (BSA) to dramatically improve cDNA-binding efficiency.³⁷

The key printed substrate for NAPPAs is the purified cDNA, which is simpler to prepare, quantify, print and store in comparison with proteins. BSA and the capture antibody are coupled to the aminosilane-functionalized glass surface via an activated ester-terminated homobifunctional cross-linker. The results of picogreen DNA staining of our arrays detected up to 74% (350 of 480) of the printed plasmids (Figure 2). These plasmids showed picogreen signals higher than mean +3 s.d. of corresponding picogreen signals of the control features

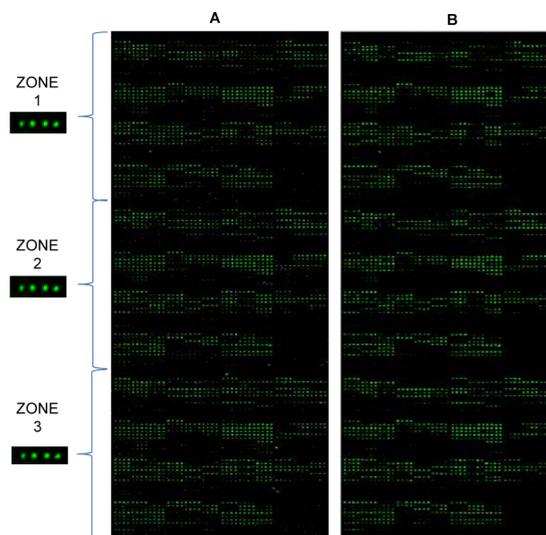


Figure 2. Microarray images showing (A) printed plasmid DNAs after picogreen staining; (B) *In situ*-expressed GST-fused proteins after detection of the GST tag with an anti-GST antibody. Each slide consists of three identical subarrays (zones 1–3). In each subarray, every plasmid has four replicas.

(without DNA). Almost all these positive picogreen signals belonged to clones for which more than 15 μg of plasmid DNA had been obtained (Figure 3) while no picogreen signal was

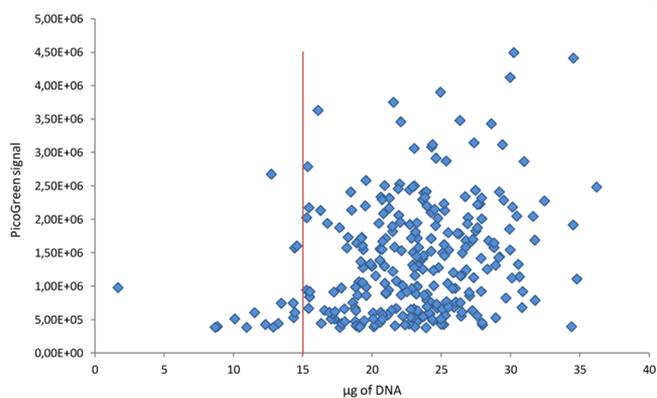


Figure 3. Relation between normalized PicoGreen signal and DNA amount. Most of the clones giving a detectable PicoGreen signal were those that yielded more than 15 μg of plasmid DNA (red vertical line). The PicoGreen signal data were obtained after normalization against the master mix signal.

detected for most clones that yielded less than 10 μg of plasmid DNA, which in turn did not show any *in situ* expressed protein (see below). Although these data seemed to indicate that a minimum of 15 μg of initial plasmid DNA would be needed for efficient printing and protein expression, perhaps the concentration of DNA in the master mix would be a more critical parameter to successfully build self-assembled protein microarrays from an *O. moubata* salivary gland expression library. In that case, the use of lower volumes of master mix solution for DNA resuspension would have likely provided better and more consistent results.

To test for zone effects, we printed the DNA from each clone in quadruplicate, and a whole 480-clone feature was replicated in three different zones of the glass slide containing the array (Figure 2A). Picogreen staining showed a good intra-array

