

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE Bm05br DE LA
GARRAPATA *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* Y SU
POTENCIAL USO PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS

MARÍA FERNANDA ALZUGARAY GASTELLÚ

Montevideo

2017

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE Bm05br DE LA
GARRAPATA *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*
Y SU POTENCIAL USO PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS**

TESIS DE DOCTORADO

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Jr.

Co-orientador: Uruguaysito Benavides

Montevideo, 31 de marzo de 2017

INSTITUCIONES Y FUENTES FINANCIADORAS

Instituciones:

Universidad de la Republica (UdelaR), Facultad de Ciencias,

Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay.

Universidad de la Republica (UdelaR), Facultad de Veterinaria,

Alberto Lasplaces 1550, 11600, Montevideo, Uruguay.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Biotecnología,

Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brasil.

Fuentes financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasil.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay.

Posgrado de Biotecnología, Facultad de Ciencias (UdelaR).

Aprendizaje

*Aquí y allá aprendemos cautamente
en el río / en la noche / en la fatiga
a vivir glorias o a morir de pena
en el rumbo mejor o a la deriva*

*no está mal ser humilde por las dudas
y dejar el fulgor para otro día
(en un comienzo el corazón callaba
sólo después supimos que latía)*

*aprender es un rito una costumbre
no le hace mal a nadie ni se olvida
aprende quien asciende hasta la cresta
pero también quien busca entre las ruinas*

*aprender es abrirse a los afanes
y ¿por qué no? también a la utopía
la enseñanza es enjambre y sus gaviotas
se posan en el alma sorprendida*

*sabemos que aprender tiene su riesgo
y puede convertirnos en ceniza
pero no importa / hay que aventurarse ..*

*.. hay que saber del tiempo / hora por hora
porque vivir no es una lotería
dame esa mano que me enseña siempre
y vayámonos juntos por la vida*

(Mario Benedetti)

*Esta tesis está dedicada a mi madre,
amor entre madre e hijos: honesto y eterno..*

AGRADECIMIENTOS

- A mi orientador, Prof. Itabajara da Silva Vaz Jr., por las enseñanzas transmitidas durante todos estos años y por la inmensa oportunidad de trabajar tanto en su laboratorio como en su grupo de investigación. Muy especialmente agradezco la confianza brindada en todo momento, la cual es, sin lugar a dudas, responsable de este desenlace:

Muito Obrigada Ita!

- A mi co-orientador Prof. Uruguaysito Benavides Peralta, por el acompañamiento y la gran oportunidad de participar del grupo de investigación que forman con el Prof. da Silva Vaz. Sin dicho apoyo, no hubiera sido posible realizar los presentes trabajos (INIA, CAPES/Udelar, DICYT/CNPq, ANII).
- A los Dres. Adriana Seixas y Luis Fernando Parizi por el compañerismo, la orientación permanente y la muy valiosa contribución en la ejecución de los diversos trabajos.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología Aplicada y Sanidad Animal del Centro de Biotecnología de la UFRGS, por las muchas veces que auxiliaron en la realización de los trabajos.
- A la Dra. Jacqueline Maisonnave, y en su nombre a todos los integrantes del Área de Ciencias Microbiológicas de la Udelar, gracias por la gran colaboración.
- A los miembros de la mesa examinadora.
- A los integrantes de la Unidad de Biología Parasitaria del Instituto de Higiene de Udelar, en especial a la Dra. Patricia Berasain por su ayuda y colaboración.
- A los colegas de otros laboratorios del Centro de Biotecnología de la UFRGS.
- A la Universidad de la Republica Oriental del Uruguay y sus órganos de formación.

- A las agencias: CAPES y ANII, sin su gran apoyo no hubiera sido posible que me dedicar plenamente a estos trabajos.
- A la Facultad de Ciencias y en especial a su posgrado en Biotecnología, por haberme brindado la posibilidad de formarme junto a ellos y por sus incontables auxilios.
- A mi familia, por los innumerables consejos, la enorme comprensión, la confianza, y el apoyo incondicional en todo momento.
- A los amigos de divisas partes conocidos durante estos años vividos en Porto Alegre, muchas gracias por el sin fin de consejos y apoyo indispensable: Muito Obrigada queridos!
- A los amigos de ayer, hoy y siempre, por su apoyo y confianza en todo momento.

Muchas gracias a todos ..

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURAS:

1. Distribución mundial de la garrapatas <i>R. microplus</i>	19
2. Localización mundial de la garrapata <i>R. microplus</i>	20
3. Mapa de Uruguay mostrando las zonas epidemiológicas de garrapatas <i>R. microplus</i>	20
4. Esquema simplificado del ciclo de vida de la garrapata <i>R. microplus</i>	23
5. La vía de RNAi	27
6. Esquema de PCR con el promotor T7 añadido a ambos primers de PCR	67
7. Flujograma de protocolo de RNAi seguido con alimentación artificial por capilares	69
8. Flujograma de protocolo de alimentación artificial de anticuerpos anti Bm05br	70
9. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducibles de Bm05br y otras secuencias similares de garrapatas	75
10. Árbol filogenético de <i>Rhipicephalus microplus</i> Bm05br y otras secuencias seleccionadas	76
11. Perfil de expresión génica de Bm05br de <i>Rhipicephalus microplus</i> en diferentes tejidos y estadios de garrapatas	77
12. Presencia de Bm05br nativa en tejidos <i>Rhipicephalus microplus</i>	79
13. Representación esquemática de los estadios de ovogenesis en una garrapata <i>R. microplus</i>	80
14. Inmunohistoquímica de garrapatas teleógenas y partenógenas de <i>R. microplus</i>	82
15. Inmunohistoquímica de garrapatas teleógenas y partenógenas de diferentes pesos de <i>R. microplus</i>	83
16. Silenciamiento de Bm05br mediante RNAi en ovarios de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i>	85
17. Efecto del silenciamiento de Bm05br por RNAi en parámetros asociados con la alimentación y ovoposición en garrapatas partenógenas de <i>Rhipicephalus microplus</i> ...	87
18. Parámetros asociados con el proceso de la ovoposición de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> parcialmente alimentadas por alimentación artificial a través de capilares	89
19. Niveles de anticuerpos en los sueros de bovinos con antígeno anti-Bm05br de <i>R. microplus</i> , medidos por ELISA	90
20. Western blot con rBm05br, usando una dilución de suero de 1/500	91

21. Dinámica del número de garrapatas totalmente ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> recuperadas en bovinos del grupo inmunizado con rBm05br y Bm86uy y el grupo control	92
22. S1: Expresión de Bm05br nativa en tejidos de <i>R. microplus</i> analizados por western blot con suero pre inmune (1/1000)	101

LISTA DE CUADROS

Página

CUADROS:

1. Muestras, tejidos y experimentos donde fueron utilizados	53
2. S2 Datos de experimentos de qRT-PCR	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y UNIDADES

°C	grados centígrados
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
DNAc	copia de ácido desoxi-ribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
ATP	trifosfato de adenosina
BCA	Acido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
Bm05br	proteína <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> 05 obtenida de aislamiento Brasil.
BmGI	Índice génico de <i>Boophilus microplus</i>
dATP	trifosfato de desoxi-adenosina
DEPC	diethylpyrocarbonato
Da	dalton
DO	densidad óptica
DTT	dithiothreitol
EDTA	etilen diamino tetra acetato disódico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
g	gramo
GST	Glutatona-S-transferasa
Hq05	<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> 05
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	<i>isopropylthio-β-D-galactopiranosido</i>
LB	Luria Bertani
l	litro

min	minuto
MGAP	Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay
MW	Masa molecular
NBT	Tetrazólio nitroazul
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino conteniendo Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rBm05	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> 05 recombinante
rHq05	<i>Haemaphysalis qinghaiensis</i> 05 recombinante
RNAi	Interferencia del ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa con transcripción reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
SOB	Medio de cultivo bacteriano " <i>Super Optimal Broth</i> "

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INSTITUCIONES Y FUENTES FINANCIADORAS	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y UNIDADES	10
RESUMEN	16
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	18
1.1. Biología de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
1.1.1. Distribución geográfica	19
1.1.2. Impacto económico de la garrapata bovina	21
1.1.3. Ciclo de vida	21
1.2. Historia y breve introducción sobre RNAi	23
1.2.1. RNA de interferencia en garrapatas	28
1.2.2. Métodos de delivery de dsRNA en garrapatas y células de garrapatas	28
1.3. Técnicas de alimentación artificial de garrapatas	30
1.3.1. Alimentación artificial por medio de tubos capilares	30
1.3.2. Otras sistemas de alimentación artificial	32
1.3.2.1. Alimentación artificial por medio de membranas naturales	32
1.3.2.2. Alimentación artificial por medio de membranas artificiales	33
1.4. Control de garrapatas	35
1.4.1. Acaricidas	35
1.4.2. Otros métodos de control	37
1.4.3. Control inmunológico	37
1.4.3.1. Desarrollo y experiencia con vacunas basada en el antígeno Bm86: TickGARD y Gavac	38
1.4.3.2. Búsqueda de antígenos homólogos a Bm86	40
1.4.3.3. Hq05 y sus homólogos	42

1.4.3.4.	Búsqueda de otros antígenos vacunales	45
2.	JUSTIFICATIVA	48
3.	OBJETIVO GENERAL	49
3.1.	Objetivos particulares	49
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.1.	Muestras utilizadas	50
4.1.1.	Garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa Porto Alegre	50
4.1.2.	Garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa Mozo	50
4.1.3.	Garrapatas <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato	50
4.1.4.	Disección de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> y <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato y obtención de otros tejidos	51
4.2.	Clonado de la secuencia codificante para la proteína Bm05uy y Rs05br en un vector de expresión procariota	54
4.2.1.	Extracción de RNA	54
4.2.2.	Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA	54
4.2.3.	Tratamiento con DNAsas	55
4.2.4.	Transcripción reversa	55
4.2.5.	Amplificación por PCR cualitativo	56
4.2.6.	Ligación de los productos de PCR con el vector de pGEM-T	57
4.2.7.	Transformación de la cepa <i>E. coli</i> TOP10 por choque térmico	57
4.2.8.	Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (Mini-prep)	58
4.2.9.	Digestiones con enzimas de restricción <i>Eco</i> RI y <i>Hind</i> III	59
4.2.10.	Secuenciación de DNA	59
4.3.	Caracterización <i>in silico</i> de las propiedades de las secuencias de Bm05br, Bm05uy y Rs05br	60
4.3.1.	Alineamiento de secuencias	60
4.3.2.	Construcción de Árbol filogenético	60
4.4.	Análisis de expresión de Bm05br por PCR cuantitativo	60
4.4.1.	Materiales utilizados	60