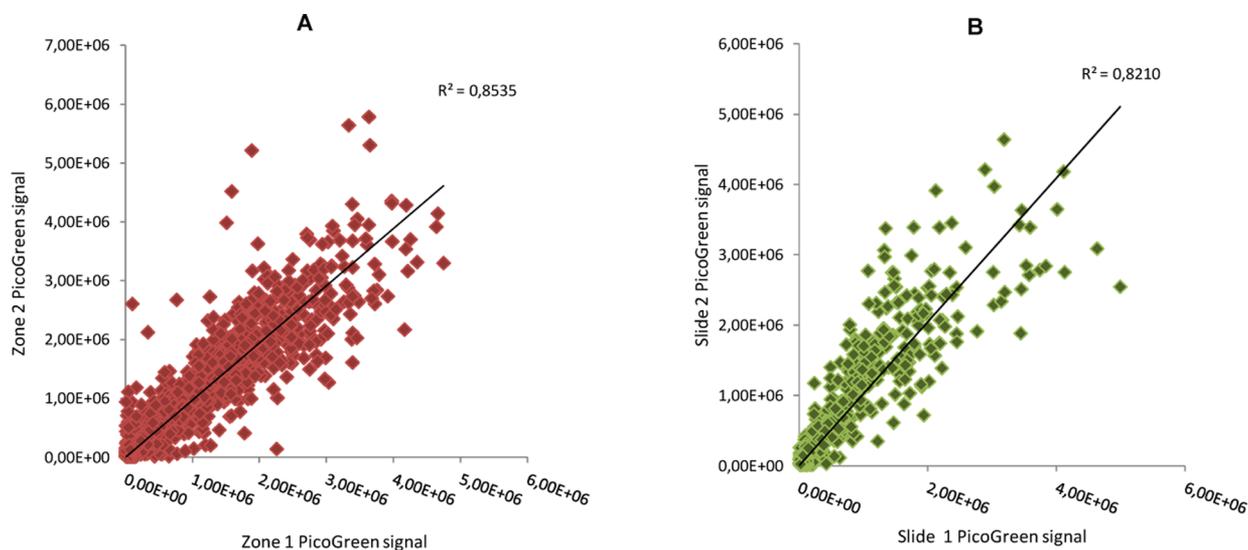


Figure 4. Analysis of DNA printing reproducibility. (A) Intraslide reproducibility: Relation between picogreen signals of the same clones printed on different subarrays inside one single slide. (B) Interslide reproducibility: Relation between picogreen signals of the same clones printed on different arrays.

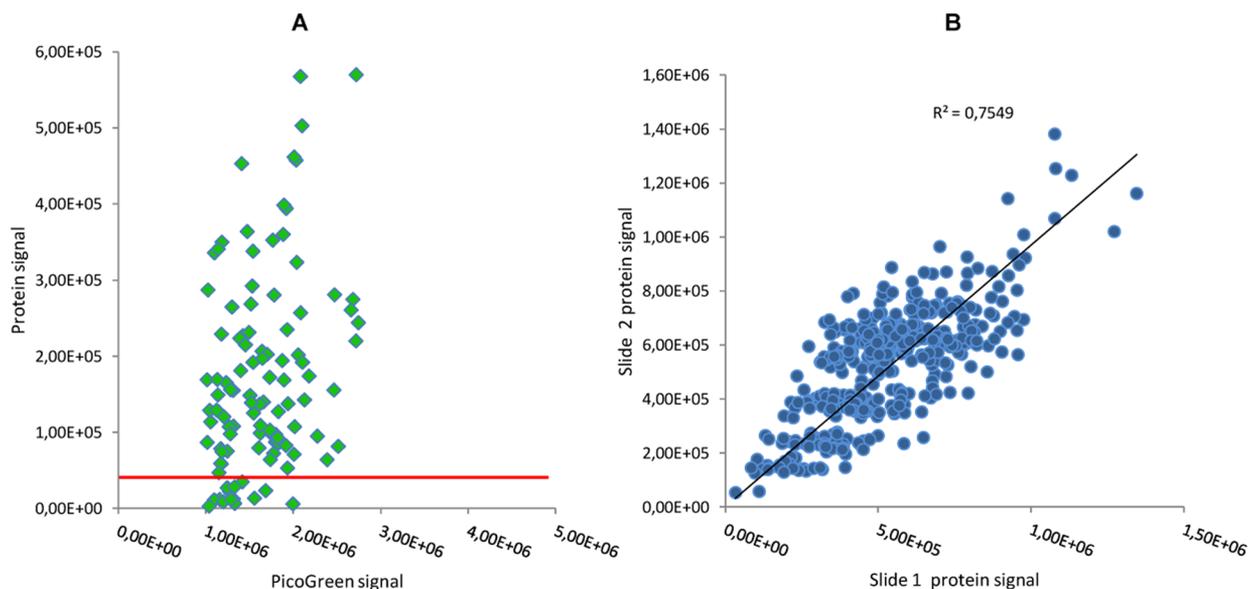


Figure 5. Analysis of the reproducibility of *in situ* protein expression. GST-tagged proteins were revealed with a mouse anti-GST antibody and an antimouse IgG as described in Materials and Methods. (A) Relation between normalized data of protein display and picogreen signal. The cutoff value (mean + 3 s.d. of negative controls) is indicated with a red line. (B) Interslide reproducibility of protein display.

reproducibility ($R^2 = 0.85$; Figure 4A). Interarray variation was checked between different slides of the same printing batch and this analysis showed little variation and high reproducibility as well ($R^2 = 0.82$; Figure 4B). These results guarantee consistent reproducibility in array processing.

Reproducibility of *In situ* Protein Expression

After assessing the quality and reproducibility of the printing process, the arrays were expressed *in situ* in a cell-free expression system and analyzed for protein expression reproducibility. The presence of the fused GST tag was detected using an anti-GST antibody (monoclonal) distinct from that used to capture the nascent protein (polyclonal). In this way, a positive signal (\geq mean + 3 s.d. of negative controls) was detected in more than 70% of the printed clones (Figure 5A). The analysis of reproducibility showed that the generated

protein displays were uniform and reproducible between replicated arrays from different printing batches ($0.90 \geq R^2 \geq 0.5$) (Figure 5B).

Array Screening for Tick Proteins, Antigens and Potential P-Selectin Ligands

After analyzing the correct expression of the recombinant fused GST tag protein, the proper expression of tick proteins was also checked by incubating the arrays with a rabbit polyclonal serum obtained in previous works. This serum, the so-called anti-Om44, recognizes at least two proteins of *O. moubata*, actin and—more importantly—the Om44 salivary protein, which is a P-selectin antagonist ligand whose neutralization with vaccine-induced antibodies blocks tick feeding.²⁹ The anti-Om44 serum clearly recognized a total of eight clones on the arrays (Figure 6). By DNA sequencing, five of these clones were identified.

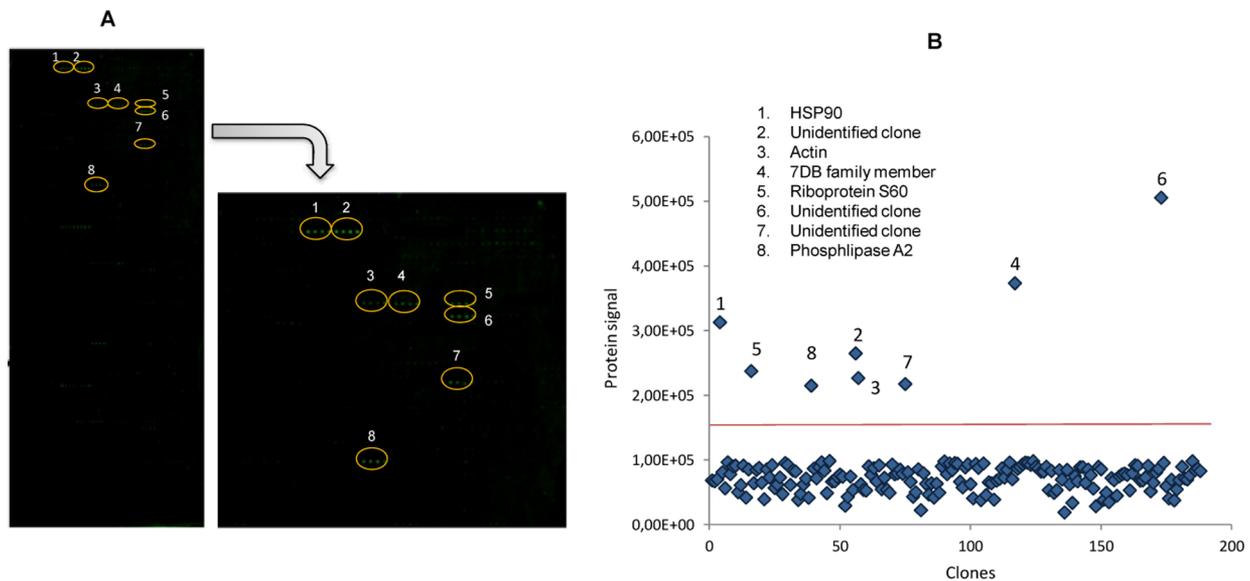


Figure 6. Detection and identification of clones expressing tick salivary proteins recognized by an anti-Om44 rabbit serum. (A) Array images showing the replicate spots (1–8) recognized by the anti-Om44 rabbit serum. (B) Plot showing mean signal of the recognized and nonrecognized spots. Positive spots were clearly above the cutoff value, which was calculated as the mean +3 s.d. the reactivity of the controls.