4.4.2.	Diseño de los primers	61
4.4.3.	Curva estándar y cálculo de eficacia de amplificación	61
4.4.4.	Cuantificación mediante qPCR del nivel de expresión de las muestras	62
4.4.5.	Análisis de los resultados de la expresión de las muestras	63
4.5.	Inmunolocalización de Bm05br	64
4.5.1.	Expresión de rBm05br y producción de suero anti Bm05br	64
4.5.2.	Material utilizado	65
4.5.3.	Extracción y preparación de extracto proteico	65
4.5.4.	SDS page y western blot	65
4.5.5.	Inmunohistoquímica	66
4.6.	Silenciamiento génico de Bm05br por RNAi	67
4.6.1.	Diseño de los primers y estrategias para la transcripción del dsRNA	67
4.6.2.	Material utilizado	68
4.6.3.	Protocolo de RNAi utilizando alimentación artificial por capilares	69
4.7.	Determinación de la capacidad protectora de la rBm05br mediante	70
4.7.1.	Ensayos de alimentación artificial por capilares	70
4.7.2.	Ensayos de inmunización de bovinos en boxes	71
4.7.2.1.	Análisis serológicos y análisis de garrapatas	72
4.8.	Análisis estadísticos	73
5.	RESULTADOS	74
5.1.	Análisis de las secuencias de Bm05br, Bm05uy y Rs05br	74
5.2.	Análisis filogenético	75
5.3.	Perfil de expresión génica de Bm05br	76
5.4.	Identificación de Bm05br nativa con suero policlonal	78
5.5.	Inmunolocalización de Bm05br por Inmunohistoquímica	80
5.6.	Silenciamiento génico de Bm05br por RNAi	84
5.7.	Alimentación artificial con capilares	88
5.8.	Desarrollo de la respuesta humoral en bovinos	89
5.9.	Efectos de la vacunación sobre la infestación con garrapatas	91

6.	DISCUSIÓN	93
7.	CONCLUSIONES	100
8.	ANEXOS	101
8.1.	Anexo 1: Figuras suplementarias	101
8.2.	Anexo 2: Participación en artículo	105
8.3.	Anexo 3: Medio de cultivo, soluciones y protocolos generales	116
9.	REFERENCIAS	119

RESUMEN

La garrapata específica de bovinos *Rhipicephalus microplus* causa considerable pérdidas económicas en la producción bovina. La identificación de moléculas responsables de la modulación de la defensa de huésped durante diferentes fases parasitarias puede ayudar al desarrollo de métodos alternativos, como ser vacunas, para el control de garrapatas. La proteína de función desconocida de *Haemaphysalis qinghaiensis*, Hq05, indujo significativos niveles de protección cuando fue utilizada en vacunas con ovejas. En el presente trabajo, nosotros investigamos a Bm05br, un gen homólogo de Hq05 en *R. microplus*. Además de en *H. qinghaiensis*, otros homólogos de Bm05br encontrados en otras especies de garrapatas como ser *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes scapularis* fueron comparativamente analizados. El perfil de expresión de Bm05br en diferentes tejidos y estadios de *R. microplus* fue determinado por qPCR y Western blot, asimismo se realizó inmunolocalización por inmunohistoquímica. Anticuerpos policlonales purificados anti Bm05br fueron agregados a sangre bovina y usados para ensayos de alimentación artificial, con el fin de determinar su capacidad de daño. Complementariamente, rBm05br junto con rBm86uy fueron utilizados para ensayos de inmunización de bovinos. Bm05br fue detectada en ovarios, glándula salival y cuerpo graso de garrapatas partenógenas y teleógenas. Los niveles de transcripción más altos fueron observados en cuerpo graso y glándula salival de garrapatas partenógenas. El silenciamiento por RNAi redujo el índice de eclosión de huevos y el peso de larvas obtenido en el grupo tratado comparado con los controles, similares resultados fueron obtenidos por alimentación artificial con anticuerpos anti Bm05br. La infestación experimental con *R. microplus* mostró que los bovinos inmunizados con rBm05br y rBm86uy desarrollaron una respuesta inmune que redujo el número de garrapatas teleógenas y la fertilidad de huevos, al comparar con el grupo control. Estos resultados indican que Bm05br puede estar involucrada en la reproducción de *R. microplus*. Observando su distribución y el alto grado de conservación de las secuencias a través de las diferentes especies de garrapatas, podemos sugerir que Bm05br sería un posible candidato a una vacuna multiespecie contra garrapatas.

Palabras claves: Bm05br, garrapata, *Rhipicephalus microplus*, RNAi, reproducción.

SUMMARY

Rhipicephalus microplus is a cattle-specific tick, causing considerable losses in the livestock industry. The identification of molecules responsible for modulation of host defenses during different parasite stages can help in the development of alternative methods, such as vaccination, to control tick infestations. Hq05, a protein of unknown function identified in the tick *Haemaphysalis qinghaiensis*, induced a significant protective immune response when used as a vaccine in sheep. In the present study, we investigated Bm05br, the Hq05 homologous gene from *R. microplus*. Besides *H. qinghaiensis*, Bm05br homologous found in other tick species such as *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes scapularis* were comparatively analyzed. Bm05br expression profile in different *R. microplus* tissues and life-stages was determined by qRT-PCR and Western blot and immunolocalized by immunohistochemistry. Purified rabbit polyclonal antibodies against rBm05br was added to bovine blood and used in artificial capillary feeding. Also rBm05br plus rBm86uy were used for bovine immunization. Bm05br was detected in ovaries, salivary glands and the fat body of both partially and fully engorged females. The highest transcription levels were observed in partially engorged females fat body and salivary glands. Gene knockdown by RNAi reduced egg hatching rate and the weight of tick larvae obtained from treated group, when compared to controls, similar results was showed by artificial capillary feeding. The experimental *R. microplus* infestation showed that cattle immunized with rBm05 and rBm86uy develop a humoral immune response that reduced the full engorged tick number and egg laying capacity, as compared with control group. These results indicate that Bm05br may be involved in *R. microplus* reproduction. Together with its distribution and high sequence conservation across different tick species, our data suggest Bm05br as a potential antigen for development of a multispecies anti-tick vaccine.

Keywords: Bm05br, tick, *Rhipicephalus microplus*, RNAi, reproduction.

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Biología de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un parásito hematófago perteneciente al phylum Artrópoda, clase Arácnida, orden Acarina y familia Ixodidae. La garrapata *Boophilus microplus* a través de análisis moleculares y morfológicos fue reclasificada como perteneciente al género *Rhipicephalus*, subgénero *Boophilus*, designándose como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Kocan et al. 2007)(Murrell & Barker 2003), siendo adoptada esta nomenclatura para el presente trabajo. Sin embargo, por años dos especies de garrapatas fueron consideradas como *Rhipicephalus microplus*: *R. microplus* y *R. australis*, siendo que estudios recientes las clasifican como dos especies. Por medio de evidencia de análisis de características morfológicas, ausencia de coespecificidad, marcadores de microsatélites, entre otros estudios, se llegó a una reclasificación de *R. microplus*, como dos especies distintas, siendo que poblaciones de *R. microplus* de Australia, Camboya, Nova Caledonia, Borneo, Filipinas, Nueva Guinea, Indonesia y Taití fueron renombradas como *R. australis* (Ali et al. 2016) (Csordas et al. 2016).

R. microplus pertenece a la familia de garrapatas duras o Ixodidae, de la cual forman parte aproximadamente el 80% de las garrapatas, mientras que con la excepción de una especie en la familia Nutalliellidae, el resto son garrapatas Argasidae (garrapatas blandas). Dentro de las garrapatas duras los más importantes géneros son: *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*. Las garrapatas blandas (Argasidae) durante un mismo estadio pueden tener varios episodios de alimentación de 30 min a 2 horas cada uno, siendo los géneros más relevantes: *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius* (Jongejan & Uilenberg 2005).

R. microplus es monoxeno, o sea se alimenta de un huésped único a lo largo de su ciclo de vida, siendo el principal hospedero de *R. microplus* el bovino, sin embargo puede utilizar otros huéspedes ocasionales como búfalos, ovinos, equinos, canes, ciervos o humanos. Las garrapatas

duras (Ixodidae) presentan una cutícula más quitinizada que las blandas, tienen un ritmo lento de alimentación; en cada estadio, antes de mudar y se alimenta durante días a semanas.

Esta especie es originaria de Asia, especialmente de India y de la Isla de Java. La introducción y expansión de esta garrapata en los otros continentes ocurre como consecuencia de las expediciones exploradoras registradas en la historia (Nuñez et al. 1982). La difusión mundial de *R. microplus* fue facilitada por la frecuente introducción de razas bovinas Europeas (*Bos taurus*) en diferentes países, las cuales son más susceptibles al parasitismo por esta garrapata que las razas cebuinas (*Bos indicus*) (Frisch 1999).

1.1.1. Distribución geográfica

R. microplus tiene una distribución mundial pero está confinada a regiones subtropicales y tropicales, entre los paralelos 32° N y 35° S (Fig. 1 y 2). Se encuentra en gran parte de las zonas tropicales y subtropicales de Asia, Madagascar, sudeste de África hasta la línea del Ecuador, gran extensión de América Central y del Sur, México y el Caribe (Estrada-Peña et al. 2006).