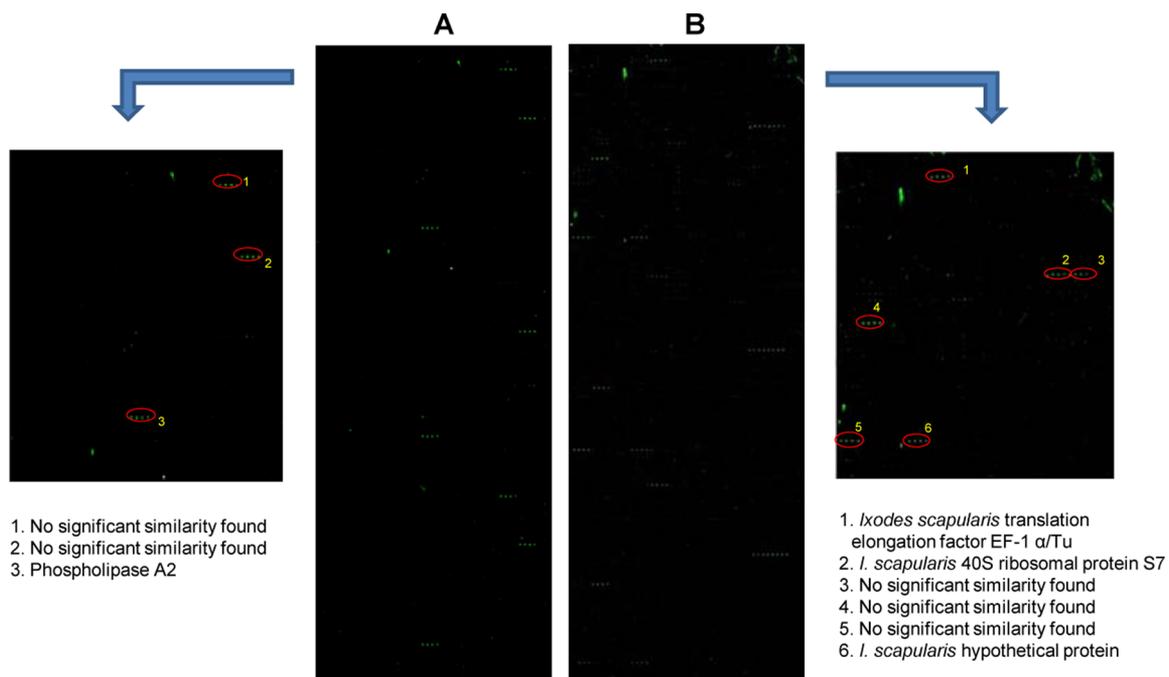


Figure 7. Detection and identification of clones interacting with recombinant human P-Selectin/Fc chimera. (A) Array images showing the replicate spots (1–3) interacting with the P-selectin/Fc chimera after standard IVTT reaction. (B) Array images showing the replicate spots (1–6) interacting with the P-selectin/Fc chimera after IVTT reaction including canine pancreatic microsome membranes.

One was actin, as expected for this serum, and the remaining ones were some interesting tick proteins (phosphlipase A2, 7DB family member, riboprotein S60 L10, and HSP90) that could represent the identity of the Om44 protein and thus could be interacting partners for the host P-selectin.

The set of clones recognized by the anti-Om44 serum were expressed in tube using a cell-free system, and the expression products were screened by Western blotting with the above-mentioned anti-GST antibody and with the anti-Om44 serum. While the anti-GST antibody recognized most of its targets (Supplementary Figure 1A, Supporting Information) the anti-

Om44 did not selectively recognize any of the five proteins (Supplementary Figure 1B).

We attributed the lack of recognition to the denaturing conditions during SDS-PAGE and Western blotting, which could have eliminated key conformational epitopes. This would suggest that the conformation-dependent immunodominant B-cell epitopes of our native proteins would be only expressed as a result of the proper folding of their tertiary and quaternary structures and not in the single subunit molecule, in good agreement with that stated by Ito et al.⁴⁸

These conformational epitopes would have been well preserved in the native conditions of the arrays, as the five recombinants were clearly recognized by the anti-Om44 serum on the arrays. In accordance with this, it has been pointed out that *in situ* protein expression in arrays assembled by NAPPA is actually providing a higher quality protein supply and/or appropriate environment for protein–protein interactions and antibody recognition.⁴⁹

To further assess the functionality of the proteins in the array, we performed protein–protein interaction (PPI) studies with the recombinant P-selectin/Fc chimera. With this aim, the proteins were expressed *in situ* either normally or in the presence of canine pancreatic microsomal membranes (CMMs) and then probed with the P-selectin/Fc chimera. CMMs are known to mediate post-translational processing, such as signal peptide cleavage, membrane insertion, protein folding, translocation and core glycosylation of proteins being also demonstrated that exogenously added CMMs can enhance protein expression.^{50–52} As shown in Figure 7A, three clones were detected in the array when the IVTT step was performed in standard conditions (without CMMs) and the incubation with P-selectin/Fc chimera included low CaCl_2^{2+} concentration ($100 \mu\text{M CaCl}_2^{2+}$). After sequencing them, one of these clones could be identified as a phospholipase A2 (PLA2), in agreement with the anti-Om44 sera recognition. Similar PLA2 have been identified in some soft and hard tick species.⁵³ This suggests that this putative secreted *O. moubata* phospholipase A2 (sPLA2) could be a P-selectin interacting partner and that this interaction would be a kind of glycan-independent, protein–protein interaction. Although P-selectin is known to recognize its ligands mainly through glycan moieties in the ligand, it has been also demonstrated that P-selectin can recognize and bind to peptide moieties through its C-type lectin domain lending support to our results.⁵⁴

PLA2s are major components of many animal venoms and even of tick saliva, showing a variety of relevant pharmacological activities including toxic actions, alterations of the hemostatic system and bactericidal activity.^{55–58} Currently, it has become evident that individual sPLA2s may contribute to various biological events including inflammation, host defense as well as to novel, lipid mediator-independent ways for membrane trafficking and cellular signaling.^{59–61} Regarding the molecules that interact with sPLA2s, a number of membrane receptors and soluble proteins have been described suggesting that some sPLA2s functions may depend on their ligand-like action, independently of their lipolytic enzymatic activity.⁶² The role of sPLA2s in monocyte recruitment and increased expression of surface markers by antigen presenting cells has been suggested to connect innate and adaptive immunity responses, which may represent a novel mechanism of membrane-mediated protein–protein communication.^{63–65} All of these data strongly suggest a new potential role for the *O. moubata* secreted PLA2—as already suggested for other tick sPLA2s—at the host–parasite interface involving P-selectin mediated networks that could have been blocked after immunization with our previously described P-selectin binding molecule.^{29,66}

Since it is well established that P-selectin interacts with endogenous glycopeptide ligands, such as the PSGL-1, through a carbohydrate recognition domain and only in the presence of high (millimolar) calcium concentrations, we expressed replicate slides with CMMs to provide protein glycosylation and then we assessed potential interactions with P-selectin in

the presence of 2 mM calcium for the identification of potential glycoprotein mediated interactions.^{67,68} As shown in the Figure 7B, 6 clearly positive signals were detected, although when sequencing the corresponding clones, we got mainly no similarities to other known sequences or identifications of proteins *a priori* not related to the P-selectin network. Although these results need fine validation, they suggest that *O. moubata* saliva may contain novel glycoproteins acting as potential P-selectin ligands. Since P-selectin mediates the initial contact of leukocytes to the vascular endothelium through selectin–ligand interactions, the potential involvement of PLA2/P-selectin interactions, and the identification and characterization of other potential tick derived molecules that regulate leukocyte adhesion and rolling need further research. Moreover, proving their functional involvement on this particular biological event would be very interesting since it has been suggested as a key regulatory mechanism that imply raft selectin ligands expressed in membrane domains is required for optimal binding and regulation of leukocyte rolling.⁶⁹

Overall, these results evidenced that *in situ* expression in NAPPA provided properly expressed GST-tagged proteins for the majority of the clones lending support to the reliability of these arrays for analyzing the interactions and functions of most cloned proteins. Using this experimental approach, we have constructed a high-throughput tool for the simultaneous expression and analysis of a great number of soft tick salivary proteins, which can be used for detecting antigens, interacting partners, etc. This approach would limit the range of potential interactions, although it may result in a significant number of false positives that will require further specific validation on a protein-by-protein basis.⁷⁰

In parasite proteomes, there is an important scientific need for identifying key ligands of host receptors that can be used as targets for parasite control. Therefore, exploring protein–protein interactions between parasites and hosts will significantly expand the number of parasite molecules that can be used as new targets for parasite therapy and control.⁷¹ In this work, the designed methodological strategy has produced a tool that could be applied for the discovery of novel interactions between soft tick salivary proteins and host molecules. Screening these arrays for tick diagnostic or protective epitopes, tick antihemostatics, immunosuppressive agents or protein interaction domains might provide new knowledge on the biology of the tick–host relationship and help in the development of new strategies for tick surveillance and control.

■ CONCLUSIONS

A great deal of biological processes occurs through the interaction of proteins. Therefore, protein interactions between parasites, that is, ticks, and their hosts can be considered as ideal targets to be blocked for the development of new strategies for parasite control. Identifying protein interacting partners is a substantial part in the understanding of their function, and protein microarrays allow detection of intermolecular interactions and functional screening of cDNA libraries.

Here we report an application of gateway and NAPPA technologies for the construction of a protein array tool that could allow the discovery of protein interactions between the soft tick salivary proteins and their target molecules in the host, leading to a better knowledge of the tick–host immunobiology and, eventually, to the development of new strategies for tick control.

We have constructed a cDNA expression library from the *O. moubata* salivary glands that is expected to include an important repertoire of tick antihemostatic and immune-modulator agents. We have randomly chosen 480 library clones from that library and constructed protein microarrays. For a representative number of clones in the arrays, we have verified the full-length coding sequence of their inserts, confirmed their tick origin and validated *in situ* cell-free protein expression. Moreover, we have confirmed the identity and immunogenicity of some of the expressed tick proteins as well as their likely interaction with host proteins. The recognizing of the phospholipase A2 by the anti-Om44 serum and the P-selectin/Fc chimera suggests that it might be the identity of the Om44 protein, representing a potential new ligand for P-selectin.

In summary, we presented a reliable and reproducible method for producing protein microarrays from tick cDNA expression libraries, while identified and commented some key points to be improved, such as minimal DNA concentration for printing. The method was able to display a broad variety of proteins from the *O. moubata* salivary glands, demonstrating the feasibility of NAPPA for screening tick proteins and eventually identifying tick proteins and their interacting partners.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Supplementary Figure 1. Western blot of the GST tagged proteins expressed in tube using a cell free system. The *O. moubata* phospholipase A2 (PLA2), riboprotein S60 L10 (RB.S60), 7DB family member (7DB), heat shock protein 90 (HSP90) and actin were expressed in tube and analyzed by Western blotting with the mouse anti-GST (A) and the rabbit anti-Om44 (B) sera. rSbGST and rOmActin are recombinant GST and actin proteins from *Schistosoma bovis* and *Ornithodoros moubata*, respectively, which were obtained in previous works. These recombinants were included (1 μ g/lane) as positive controls in the respective Western blotting analysis. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Centro de Investigación del Cáncer Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca-CSIC Avda, Coimbra s/n 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34923294811. Fax: +34923294743. E-mail: mfuentes@usal.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the financial support provided by several Spanish Institutions: the Spanish Ministry of Science and Innovation (project AGL2010-18164), the Instituto de Salud Carlos III of Spain (ISCIII, project FIS PI081884) and the Regional Government of Castilla y León (projects CSI062A11-2 and JCYL-SAN10). R.M.-R. is funded by the JAEDoc program (CSIC-FSE); V.D.-M. is a recipient of a JAE PhD fellowship and M.G.-G. is supported by a PhD scholarship of ISCIII FI08/00721.