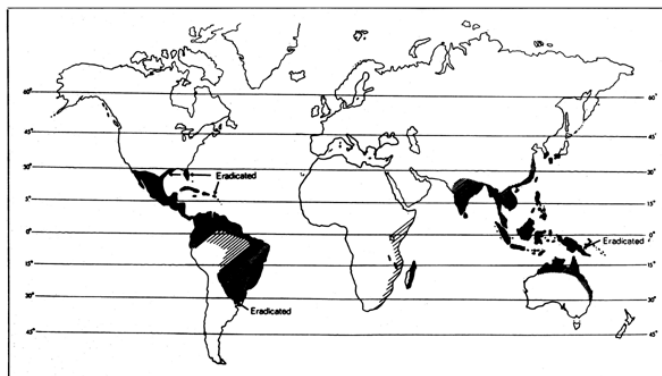


Figura 1. Distribución mundial de la garrapatas *R. microplus*, según datos recopilados por FAO (<http://www.fao.org/docrep/004/X6538E/X6538E02.htm>)

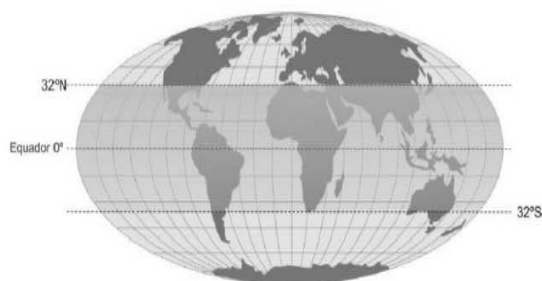


Figura 2. Localización mundial de la garrapata *R. microplus* (elaborada por Prof. Itabajara da Silva Vaz Jr).

En Uruguay, la garrapata bovina se encuentra distribuida actualmente en una amplia zona del país. En base a los programas sanitarios del MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) se divide al Uruguay en zonas Sucia o bajo Control por garrapatas, que incluyen los departamentos de: Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo, Treinta y tres, Lavalleja, Maldonado, y Rocha; así como zonas Libre de garrapatas, donde se encuentran los departamentos de Montevideo, Canelones, San José, Florida, Flores, Colonia, Soriano, Durazno (excepto por la 7° sección Policial) (Fig. 3).



Figura 3- Mapa de Uruguay mostrando las zonas epidemiológicas de garrapatas *R. microplus* (Fuente: MGAP, DSA, Departamento de Programas Sanitarios)

1.1.2. Importancia económica de la garrapata bovina

La infestación por *R. microplus* y las patologías causadas por su transmisión representa un gran impacto económico a la industria ganadera uruguaya. Se estiman pérdidas anuales de aproximadamente US\$ 33 millones de dólares (MGAP, Uruguay). Las infestaciones por *R. microplus* llegan a producir pérdidas de sangre de 40 a 50 litros por año por animal con infestaciones medianas a intensas; lo cual se traduce en anemia, disminución de la producción de leche y carne (Sutherst et al. 1983), además de desvalorización de los cueros causados por lesiones y reacciones inflamatorias en los puntos de fijación de la garrapata (Seifert et al. 1968). Estas lesiones también pueden favorecer a la aparición de infestaciones secundarias como miasis cutáneas. Asimismo, *R. microplus* puede producir la transmisión de agentes infecciosos, como los protozoarios *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* y la rickettsia *Anaplasma marginale*, causante de la tristeza parasitaria bovina (Nuttall et al. 2006). Sumado a estos perjuicios directos causados por la infestación de las garrapatas, están los gastos relacionados con el control, como ser mano de obra, instalaciones, compra y aplicación de acaricidas, entre otras pérdidas (Jamroz et al. 2000).

1.1.3. Ciclo de vida

Se puede dividir el ciclo de vida de *R. microplus* en fase de vida libre y fase de vida parasitaria (Fig. 4). Luego de terminar el proceso de ingurgitamiento, las hembras adultas totalmente ingurgitadas, llamada teleógena se desprenden del hospedero y caen al suelo para iniciar la postura de huevos; iniciándose de esta manera la fase de vida libre, de duración variable dependiendo de las condiciones climáticas, como temperatura y humedad. Por poseer geotropismo positivo, las teleógenas se movilizan hacia ambientes protegidos en el suelo para iniciar la postura, con un período de 2 a 3 días de pre-postura en condiciones ideales (Alvarado & Gonzalez 1979). Cada teleógena realiza una postura media de 3000 huevos durante aproximadamente 12 a 15 días,

en condiciones ideales de 27 °C y humedad superior al 70%. Aproximadamente 18 días después de terminar la postura, se inicia la eclosión de los huevos, cuando las condiciones son ideales para el desarrollo del embrión, o sea, temperatura 27 °C y humedad relativa superior a 70% (Nuñez et al. 1982). Después de un período de aproximadamente 7 días, las neolarvas se transforman en larvas infectantes y trepan al pasto ascendiendo al extremo de las hojas, donde localizan al huésped. Las larvas aumentan de manera notable su actividad en las cercanías de algún cuerpo que localizan por el olor, las vibraciones del movimiento o estímulo visual (Sonenshine 1993). Cuando la larva sube al hospedero, inicia la fase de vida parasitaria, que dura alrededor de 21 días para las hembras de garrapatas. Las larvas se alimentan de plasma y para fijarse, buscan en el hospedero las regiones perianal, perivulvar y posterior de los flancos, debido al espesor, vascularización y temperatura de la piel, así como también debido a la disminuida capacidad de autolimpieza del hospedero de esas zonas. Sobre el hospedero, la larva se desarrolla a la fase de metalarva, ninfa, metaninfa y adulto. Dentro de las garrapatas adultas es posible distinguir diferentes fase de maduración, en primer instancia se encuentran las neóginas (hembra puber), las mismas se distinguen de las ninfas por poseer miembros más largos y grueso; posteriormente pasan a denominarse partenógenas (garrapatas parcialmente alimentadas) las cuales copulan y se alimentan de 2 a 3 ml de sangre, completando así el ciclo de vida. Los machos adultos sexualmente maduros, denominados gonandros, permanecen en el hospedero buscando nuevas hembras (Roberts 1968).

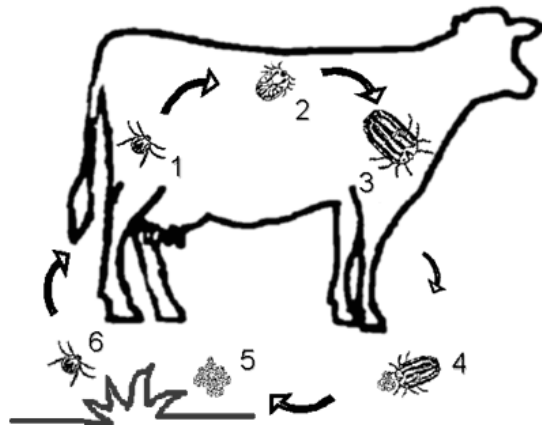


Figura 4- Esquema simplificado del ciclo de vida de la garrapata *R. microplus*. Fases parasitaria: 1-larva infectante realizando la fijación al bovino; 2-Ninfa; 3- Teleógena en estadía final de ingurgitamiento. Fases de vida libre: 4- Teleógena luego del desprendimiento, en período de postura en el suelo; 5- huevos, en el suelo, en período de incubación; 6- larva, en suelo, en período de incubación (Fuente: cnpqg.embrapa.br)

1.2. Historia y breve introducción sobre RNA de interferencia (RNAi)

El silenciamiento génico por RNAi es un proceso biológico, evolutivamente conservado, guiado por RNAs de doble cadena (dsRNA, “double stranded RNA”) que reconocen transcritos diana por complementariedad de secuencia. El silenciamiento génico se da, tanto por degradación de los RNA mensajeros o por imposibilidad de traducción del mismo (Ambros 2004). En 1990 fue descrito un fenómeno de supresión génica en flores de *Petunia hybrida*, denominado cosupresión, ya que al intentar sobre expresar un gen concreto mediante la introducción de un transgen, se anulaba la expresión del transgen, como la del gen endógeno (van der Krol et al. 1990) (Napoli et al. 1990). Asimismo, en 1994, fue observado que la cosupresión actuaba a nivel del RNA (Dougherty et al. 1994). En el año 1998 Fire y Mello, basándose en experimentos previos realizados por Guo y Kemphues en 1995, caracterizaron el proceso de interferencia del RNA (Fire et al. 1998). Dichos autores inocularon en el nematodo *Caenorhabditis elegans* RNA bicatenario correspondiente al gen *unc-22*, que ejerce su función a nivel muscular y observaron que con pocas moléculas de dsRNA se conseguía el silenciamiento del gen. El mismo efecto fue obtenido en casi todos los genes que estudiaron y lo denominaron interferencia del RNA (RNAi). Mediante los organismos modelo *C. elegans* y *Drosophila melanogaster*, se han podido describir genes

implicados en el mecanismo de RNAi. A pesar de que el proceso es muy conservado, existen características específicas de cada especie que se ha estudiado. En diversos organismos, existe una ruta de silenciamiento por RNA en la que las moléculas efectoras son dsRNA largos que provienen tanto de la síntesis endógena de cadenas complementarias, o pueden provenir exógenamente a partir de secuencias virales o por la introducción de moléculas sintetizadas artificialmente (Filipowicz et al. 2005). La enzima DICER procesa estas moléculas en moléculas de dsRNA de 21 a 23 pb llamadas pequeños RNA interferentes (siRNA, “small interfering RNA”). En mamíferos se desconoce si la enzima DICER es capaz de reconocer secuencias de dsRNA largos procedentes de virus o transposones. Lo que sí es sabido es que, la introducción de dsRNA largos en células de mamíferos activa rutas de respuesta a interferón, mediadas por las enzimas PKR y 2'5'-oligoadenilato sintetasa (Hunter et al. 1975) (Barber 2001). Dicha respuesta se ha descrito como una reacción frente a infecciones virales que culmina con la degradación inespecífica de mRNAs y la inhibición de la síntesis de proteínas (Williams 1999). En mamíferos también han sido descritos procesos de silenciamiento por RNA mediado por moléculas endógenas de dsRNA denominadas microRNAs (miRNA). Al parecer, el procesamiento de miRNAs tiene vías en común con el de algunos siRNAs (Fig. 5) (Carrington & Ambros 2003).