■ REFERENCES

- (1) Parola, P.; Raoult, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *32* (6), 897–928.
- (2) Jongejan, F.; Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* **2004**, *129* (Suppl), S3–14.
- (3) de la Fuente, J.; Estrada-Pena, A.; Venzal, J. M.; Kocan, K. M.; Sonenshine, D. E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 6938–46.
- (4) Manzano-Román R.; Díaz-Martín V.; de la Fuente J.; Pérez-Sánchez R. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. *Parasitology*; **2012**; InTech, Ed.; <http://www.intechopen.com/books/parasitology/soft-ticks-as-pathogen-vectors-distribution-surveillance-and-control>.
- (5) Juncadella, I. J.; Anguita, J. The immunosuppressive tick salivary protein, Salp15. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *666*, 121–31.
- (6) Maritz-Olivier, C.; Stutzer, C.; Jongejan, F.; Neitz, A. W.; Gaspar, A. R. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* **2007**, *23* (9), 397–407.
- (7) Francischetti, I. M.; Sa-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 2051–88.
- (8) Francischetti, I. M. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon* **2010**, *56* (7), 1130–44.
- (9) Anisuzzaman; Islam, M. K.; Alim, M. A.; Miyoshi, T.; Hatta, T.; Yamaji, K.; Matsumoto, Y.; Fujisaki, K.; Tsuji, N. Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (3), e1001312.
- (10) Nuttall, P. A. Molecular characterization of tick-virus interactions. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 2466–83.
- (11) Ueti, M. W.; Knowles, D. P.; Davitt, C. M.; Scoles, G. A.; Baszler, T. V.; Palmer, G. H. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* **2009**, *77* (1), 70–5.
- (12) Nuttall, P. A.; Trimmell, A. R.; Kazimirova, M.; Labuda, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* **2006**, *28* (4), 155–63.
- (13) Ribeiro, J. M.; Alarcon-Chaidez, F.; Francischetti, I. M.; Mans, B. J.; Mather, T. N.; Valenzuela, J. G.; Wikel, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *36* (2), 111–29.
- (14) Titus, R. G.; Bishop, J. V.; Mejia, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* **2006**, *28* (4), 131–41.
- (15) Hovius, J. W.; Levi, M.; Fikrig, E. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med.* **2008**, *5* (2), e43.
- (16) Willadsen, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.* **2008**, *24* (4), 164–7.
- (17) Ribeiro, J. M.; Anderson, J. M.; Manoukis, N. C.; Meng, Z.; Francischetti, I. M. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 136.
- (18) Oleaga, A.; Escudero-Población, A.; Camafeita, E.; Pérez-Sánchez, R. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *37* (11), 1149–59.
- (19) Francischetti, I. M.; Mans, B. J.; Meng, Z.; Gudderra, N.; Veenstra, T. D.; Pham, V. M.; Ribeiro, J. M. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (1), 1–21.
- (20) Francischetti, I. M.; Meng, Z.; Mans, B. J.; Gudderra, N.; Hall, M.; Veenstra, T. D.; Pham, V. M.; Kotsyfakis, M.; Ribeiro, J. M. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *J. Proteomics* **2008**, *71* (5), 493–512.
- (21) Mans, B. J.; Andersen, J. F.; Francischetti, I. M.; Valenzuela, J. G.; Schwan, T. G.; Pham, V. M.; Garfield, M. K.; Hammer, C. H.;

Ribeiro, J. M. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (1), 42–58.

(22) Francischetti, I. M.; Sa-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 2051–88.

(23) Anatriello, E.; Ribeiro, J. M.; de Miranda-Santos, I. K.; Brandão, L. G.; Anderson, J. M.; Valenzuela, J. G.; Maruyama, S. R.; Silva, J. S.; Ferreira, B. R. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 450.

(24) Rego, R. O.; Kovár, V.; Kopáček, P.; Weise, C.; Man, P.; Sauman, I.; Grubhoffer, L. The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *36* (4), 291–9.

(25) Islam, M. K.; Tsuji, N.; Miyoshi, T.; Alim, M. A.; Huang, X.; Hatta, T.; Fujisaki, K. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog.* **2009**, *5* (7), e1000497.

(26) Vial, L. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* **2009**, *16* (3), 191–202.

(27) Cutler, S. J.; Abdissa, A.; Trape, J.-F. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15* (5), 400–6.

(28) Sánchez-Vizcaino, J. M.; Mur, L.; Martínez-López, B. African swine fever: an epidemiological update. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x.

(29) García-Varas, S.; Manzano-Román, R.; Fernández-Soto, P.; Encinas-Grandes, A.; Oleaga, A.; Pérez-Sánchez, R. Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int. J. Parasitol.* **2010**, *40* (3), 313–26.

(30) Miersch S.; LaBaer J. Nucleic Acid programmable protein arrays: versatile tools for array-based functional protein studies. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2011**, Chapter 27, Unit 27.2.

(31) Weiner, H.; Faupel, T.; Büsow, K. Protein arrays from cDNA expression libraries. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *264*, 1–13.

(32) Stoevesandt, O.; Taussig, M. J.; He, M. Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **2009**, *6* (2), 145–57.

(33) Matarraz, S.; González-González, M.; Jara, M.; Orfao, A.; Fuentes, M. New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery. *Clin. Transl. Oncol.* **2011**, *13* (3), 156–61.

(34) de la Fuente, J.; Manzano-Roman, R.; Naranjo, V.; Kocan, K. M.; Zivkovic, Z.; Blouin, E. F.; Canales, M.; Almazán, C.; Galindo, R. C.; Step, D. L.; Villar, M. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* **2010**, *28* (7), 1786–95.

(35) He, M.; Taussig, M. J. Rapid discovery of protein interactions by cell-free protein technologies. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 5), 962–5.

(36) He, M.; Wang, M. W. Arraying proteins by cell-free synthesis. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (4), 375–80.

(37) Ramachandran, N.; Raphael, J. V.; Hainsworth, E.; Demirkan, G.; Fuentes, M. G.; Rolfs, A.; Hu, Y.; LaBaer, J. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat. Methods* **2008**, *5* (6), 535–8.

(38) Link, A. J.; Labaer, J. Using the Nucleic Acid Programmable Protein Array (NAPPA) for identifying protein-protein interactions: general guidelines. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2008**, DOI: 10.1101/pdb.ip62.

(39) He, M.; Stoevesandt, O.; Taussig, M. J. In situ synthesis of protein arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19* (1), 4–9.

(40) He, M.; Taussig, M. J. Rapid discovery of protein interactions by cell-free protein technologies. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 5), 962–5.

(41) Katz, C.; Levy-Beladev, L.; Rotem-Bamberger, S.; Rito, T.; Rüdiger, S. G.; Friedler, A. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2131–45.

(42) Sibani, S.; LaBaer, J. Immunoprofiling using NAPPA protein microarrays. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *723*, 149–61.

(43) Oleaga-Pérez, A.; Pérez-Sánchez, R.; Astigarraga, A.; Encinas-Grandes, A. Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Vet. Parasitol.* **1994**, *52* (1–2), 97–111.

(44) Link, A. J.; Labaer, J. Construction of Nucleic Acid Programmable Protein Arrays (NAPPA) 1–5: coating glass slides with amino silane. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2008**, DOI: 10.1101/pdb.prot5056.

(45) Borrebaeck, C. A.; Wingren, C. Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *J. Proteomics* **2009**, *72* (6), 928–35.

(46) Francischetti, I. M.; Calvo, E.; Andersen, J. F.; Pham, V. M.; Favreau, A. J.; Barbian, K. D.; Romero, A.; Valenzuela, J. G.; Ribeiro, J. M. Insight into the Sialome of the Bed Bug, *Cimex lectularius*. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (8), 3820–31.

(47) Guan, H.; Kiss-Toth, E. Advanced technologies for studies on protein interactomes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2008**, *110*, 1–24.

(48) Ito, H. O.; Nakashima, T.; So, T.; Hirata, M.; Inoue, M. Immunodominance of conformation-dependent B-cell epitopes of protein antigens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308* (4), 770–6.

(49) Nand, A.; Gautam, A.; Pérez, J. B.; Merino, A.; Zhu, J. Emerging technology of in situ cell free expression protein microarrays. *Protein Cell* **2012**, *3* (2), 84–8.

(50) Walter, P.; Blobel, G. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol.* **1983**, *96*, 84–93.

(51) Svitkin, Y. V.; Pause, A.; Lopez-Lastra, M.; Perreault, S.; Sonenberg, N. Complete translation of the hepatitis C virus genome in vitro: membranes play a critical role in the maturation of all virus proteins except for NS3. *J. Virol.* **2005**, *79* (11), 6868–81.

(52) Zahedi, R. P.; Völzing, C.; Schmitt, A.; Frien, M.; Jung, M.; Dudek, J.; Wortelkamp, S.; Sickmann, A.; Zimmermann, R. Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* **2009**, *9* (13), 3463–73.

(53) Francischetti, I. M.; Sa-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 2051–88.

(54) Molenaar, T. J.; Appeldoorn, C. C.; de Haas, S. A.; Michon, I. N.; Bonnefoy, A.; Hoylaerts, M. F.; Pannekoek, H.; van Berkel, T. J.; Kuiper, J.; Biessen, E. A. Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists. *Blood* **2002**, *100* (10), 3570–7.

(55) Sajevec, T.; Leonardi, A.; Križaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* **2011**, *57* (5), 627–45.

(56) Zhu, K.; Dillwith, J. W.; Bowman, A. S.; Sauer, J. R. Identification of hemolytic activity in saliva of the lone star tick (Acari:Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **1997**, *34* (2), 160–6.

(57) Zeidner, N.; Ullmann, A.; Sackal, C.; Dolan, M.; Dietrich, G.; Piesman, J.; Champagne, D. A borreliacidal factor in *Amblyomma americanum* saliva is associated with phospholipase A2 activity. *Exp. Parasitol.* **2009**, *121* (4), 370–5.

(58) Samy, R. P.; Gopalakrishnakone, P.; Stiles, B. G.; Girish, K. S.; Swamy, S. N.; Hemshekhar, M.; Tan, K. S.; Rowan, E. G.; Sethi, G.; Chow, V. T. Snake venom phospholipases A2: a novel tool against bacterial diseases. *Curr. Med. Chem.* **2012**, No. 22963667.