Los micro RNAs primarios (pri-miRNAs, “primary microRNAs”) son moléculas de RNA de cadena sencilla que se transcriben a partir de la RNA polimerasa II (Lee et al. 2004), con un tamaño que va desde cientos a miles de nucleótidos (nt) (Lee et al. 2002), con varias horquillas intramoleculares consecuencias del apareamiento de bases entre secuencias parcialmente complementarias. Algunas de estas horquillas serán procesadas a precursores de microRNAs (pre-miRNAs, “precursor of microRNAs”) en el núcleo de la célula mediante la ribonucleasa III DROSHA (Lee et al. 2003), que genera un extremo 3' protuberante de dos nt. Esta fase se lleva a cabo en un complejo denominado procesador de miRNAs, en el que también se encuentra una proteína de unión de dsRNA, que DROSHA requiere para procesar los pri-miRNAs, denominadas DGCR8 (Fig 5) (Gregory et al. 2004). Los pre-miRNAs son moléculas pequeñas, de unos 80 nt, que

se corresponden con horquillas presentes en el pri-miRNA. Generalmente, las horquillas constan de dos cadenas complementarias, con una secuencia de 4 a 10 nucleótidos no complementarios que forman un lazo en un extremo. Los pre-microRNAs son transportados al citoplasma por el complejo RanGTP/exportina 5 (EXP 5) (Yi et al. 2003). Ya en el citoplasma, los pre-microRNAs son procesados por DICER que corta el pre-miRNA eliminando el lazo y generando una molécula de dsRNA de 21 -23 pb con dos nt 3 protuberantes en cada extremo, denominada microRNA, en un proceso que en mamífero es dependiente de ATP (Zhang et al. 2002). DICER requiere también de la ayuda de una proteína de unión a dsRNA denominada “HIV-1 TAR RNA binding protein (TRBP) (Chendrimada et al. 2005) para que el miRNA sea ensamblado en un complejo ribonucleoproteico (“microRNA ribonucleoprotein particles, miRNP”) que será el encargado de llevar a cabo el silenciamiento, ya sea mediante degradación del RNA mensajero diana o mediante inhibición de la síntesis de proteínas (Mourelatos et al. 2002). En algunos casos el miRNP contiene a la proteína argonauta 2 (AGO2), formando un miRNP denominado complejo silenciador inducido por RNA (RISC, “RNA induced silencing complex”). Este complejo, por medio de AGO2, es capaz de producir roturas endonucleolíticas en el RNA mensajero diana (Meister et al. 2004). Los complejos miRNP o RISC son dirigidos por complementariedad de bases de los respectivos RNs: miRNA/siRNA y mRNA. Sin embargo, parece que existe un RISC específico de miRNAs (miRISC) y un RISC específico de siRNAs (siRISC). La caracterización del complejo RISC y el estudio sobre el acoplamiento del siRNA en el complejo se ha llevado a cabo en el siRISC (Sontheimer & Carthew 2005) y se supone que el ensamblaje del miRISC debe ser parecido. Las dos cadenas que forman el siRNA se separan durante el ensamblaje del siRISC (Pham et al. 2004), de manera que una de las cadenas de siRNA se acopla al siRISC (cadena guía), mientras la otra (cadena pasajera) es procesada por la proteína AGO2 (Rand et al. 2005), que produce una rotura endonucleolítica en el medio de la cadena. La unión de una de las dos cadenas de siRNA al complejo RISC depende de la estabilidad termodinámica del apareamiento de bases en los dos extremos del dúplex de RNA, de manera que la cadena que tiene el extremo 5' menos estable será la

que se quede en el complejo RISC y se denominará cadena guía (Tomari et al. 2004). Se ha encontrado que AGO1 también forma parte de RISC (Martinez et al. 2002), pero se desconoce si el resto de proteínas de la familia Argonata forma parte del mismo complejo o si son capaces de formar otros complejos miRNPs (Okamura et al. 2004).

Se ha descrito otro proceso de silenciamiento por RNA, localizado en el núcleo de la célula, por el cual siRNAs que se forman a partir de transcritos que contienen elementos repetidos se incorporan en un complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS, “RNA-induced transcriptional silencing complex”) y promueven modificaciones en la cromatina que conducen a silenciamiento génico (Matzke & Birchler 2005). Fue descrito que siRNAs dirigidos contra secuencias promotoras de un gen o contra orígenes de replicación, pueden inducir metilación del DNA y, por lo tanto, silenciamiento génico en células de mamíferos (Gonzalez et al. 2006).

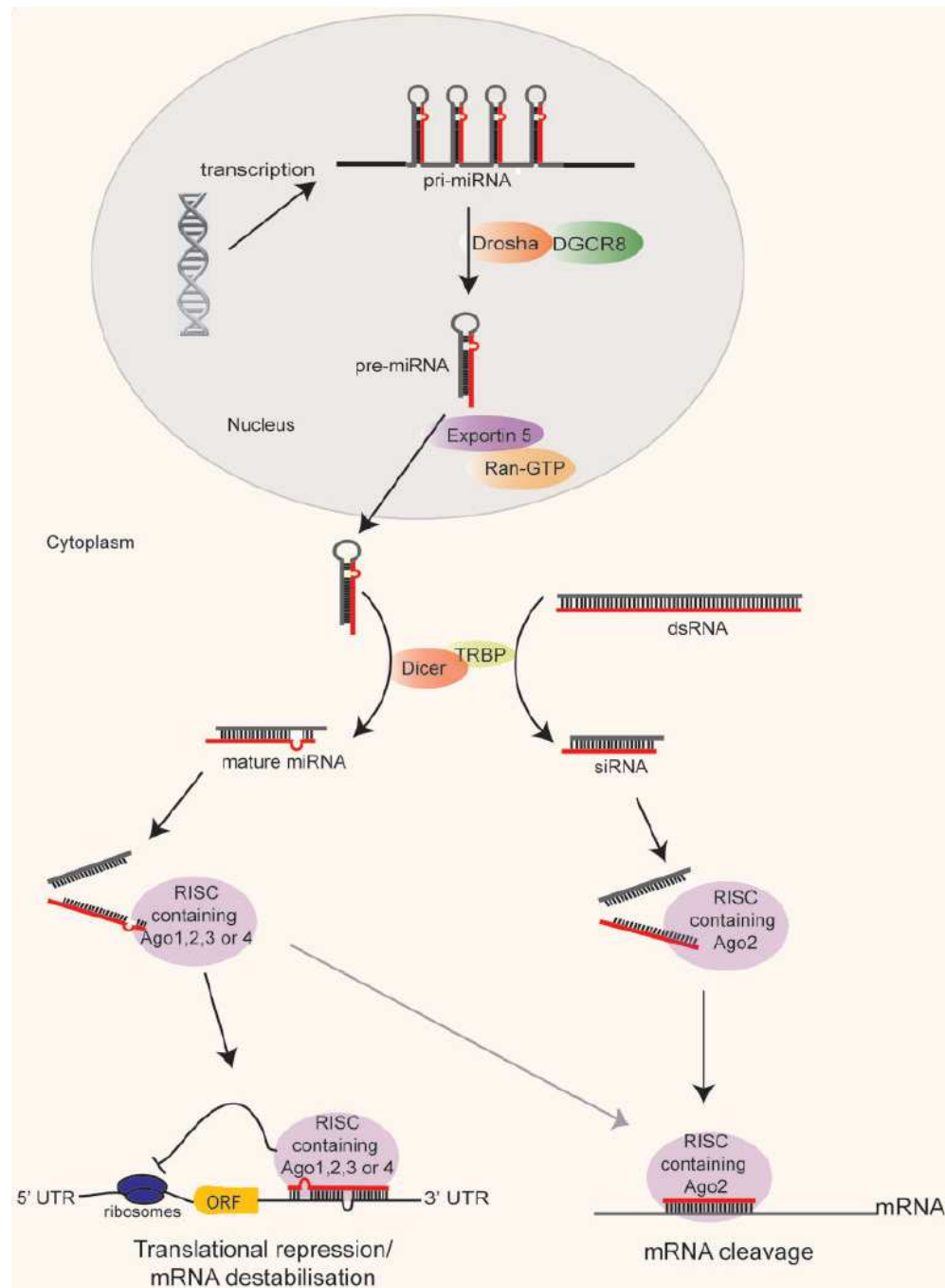


Figura 5. La vía de RNAi. Los miRNAs endógenos (pri-miRNAs) son transcritos en el núcleo, procesados a un precursor de miRNAs de ~70 nt (pre-miRNAs) por Drosha. Luego es transportado fuera del núcleo por Exportin 5 y luego procesado en miRNA maduro por Dicer. Dicer también procesa moléculas de dsRNA largas en pequeñas (si)RNA. Una hebra de miRNA o siRNA dupla es ensamblada en el complejo de silenciamiento del RNA (RISC), que subsecuentemente actúa por unión a la región 3'-UTR, causando la represión de la traducción o la desestabilización del mRNA por unión a la cadena complementaria y clivado del mRNA. El mayor componente de RISC es un miembro de la familia Argonata (Ago), los cuales son cuatro. Agos 1-4 son todos capaces de causar represión de la traducción o desestabilidad del mRNA. Sin embargo, solo Ago2 tiene actividad endonucleasa y puede clivar el mRNA molde (Kelly & Hurlstone 2011).