(59) Balsinde, J. Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal.* **2005**, *17* (9), 1052–62.

(60) Murakami, M.; Taketomi, Y.; Sato, H.; Yamamoto, K. Secreted phospholipase A2 revisited. *J. Biochem.* **2011**, *150* (3), 233–55.

(61) Murakami, M.; Lambeau, G. Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: An update. *Biochimie* **2012**, DOI: 10.1016/j.biochi.2012.09.007.

(62) Lambeau, G.; Gelb, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 495–520.

(63) Meyer, M. C.; Creer, M. H.; McHowat, J. Potential role for mast cell tryptase in recruitment of inflammatory cells to endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2005**, *289* (6), C1485–91.

(64) Ibeas, E.; Fuentes, L.; Martín, R.; Hernández, M.; Nieto, M. L. Secreted phospholipase A2 type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81* (1), 54–63.

(65) Charalambous, K.; Booth, P. J.; Woscholski, R.; Seddon, J. M.; Templer, R. H.; Law, R. V.; Barter, L. M.; Ces, O. Engineering de novo membrane-mediated protein-protein communication networks. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (13), 5746–9.

(66) Bowman, A. S.; Gengler, C. L.; Surdick, M. R.; Zhu, K.; Essenberg, R. C.; Sauer, J. R.; Dillwith, J. W. A novel phospholipase A2 activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Exp. Parasitol.* **1997**, *87* (2), 121–32.

(67) Martinez, M.; Joffraud, M.; Giraud, S.; Baisse, B.; Bernimoulin, M. P.; Schapira, M.; Spertini, O. Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyl-transferase-IV and -VII. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (7), 5378–90.

(68) Leppänen, A.; Cummings, R. D. Fluorescence-based solid-phase assays to study glycan-binding protein interactions with glycoconjugates. *Methods Enzymol.* **2010**, *478*, 241–64.

(69) Abbal, C.; Lambelet, M.; Bertaggia, D.; Gerbex, C.; Martinez, M.; Arcaro, A.; Schapira, M.; Spertini, O. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood* **2006**, *108* (10), 3352–9.

(70) Marina, O.; Duke-Cohan, J. S.; Wu, C. J. A coprecipitation-based validation methodology for interactions identified using protein microarrays. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *723*, 239–54.

(71) Taylor, C. M.; Fischer, K.; Abubucker, S.; Wang, Z.; Martin, J.; Jiang, D.; Magliano, M.; Rosso, M. N.; Li, B. W.; Fischer, P. U.; Mitreva, M. Targeting protein-protein interactions for parasite control. *PLoS One* **2011**, *6* (4), e18381.

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 026**

21 Número de solicitud: 201030847

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.06.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.10.2012

Fecha de la concesión:

06.08.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.08.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
C/ SERRANO, 117
28006 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PÉREZ SÁNCHEZ, Ricardo;
OLEAGA PÉREZ, Ana;
SILES LUCAS, Mar;
DÍAZ MARTÍN, Verónica y
MANZANO ROMÁN, Raúl**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **ANTÍGENO RECOMBINANTE DE LA GARRAPATA ORNITHODOROS MOUBATA.**

57 Resumen:

Antígeno recombinante de la garrapata Ornithodoros moubata.

La presente invención se refiere a unas secuencias aminoacídicas útiles para la detección de Ornithodoros moubata, al método de detección de O. moubata en muestras biológicas utilizando como proteína de detección las secuencias aminoacídicas de la presente invención, a un kit para llevar a cabo dicho método y, finalmente, a un kit para la producción de las secuencias aminoacídicas de forma recombinante.

ES 2 388 026 B1

Nº SOLICITUD 201030847

Nº PUBLICACIÓN ES2388026

TITULAR/ES

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

FECHA EXPEDICIÓN 18/12/2013

CERTIFICADO-TÍTULO DE PATENTE DE INVENCION

Cumplidos los requisitos previstos en la vigente Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes, se expide el presente CERTIFICADO-TÍTULO, acreditativo de la concesión de la Patente de Invención. Ha sido tramitada y concedida con realización del Informe sobre el Estado de la Técnica y **sin examen previo** de los requisitos sustantivos de patentabilidad.

Se otorga al titular un derecho de exclusiva en todo el territorio nacional, bajo las condiciones y con las limitaciones previstas en la Ley de Patentes. La duración de la patente será de **veinte años** contados a partir del 02/06/2010.

La patente se concede sin perjuicio de tercero y sin garantía del Estado en cuanto a la validez y a la utilidad del objeto sobre el que recae.

Para mantener en vigor la patente concedida, deberán abonarse las tasas anuales establecidas, que se pagarán por años adelantados. Asimismo, deberá explotarse el objeto de la invención, bien por su titular o por medio de persona autorizada de acuerdo con el sistema de licencias previsto legalmente, dentro del plazo de cuatro años a partir de la fecha de solicitud de la patente, o de tres años desde la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial.



Fdo.: Ana María Redondo Mínguez

El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica P.D. El Jefe de Servicio de Actuaciones Administrativas