1.2.1. RNA de interferencia en garrapatas

La técnica de RNAi fue exitosamente aplicada a un amplio número de diferentes especies de garrapatas. El primer reporte de RNAi en garrapatas fue publicado en 2002 (Aljamali et al. 2002) describiendo los efectos del silenciamiento de los transcritos del gen de la proteína histidine binding (HBP) en glándula salival, así como los cambios en el patrón de alimentación seguidos a la inyección de dsRNA en hembras *Amblyomma americanum*. Esto fue seguido por un estudio de los efectos del RNAi en la capacidad ligadora de la proteína HBP (Aljamali et al. 2003). También hay otros trabajos estudiando el efecto del RNAi en la secreción de anticoagulantes de la glándula salival de garrapatas de diferentes especies y más generalmente el efecto del silenciamiento en la alimentación con sangre (T. Miyoshi et al. 2004) (Narasimhan et al. 2004). Asimismo, varias evidencias del uso de RNAi en la identificación de antígenos protectores contra *R. microplus* fueron presentados por Nijhof et al. (2007).

1.2.2. Métodos de delivery de dsRNA en garrapatas y células de garrapatas

Varios métodos han sido utilizados para el delivery de dsRNA largos y siRNA tanto en garrapatas como en cultivos de células de garrapatas. Dentro de estos métodos se incluyen la inyección, la inmersión de células y tejidos, la alimentación artificial entre otros. El método de delivery más comúnmente utilizado en garrapatas es la microinyección de dsRNA. Esta técnica ha sido exitosamente aplicada en varias especies de garrapatas como ser *R. microplus* (Nijhof et al. 2007); *I. scapularis* (Pedra et al. 2006) (De La Fuente et al. 2005)(Narasimhan et al. 2004), *I. ricinus* (Hajdusek et al. 2009) y *H. longicornis* (Miyoshi et al. 2004) (Alim et al. 2009). Otros métodos empleados como inmersión de células de garrapata, el cual fue utilizado para la línea celular de *I. scapularis* ISE6 (Kurtti et al. 2008) o inmersión de una glándula salival en un medio conteniendo dsRNA del gen de interés, también fueron descritos. Los resultados de los experimentos de RNAi mediante la inmersión de la glándula salival como método de delivery ha

sido reportado por ejemplo para el silenciamiento del transcripto del gen de la proteína Histidine binding (HBP) en *A. americanum* (Aljamali et al. 2003) (Aljamali et al. 2002) y silenciamiento de las metaloproteasas en glándula salival de garrapatas de *I. ricinus* (Decrem et al. 2008). De manera similar, una publicación describe el uso de alimentación por tubo capilar para ninfas de *I. scapularis* como modelo para investigar la función del gen en la transmisión de la *B. burgdorferi* (Soares et al. 2005).

Asimismo, Fabres y col., en el año 2010 (Fabres et al. 2010), trabajando con GSK-3, enzima clave involucrada en el metabolismo de glucógeno en mamíferos, mostraron que el silenciamiento por RNAi de GSK-3, mediante la inyección de dsRNA en garrapatas partenógenas *R. microplus*, produjo una reducción significativa de la ovoposición y tasa de eclosión del grupo tratado con respecto a los controles.

De la misma forma, Lara y col. en el año 2015 (Lara et al. 2015), estudiando la captación de metaloporfirinas fluorescentes, utilizadas como análogos de hemo, y el amitraz, vieron que la cepa resistente de *R. microplus* desintoxicaba amitraz más eficientemente que la cepa susceptible. La transcripción de una forma de transportador ABC exhibía 2,5 veces mayor expresión en la cepa resistente al amitraz que la cepa susceptible. Asimismo, observaron que una regulación negativa inducida por RNAi de un transportador ABC llevó a la acumulación de metaloporfirina en la vacuola digestiva, interrumpiendo el tráfico hemo hacia el hemosoma.

En un estudio realizado por Ruiz y col en el año 2015 (Ruiz et al. 2015), mostraron la aplicación de la técnica de RNAi en la validación de componentes de cascadas de señalización molecular, como el eje de la proteína quinasa B (AKT) / glicógeno sintasa quinasa (GSK) durante la embriogénesis de la garrapata. En este ensayo, se demostró la supresión de los transcritos de AKT y GSK (aproximadamente 50% de reducción en ambos genes) en huevos de 7 días de edad. El silenciamiento de GSK en huevos de 7 días de edad causó un 25% de reducción en la eclosión. Al evaluar el efecto de silenciar a AKT y GSK en el metabolismo energético del embrión, se vio que

disminuyó el contenido de glucógeno en los huevos silenciados. Los datos demostraron que la electroporación de los huevos disecados de *R. microplus* podría utilizarse para silenciar genes en embriones de garrapatas.

En resumen, el uso de RNAi para estudios funcionales de genes de garrapatas mostró que los métodos más usados son inyección o inmersión con dsRNA. Ambos métodos han sido exitosos usando diferentes especies de garrapatas, y han permitido contestar muchas preguntas acerca de la función de los genes en garrapatas.

1.3. Técnicas de alimentación artificial de garrapatas

1.3.1. Alimentación artificial por medio de tubos capilares

La técnica de alimentación artificial que utiliza tubos capilares fue descrita por primera vez en el año 1950 (Chabaud 1950), para alimentar artificialmente garrapatas *Hyalomma excavatum*, *Hyalomma dromedarii*, *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus*. El único relato con buenos resultados de la utilización de microcapilares para alimentación e infestación de garrapatas argasidae o blandas fue realizado por Rau y Hannoun en 1968 (Rau & Hannoun 1968). Esta técnica ha sido padronizada para varias especies de garrapatas ixodes, como *Rhipicephalus appendiculatus* (Waladde et al. 1993), *Dermacentor variabilis* (Macaluso et al. 2001) *Ixodes ricinus* (Kröber & Guerin 2007b), *Dermacentor nitens* (Rangel et al. 2008), *Amblyomma cajennense* (Abel et al. 2008) y también *R. microplus* (Gonsioroski et al. 2012), donde ha sido empleada para el estudio de diferentes aspectos fisiológicos de la garrapata. Por ejemplo, en la garrapata *I. ricinus*, la alimentación *in vitro* fue aplicada para evaluar el efecto con diferentes concentraciones de los acaricidas fibronil e ivermectina en la tasa de mortalidad de estas garrapatas (Kröber & Guerin 2007b), asimismo también fue utilizada para determinar el efecto de anticuerpos contra proteínas de la garrapata, sobre el tiempo de alimentación e ingurgitamiento de las hembras. De modo similar, la alimentación *in vitro* por capilares fue empleada en el estudio de la transmisión de *Leptospira*

pomona por garrapatas *Amblyomma maculatum* , así como para el estudio de *Dermacentor andersoni* como un posible vector de rabia (Burgdorfer 1957). Varios autores estudiaron diferentes aspectos de la transmisión de *T. parva* por *R. appendiculatus* con la utilización de esta técnica (Purnell & Joyner 1967) (Purnell RE. 1970) (Walker et al. 1979). En otros estudios sobre la transmisión de *Borrelia burgdorferi*, la técnica de tubos capilares fue usada para infestar garrapatas *Ixodes ricinus*, *I. hexogenus*, *I. loricatus*, *I. pacificus*, *I. scapularis* entre otros (Monin et al. 1989) (Gern et al. 1990) (Gern et al. 1991) (Hu et al. 1992) (Toutoungi & Gern 1993) (Broadwater et al. 2002). Otros autores (Rechav et al. 1999) (Kocan et al. 2005) (Macaluso et al. 2001) también emplearon esta misma técnica para infestar con *Ehrlichia chaffeensis* y otras rickettsias como *Anaplasma marginale*, *Rickettsia montana* e *R. rhipicephali*, a la garrapata *D. varibilis*. Esta técnica ha sido utilizada en estudios de las propiedades antigénicas o del contenido de prostaglandinas E2 de las sangre de las garrapatas (Benavides & Walker 1992) (Inokuma et al. 1994) y en la evaluación de la resistencia de bovinos y conejos a garrapatas *R. appendiculatus* (Lösel et al. 1993). En las garrapatas *R. microplus*, la alimentación *in vitro* fue empleada para analizar el efecto de inhibidores de enzimas, anticuerpos y acaricidas, sobre diferentes aspectos fisiológicos de la garrapata, como mortalidad, ingurgitamiento, postura y eclosión de huevos (Fabres et al. 2010) (Gonsioroski et al. 2012)(Pohl et al. 2011). La principal ventaja de la alimentación *in vitro*, es la posibilidad de cuantificar los efectos de la administración de dosis precisas de una sustancia en la fisiología de la garrapatas, sobre condiciones controladas, además de reducir el costo de la adquisición de animales (Kröber & Guerin 2007a). La simplicidad de la técnica de tubos capilares es de fundamental interés en estudios que tienen por objetivo infección de estadios inmaduros de garrapatas, porque es menos invasiva que otros métodos de infección como, por ejemplo, la inyección percutánea (Kocan et al. 1986) (Gern et al. 1996) (Rechav et al. 1999) (Broadwater et al. 2002).

1.3.2. Otros sistemas de alimentación artificial:

1.3.2.1. Alimentación artificial a través de membranas naturales:

La primera tentativa de alimentación artificial de garrapatas con membranas naturales fue por Chumakov y col. (1945), (reportado por Abbassy et al., 1994). En el año 1977, Mango y Galun (Mango & Galun 1977) consiguieron completar el ciclo biológico de la garrapata *Ornithodoros moudata* en laboratorio, utilizando membranas preparadas a partir de alas de murciélago. La alimentación artificial de garrapatas de la familia Argasidae en membranas naturales ha sido utilizada con éxito en el laboratorio (Habedank & Hiepe 1993). Mientras tanto, cuando se trata de garrapatas ixodidae mayores dificultades son observadas debido al deterioro de las membranas o contaminación de sangre, por el largo período de alimentación necesario para el ingurgitamiento de estas especies. La complejidad de este modelo de alimentación, no ha permitido desarrollar demasiados estudios *in vitro* utilizando membranas para la alimentación o infección de estos vectores (Kemp et al. 1975) (Wetzel 1979) (Kuhnert et al. 1995). Chabaud (1950) definió otras desventajas de esta técnica de alimentación *in vitro*, como ser las complicaciones de preparar las membranas; además de alto costo empleado para impedir la descomposición y contaminación de éstas (Kröber & Guerin 2007b). Para llevar a cabo la alimentación artificial de garrapatas a través de membranas naturales se han utilizado diferentes sistemas como ser la membrana corioalantóidea de huevos embrionados de gallina (Hood et al. 1976), membrana de alas de murciélago (Mango & Galun 1977), piel de conejo (Voigt et al. 1993) (Musyoki et al. 2004) (Bonnet et al. 2007), mesenterio y piel de bovino (Kemp et al. 1975) (Voigt et al. 1993), ratón (Burkot et al. 2001), suinos (Osborne & Mellor 1985) y aves (Osborne & Mellor 1985) (Abbassy et al. 1994). Utilizando membranas provenientes de piel de conejo para alimentar e infestar el estadio adulto de *R. appendiculatus*, Musyoki et al. (2004) observaron que el peso y la tasa de infección de las garrapatas alimentadas artificialmente no difirió de las garrapatas alimentadas en bovinos. A partir de membranas provenientes de piel bovina, Kemp y col. (Kemp et al. 1975) observaron el ingurgitamiento de larvas de *R. microplus*. Este tipo de membranas fue empleado en el estudio de la

transición de *T. mutans* o *Cowdria ruminatum* por *A. variegatum* (Voigt et al. 1993). Burkot y col (Burkot et al. 2001) infestaron con éxito garrapatas adultas de *I. scapularis*, con *B. burgdorferi*, a través de alimentación artificial de membranas de ratón. La fuente de alimentación puede ser medio de cultivo (Kemp et al. 1975), sangre total (Uchikawa 1976), sangre desfibrinada, heparinizado o citratado (Uchikawa 1976) (Mango & Galun 1977) (Osborne & Mellor 1985) (Bonnet et al. 2007) y sangre desfibrilada asociada a medio de cultivo y patógenos (Burkot et al. 2001). Estas fuentes necesitan de cambios periódicos y calentamiento, para proveer a las garrapatas de condiciones adecuadas para su fijación a la membrana y evitar posterior infestación de la fuente de alimentación ofrecida. Generalmente, se utilizan estufas incubadoras (Voigt et al. 1993) (Bonnet et al. 2007), para mantener la temperatura del sistema de alimentación artificial. Factores como la humedad relativa y la concentración de gas carbónico también pueden ser modificados para obtener mejores resultados en la utilización de membranas naturales para la alimentación artificial de garrapatas (Kemp et al. 1975) (Voigt et al. 1993). En caso de alimentación y/o infección de garrapatas ixodidae es necesario también colocar antimicrobianos debido al largo período de alimentación necesario (Kemp et al. 1975) (Voigt et al. 1993) (Bonnet et al. 2007).

1.3.2.2. Alimentación a través de membranas artificiales:

Las garrapatas argasidae presentan buena adaptación a esta técnica de alimentación artificial, alcanzando con éxito el ingurgitamiento cuando son expuestos a diferentes tipos de membranas artificiales (De Meillon & Golberg 1947); mientras que en las garrapatas ixodidae no es igualmente posible debido a dificultades en establecer superficies artificiales que presentan los estímulos adecuados para la fijación y alimentación de estas garrapatas. Los primeros estudios de utilización de membranas artificiales para la manutención y/o infección de artrópodos empleaban membranas de parafilm (Haddon 1956). Pero con el desarrollo de este sistema de alimentación otros materiales también fueron utilizados, como por ejemplo, membranas de látex (Kirch et al. 1991) y

silicona (Osborne & Mellor 1985) (Fonseca et al. 1999). Las membranas de parafilm han sido utilizadas para la manutención en laboratorios de la garrapata, *O. moudata*, en ausencia de hospedero vertebrado (Habedank & Hiepe 1993). Estas membranas son a prueba de agua, semitransparentes, inodoras, insípidas y flexibles. En general, la fase de membrana donde las garrapatas son expuestas es recubierta por una cámara fina de pelo. En este sistema de alimentación artificial, esta fase queda hacia el recipiente donde están las garrapatas, mientras que la fase lisa en contacto con la sangre. Estas membranas pueden ser utilizadas sucesivas veces, desde que sean lavadas con agua y detergente neutro y posteriormente autoclavadas (Fonseca et al. 1999). La utilización de membranas artificiales, por la practicidad y fácil obtención del material, parece ser adecuada para la alimentación de garrapatas. Los mejores resultados fueron obtenidos con membranas de silicona, porque permite mejor fijación, ingurgitamiento, desprendimiento, ovoposición y muda a diferentes fases de vida de las diferentes especies de garrapatas. La membrana de silicona fue utilizada para mantener en laboratorio las garrapatas *O. moubata*, *A. cajennense*, *A. (Persicargas) miniatus*, *D. nuttalli*, *H. excavatum*, *I. holocyclus* (Osborne & Mellor 1985) (Habedank & Hiepe 1993) (Fonseca et al. 1999). Como fuente de alimentación fueron utilizados en este sistema suero fetal bovino (Hokama et al. 1987), solución de glutatona (Hokama et al. 1987), medio de cultivo (Hokama et al. 1987), solución salina (Hokama et al. 1987) y sangre total desfibrilada o con anticoagulante (Osborne & Mellor 1985) (Habedank & Hiepe 1993) (Fonseca et al. 1999). La adición de antibióticos y de fungicidas a la fuente de alimentación reduce considerablemente la mortalidad de las garrapatas. Se deben utilizar técnicas de esterilización para tratar las fuentes de alimentos empleadas en los sistemas que utilizan membranas artificiales. De esta manera, las membranas pueden ser reaprovechadas, pero para ser utilizadas por un período mayor deben ser autoclavadas (Osborne & Mellor 1985). Para la utilización de membranas artificiales son muchas veces necesarios estímulos táctiles adicionales, como algodón, lana fibra de poliéster, cabello sintético o pelo de conejo aplicado en la superficie; los estímulos olfatorios

obtenidos por lavados de orejas de bovinos y plumas de aves, excretas de garrapatas y secreción del animal donador también son importantes (Hokama et al. 1987) (Fonseca et al. 1999).

1.4. Control de garrapatas

Como se mencionó en previas secciones, *R. microplus* y las garrapatas en general producen grandes pérdidas ya sea debido a la transmisión de enfermedades así como debido a los efectos físicos de la succión de sangre. El control de las garrapatas es indispensable para combatir sus efectos adversos, así como minimizar las pérdidas económicas.

1.4.1. Acaricidas

El control químico a través de acaricidas es el método que más se ha empleado para el control de la garrapata bovina (Pruett 1999). Este procedimiento se inició de forma sistemática con la utilización de compuestos arsenicales en el año 1896 en Australia (Angus 1996). El descubrimiento de las propiedades insecticidas de DDT (diclorodifeniltricloroetano) en 1939 así como el desarrollo de pesticidas orgánicos facilitó el control de garrapatas. Las principales clases de insecticidas son los organoclorados, organofosforados, piretroides sintéticos, y amidinas (Taylor 2001).

Existen en el mercado productos derivados de distintas clases de acaricidas: organofosforados (ej: clorpirifos, coumafos, etion), piretroides sintéticos (ej: permetrina, cipermetrina, deltametrina), amidinas (ej: amitraz), lactonas macrocíclicas (ej: ivermectina, abamectina, doramectina, moxidectina), fenilpirazolonas. (ej: fipronil), inhibidores de la síntesis de quitina (ej: fluzurón) y espinocina (ej: espinosad).

Sin embargo, poblaciones de garrapatas resistentes a esos compuestos han sido descritas cada vez con mayor frecuencia (Guerrero et al. 2012). En una sociedad cada vez más preocupada por cuestiones como la sanidad animal, la persistencia de estos compuestos y consiguiente contaminación de leche y carne bovina, así como también el impacto sobre el medio ambiente son

factores a tener en cuenta (Playford 2005). Asimismo, la emergente resistencia a todas las clases de acaricidas que ha sido mundialmente observada en poblaciones de garrapatas, sobre todo en los lugares donde es realizado el control químico (FAO 2004), llevo a la necesidad de cambiar los principios activos y a la utilización secuencial y/o simultánea de acaricidas basados en compuestos arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidas, piretroides e ivermectinas (George et al. 2004). El corto período de tiempo entre las generaciones y el empleo de subdosificación, parece contribuir a la rápida aparición de resistencia a *R. microplus* (Kocan 1995).

Aproximadamente en el año 1955 se introdujeron los organofosforados en el mercado para sustituir a los organoclorados. A pesar de ser el grupo más antiguo de acaricidas aún son utilizados para bovinos. En los años 80, fueron introducidos los piretroides, los cuales al poseer el mismo modo de acción que DDT, presentaron problemas con el surgimiento de resistencia cruzada. Asimismo las amidinas fueron utilizadas con mayor intensidad en los años 80 cuando la resistencia a los piretroides ya estaba difundida (Graf et al. 2004). Actualmente, las poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados y piretroides están diseminadas por todo el mundo (FAO 2004). La resistencia a amitraz fue detectada en muchos países como ser Australia (Kunz & Kemp 1994) Colombia (Benavides et al. 2000) y México (Soberanes et al. 2002). Las lactonas macrocíclicas, surgieron al inicio del 80, produciendo gran revolución en el mercado mundial de los antiparasitarios por poseer amplio espectro de acción, siendo eficaces para el control de endo y ectoparásitos. La resistencia a lactonas macrocíclicas fue descrita en diversos lugares como ser en Brasil, en estados como Rio Grande do Sul (Martins & Furlong 2001) o San Pablo (Klafke et al. 2006) en México (Perez-Cogollo et al. 2010) y en Uruguay (Castro-Janer et al. 2011). El fipronil se comenzó a utilizar para el control de garrapatas en los años 90, siendo también registrada la resistencia a este compuesto en Brasil (Castro-Janer et al. 2010) y Uruguay (Cuore et al. 2007) (Castro Janer et al. 2010).

Todos estas razones demuestran la necesidad de investigación y desarrollo de métodos alternativos de control contra la infestación por *R. microplus*.

1.4.2. Otros métodos de control

Existen métodos alternativos de control a los acaricidas, como ser el uso de razas bovinas resistentes a las garrapatas (Piper et al. 2010), uso de vegetación con función repelente a garrapatas (Fernandez-Ruvalcaba et al. 2004), uso de microorganismo patógenos, como los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Campos et al. 2010), (Leemon & Jonsson 2012) y el uso de compuestos naturales con función acaricida (Borges et al. 2011). Otra alternativa sería el uso de predadores naturales para *R. microplus* como ser la garza *Egretta ibis* (Alves-Branco et al. 1983), los pájaros *Molothrus bonariensis* o también el *Vanellus chilensis*, así como hormigas carnívoras (Gonzales 1975). También se puede recurrir a la utilización de agentes infecciosos que se han mostrado eficientes en el control biológico de insectos (Samish & Glazer 2001), como las bacterias *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* y *Enterobacter agglomerans* (Brum 1988). Asimismo, es importante destacar que todos estos métodos no han alcanzado aún aplicación masiva.

1.4.3. Control inmunológico

El control inmunológico sería una alternativa al uso de acaricidas para el control de las garrapatas. En este caso el hospedero es vacunado con inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora, pudiendo de esta manera perjudicar el parasitismo de la garrapata. Los efectos producidos por la vacunación son normalmente estimados a través del número, peso y postura de teleógenas, así como la eclosión de los huevos, entre otros parámetros que afectan la futura presión de infección (Wikel & Bergman 1997) (Francischetti et al. 2009). Este método presenta ventajas como ser el costo-beneficio (Canales et al. 2009) y la ausencia de toxicidad de las fórmulas administradas, entre otras.

Diversos factores determinan la protección desarrollada por el sistema inmune de los hospederos frente a la infección por una especie de garrapatas, dependiendo de características tanto del parásito como del animal parasitado. Por ejemplo, para realizar la alimentación sanguínea, las diferentes especies de garrapatas permanecen fijadas en sus hospederos por períodos variados de

tiempo, desde pocos minutos hasta varios días (Sonenshine 1993). Cuanto menos es el período de alimentación de la garrapata menos será el contacto con el sistema inmune del hospedero.

Algunas especies de garrapatas están ampliamente adaptadas a una determinada especie de hospedero, como es el caso de *R. microplus* en bovinos. La respuesta inmunológica innata y adaptativa está presente en bovinos infestados por *R. microplus* por medio de la acción de anticuerpos, del sistema de complemento o la reacción de hipersensibilidad (Wikel 1988) (Valenzuela 2004) involucrando entre otros granulocitos, células presentadoras de antígeno, citosinas, linfocitos B y T (Wikel 1996). Fue demostrado el desarrollo de anticuerpos y linfocitos en la resistencia adquirida a través de transferencia de suero y de células de linfonódulo de hospederos resistentes a las garrapatas para hospederos sensibles, desarrollando en ambos casos la transferencia de parte de los niveles de protección (Wikel & Allen 1976). Es necesaria una mayor investigación en lo que tiene que ver con los casos de parasitismo de bovinos por *R. microplus*, la producción de linfocitos T y B de memoria (Wikel 1996), y su participación en la protección desarrollada en los huéspedes en cada tipo de respuesta (humoral o celular) (Wikel & Bergman 1997) (Willadsen 2004) (Ruiz et al. 2006).

1.4.3.1. Desarrollo y experiencia con vacunas basadas en el antígeno Bm86:

TickGARD y Gavac Los primeros resultado obtenidos de ensayos de inmunización utilizando extractos proteicos de garrapatas teleógenas, mostraron que las garrapatas no fueron capaces de alimentarse adecuadamente debido a la ruptura de su intestino o por su muerte antes de completar su alimentación, llevando a la obtención de bajos niveles de fertilidad de las garrapatas. (Kemp et al. 1986). Estos ensayos fueron seguidos por refinamientos de los métodos de extracción y preparación de vacunas de tejidos específicos. Las vacunas derivadas de extractos de intestino demostraron los mejores resultados, con una protección del 87% y mayor a 95% en lo que tiene que ver con la reducción de huevos (Opdebeeck et al. 1988). Estos alentadores resultados fueron seguidos por investigaciones focalizadas en localizar los antígenos protectivos e identificar

su interacción con el sistema inmune del huésped (Kemp et al. 1989). Bm86 fue identificada como una glicoproteína de la superficie del intestino de la garrapata, la cual mostró inducir una respuesta inmune protectora cuando es inoculada en bovinos. El marco abierto de lectura (ORF) de Bm86 fue exitosamente clonado y expresado, siendo de la misma manera confirmada sus propiedades inmunoprotectoras (Rand et al. 1989) (Gough & Kemp 1993). Esta investigación resultó en el desarrollo y comercialización de la vacuna recombinante contra *R. microplus*, desarrollada por un grupo de investigadores australianos (TickGARDTM). Esta vacuna fue la primera vacuna recombinante contra artrópodos (Willadsen et al. 1995). Efectos similares fueron reportados por un grupo Cubano (bajo el nombre de GavacTM); siendo que la mayor diferencia entre ambas radicaba en lo que respecta al tipo de vector de expresión usado para la proteína recombinante (Rodríguez et al. 1994). La versión Cubana de la vacuna usaba la expresión de la proteína recombinante con el sistema de levadura *Pichia pastoris*, mientras que el grupo Australiano usó el sistema de expresión con bacteria *Escherichia coli* (Rand et al. 1989) (Rodríguez et al. 1994).

En el año 2000 Jonsson (Jonsson et al. 2000) reportó una reducción del 56% en el número de garrapatas en vacas lecheras Holstein-Friesian vacunadas con TickGARD^{PLUSTM}, así como un incremento de peso vivo de 18 kg en un período de 6 meses. El exitoso uso de la vacuna cubana GavacTM, fue demostrado por una importante disminución del uso de tratamientos acaricidas utilizados en el control de garrapatas en Cuba (Canales et al. 1997).

En el año 2004, un cálculo costo-beneficio mostró un incremento neto en ganancia debido a la reducción de costos en tratamientos acaricidas (una reducción del 87% en un período de 8 años) y altas ganancias de producción. Asimismo, la incidencia de babesiosis fue reducida en 1.9 casos por 1000 bovinos, siendo que antes de la introducción de la vacuna habían 54 casos clínicos por 1000 animales (Rodríguez Valle et al. 2004). Sin embargo, las posibles comparaciones entre la experiencia de la vacuna Australiana y Cubana son difíciles. En Cuba, la vacuna anti-garrapatas indujo mayores cambios en la cría de animales en las granjas lecheras a través de acciones coordinadas del estado, por medio de programas integrados de control (Rodríguez Valle et al.

2004). En Australia, sin embargo, la vacuna anti-garrapatas fue primariamente usada por productores de carne en la parte norte del continente. Una desventaja de las vacunas basada en Bm86 (TickGARD^{PLUSTM} y GavacTM) fue la necesidad de repetir vacunaciones para mantener los niveles de anticuerpos. Esto limitó la utilización de la vacuna por la industria ganadera Australiana, donde la ganadería se maneja de manera extensiva y los animales son reunidos pocas o una vez al año. Los beneficios económicos de la reducción de parásitos se perdían por el incremento de gastos debido a la necesidad de juntar a los animales más veces al año (Playford 2005). Actualmente, TickGARDTM ya no se produce en Australia, siendo el último stock de producción utilizado por productores de vacas lecheras en regiones infestadas por garrapatas en la zona de Queensland (de la Fuente et al. 2007). La vacuna cubana GavacTM, aún permanece en el mercado. Asimismo, a pesar de la disponibilidad de la vacuna cubana en el mercado, la misma no asegura un grado de protección suficiente como para suprimir el uso de acaricidas (Willadsen 1997).

1.4.3.2. Búsqueda de antígenos homólogos a-Bm86

En los últimos años, una considerable cantidad de bibliografía ha sido publicada reportando resultados de experimentos utilizando antígenos diferentes a Bm86 o investigando los efectos protectores de Bm86 o sus homólogos en otras especies de garrapatas. Un resumen actualizado de los experimentos ha sido compilado y publicado recientemente (Lew-Tabor & Rodriguez Valle 2016). Los efectos protectores reportados por diferentes grupos de investigación presentan desafíos en la cantidad y calidad de interpretaciones de los datos. Los efectos de las vacunas sobre la parasitosis normalmente son descriptos en términos de eficacia. A lo largo de las publicaciones, la eficacia varía desde definiciones simples como: porcentaje de reducción en el número de larvas producido en un ciclo de vida de las garrapatas (Tellam et al. 2002) hasta definiciones que incluyen formulas incorporando todos los parámetros experimentales medidos como ser: “Eficacia (%)= $100 \times [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$ ”; donde CRT, CRO y CRF son la reducción de número de teleógenas, la capacidad de postura de huevos y la fertilidad con respecto al grupo control, respectivamente

(García-García et al. 2000). En adhesión a esto, algunos estudios no reportan eficacia, pero presentan más bien los parámetros experimentales observados y los refieren como “eficacia del antígeno/vacuna” en términos generales sin cuantificar eficacia general (Canales et al. 2009) (De Vos et al. 2001). Dado los buenos resultados de vacunaciones en bovinos contra garrapatas usando el antígeno Bm86, los efectos protectores de Bm86 y sus homólogos fueron investigados en otras especies. Un estudio publicado en el año 2001, mostraba los efectos de la vacuna TickGARD™ en infestaciones de *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *H. dromedarii* y *R. appendiculatus* en terneros (De Vos et al. 2001). Ellos observaron un efecto protector de grado variable contra garrapatas *R. decoloratus*, *H. a. anatolicum* y *H. dromedarii*, mientras que no observaron protección significativa contra *A. americanum* y *R. appendiculatus*. La secuencia de *H. a. anatolicum* mostró una similitud de 64% con Bm86, lo cual posiblemente explique un efecto de protección cruzada (De Vos et al. 2001). La garrapata *R. microplus* también fue incluida en este estudio, con experimentos de vacunación que repitieron los resultados previamente obtenidos (De Vos et al. 2001).

A nivel mundial, la eficacia de estas vacunas comerciales varía entre el 51% y 91%, dependiendo de las características de la población de garrapatas y de la condición nutricional de los bovinos utilizados en las pruebas (Patarroyo et al. 2002). Se piensa que la variación de la eficacia observada en las diferentes regiones del mundo se deben a variaciones en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas (García-García et al. 2000). Uruguay está dentro de esas poblaciones sobre las cuales las vacunas comerciales tienen una baja eficacia (datos no publicados del MGAP).

Un análisis de poblaciones realizado en Argentina mostró polimorfismo en el gen de Bm86, la cual resultó en una proteína soluble, en vez de proteína de membrana, como la detectada en garrapatas de Australia y Cuba, lo cual llevó a que estas garrapatas sean resistentes al efecto de la vacunación. Con el fin de evitar esta resistencia una nueva vacuna recombinante fue producida basada en el gen de Bm95 (homólogo a Bm86). Esta vacuna se mostró eficaz para proteger a los

bovinos de infestaciones, tanto de garrapatas de Argentina como de Cuba (García-García et al. 2000).

Otros estudios han investigado la eficacia de péptidos sintéticos derivados de Bm86, los mismos fueron desarrollados teniendo en cuenta el análisis de Bm86 y de la evaluación de algunas propiedades de la proteína como potencial hidrofóbico e hidrofílico (Patarroyo et al. 2002). Estos péptidos, usados como antígenos vacunales en bovinos presentaron una eficacia de 35% a 81% (Patarroyo et al. 2002). Una serie de publicaciones han reportado el éxito de experimentos de inmunización contra *H. a. anatolicum*. En el primer experimento se usó antígeno homogenizado de larvas y ninfas y mostró moderada protección en conejos, demostrado por el aumento del tiempo de alimentación y subsecuente disminución en el peso y ovoposición (Ghosh et al. 1998). Siguiendo estos resultados, animales cruza (*B. taurus* x *B. indicus*) fueron vacunados usando antígenos de preparaciones de larvas, que resultó en una reducción de la fijación y muda de larvas y ninfas así como reducción en la fijación de los adultos (Ghosh & Khan 1999).

1.4.3.3. Hq05 y sus homólogos

El repertorio de transcriptos de glándula salival de garrapatas encontrado en un análisis transcripcional de glándula salival (Tirloni et al. 2014) de garrapatas es complejo. En el mismo fueron encontradas muchas proteínas sin similaridad con otras proteínas de las bases de datos de NCBI. La mayor parte de estas nuevas proteínas fueron identificadas como proteínas hipotéticamente secretadas y conservadas (Francischetti et al. 2009). Las proteínas incluidas en este grupo son las más abundantes de la saliva de *R. microplus*, siendo la saliva de garrapatas partenógenas más rica en estas proteínas que la saliva de garrapatas teleógenas. Asimismo, el estudio proteómico de Tirloni y col (Tirloni et al. 2014) confirmó que algunas proteínas antes definidas como hipotéticamente secretadas, efectivamente lo eran. Dado el alto número de estas proteínas en la saliva de las garrapatas, es razonable concluir que las mismas presentan algún rol en la alimentación sobre el hospedero. Dentro de este grupo de proteínas se encuentra Bm05br (en la

presente tesis se utiliza Bm05br para definir la proteína obtenida de garrapatas de cepa Porto Alegre, mientras que se define como Bm05uy, a la proteína obtenida de garrapatas de cepa Mozo de Uruguay). Bm05br y Bm05 (denominación usada por Tirloni y col.) son la misma proteína, ambas obtenidas de garrapatas de cepa Porto Alegre. Dentro del grupo de proteínas homologas a Bm05br se encuentra la proteína inmunogénica Ba05, la cual fue identificada en glándulas salivales y huevos de 3 días de edad de garrapatas de *Rhipicephalus annulatus* (Shahein 2008). Los autores realizaron análisis de inmunoblot usando extracto proteico de diferentes especies de garrapatas y suero de conejo anti-rBa05 y lograron detectar la presencia de homólogos de Ba05 en *Hyalomma dromedarii* y *Rhipicephalus* spp. con un peso molecular similar al obtenido en *R. annulatus*; sugiriendo que el gen de Ba05 es conservado entre las especies de garrapatas duras pero no así en garrapatas blandas como ser *Ornithodoros moudata*, donde no fue detectado. Seguidamente, Schuijt y col. (Schuijt et al. 2011) detectaron en glándula salival de *Ixodes scapularis* la proteína P19, un homólogo de Ba05 con una identidad de 93%. Este trabajo mostró que P19 es expresada en estadios de larva, ninfa y adulto, así como en glándulas salivales. Sin embargo, la función de P19 permanece aún sin saberse, ya que esta no mostró ningún efecto sobre actividades bioquímicas en la saliva, como actividad anticomplemento o anticoagulante. Un ensayo de vacunación usando la recombinante P19 junto con otras dos proteínas recombinante (rP8 y rP23), permitió observar que dicha inmunización, limita la alimentación de las ninfas de garrapatas en conejos, sugiriendo que podrían ser potenciales candidatos para el control de garrapatas (Schuijt et al. 2011). En 2009, (Gao et al. 2009) identificaron otra proteína homóloga a Ba05, denominada Hq05, en garrapatas *Haemaphysalis qinghaiensis* (Gao et al. 2009). Hq05 fue reconocida por suero anti-glándula salival de garrapatas pero no por suero anti-saliva de garrapatas, sugiriendo que Hq05 no es secretada durante la alimentación de la garrapata. Análisis de secuencia y filogenéticos indicaron que Hq05 muestra una similaridad del 62% con Ba05. De la misma manera, el análisis por RT-PCR indica que el gen Hq05 se expresa en ninfa y extractos de glándulas salivales de garrapatas. Gao y col., realizaron ensayos de vacunación en ovinos. Un grupo de 3 ovinos fue inmunizado con rHq05,

mientras que los otros 3 (grupo control) se inmunizaron con la proteína GST (glutathione S transferase). La vacunación en ovinos con rHq05, confirió una significativa protección inmunológica ($p < 0,01$), resultando en un 40% de reducción de la cantidad de huevos puestos por las garrapatas, también descendió la capacidad de incubabilidad de huevos en un 37% comparado con el grupo control. Estos resultados mostraron que rHq05 podría ser un buen candidato para una vacuna contra garrapatas. Como ya fue mencionado anteriormente, un análisis de proteómica identificó recientemente la presencia de Bm05br, homólogo de Hq05, Ba05 y P19, en la saliva de *R. microplus* (Tirloni et al. 2014).

Asimismo, una característica sorprendente de la relación vector / huésped, es que la garrapata segrega una variedad de moléculas de sus glándulas salivales farmacológicamente activas, que están diseñadas para aumentar la eficiencia de la alimentación, en el huésped mamífero. Una de la categoría de moléculas secretadas son los componentes del cemento de las garrapatas que permiten que las garrapatas duras (Ixodidae) permanezcan unidas al huésped durante un período prolongado de alimentación de 4-8 días y evitan que las moléculas de respuesta inmune del huésped entren en contacto con la probóscide de la garrapata (Sonenshine 1993). El cono de cemento de garrapata es una estructura estratificada que comprende dos tipos principales de cemento. El primer tipo de cemento se produce minutos después de la fijación de la garrapata y se endurece rápidamente para formar el núcleo central rígido del cono. El segundo tipo de cemento se secreta después de aproximadamente 24 horas de la fijación y se endurece gradualmente para formar una corteza externa relativamente flexible. La producción de cemento continúa típicamente hasta el tercer o cuarto día después de la unión (Moorhouse & Tatchell 1966). Los procesos por los que el cemento endurece son actualmente desconocidos y las proteínas individuales que comprenden el cemento de garrapatas están mal caracterizadas. Se considera que las proteínas de cono de cemento representan candidatos para una posible vacuna contra garrapatas, ya que la formación del cono es esencial para que la garrapata se adhiera y se alimente. Dado el poco conocimiento que se tiene sobre Bm05br, sería interesante investigar si participación o no en dicho proceso.

1.4.3.4. Búsqueda de otros antígenos vacunales

Otros grupos de investigación, estudiaron el efecto protector de antígenos de glándulas salivales de varias especies de garrapata, por ejemplo *R. appendiculatus* (Nyindo et al. 1996) (Trimnell et al. 2002). En particular el trabajo sobre la proteína del cemento 64TRP (Trimnell et al. 2002) mostró resultados prometedores que fueron seguidos por la investigación del potencial de protección cruzada de *R. appendiculatus* contra otras especies de garrapatas. Trimnell y col. observaron efectos protectores contra *R. sanguineus* sensu lato e *I. ricinus* en ensayos con conejillos de Indias y hámsters, respectivamente, así como observaron reacción cruzada entre el suero anti conejillos de India y antígenos “ocultos” de *R. microplus* y *A. variegatum* (Trimnell et al. 2005). La protección se vio reflejada en decrecimiento del índice de fijación e incremento de la mortalidad de garrapatas adultas *R. sanguineus*, así como incremento en el tiempo de alimentación, cambios morfológicos e incremento en el índice de mortalidad para *I. ricinus*. Los autores concluyen que los antígenos derivados de 64TRP son buenos candidatos para una vacuna anti-garrapata (Trimnell et al. 2005).

Muchas investigaciones usando antígenos candidatos contra *R. microplus* han sido reportadas. La aspártico-proteínasa aislada de huevos embrionados de *R. microplus*, BYC (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*) (Logullo et al. 1998), fue utilizada para la inoculación de bovinos logrando inducir una respuesta inmune protectora contra infestaciones de *R. microplus* (Da Silva Vaz et al. 1998). Se observó reducción del número de teleógenas, capacidad de postura y fertilidad de los huevos, con eficacia variable de 14% a 36%. También se pudo observar que la inmunización de bovinos con BYC recombinante presentó un grado de protección semejante al de la proteína nativa y aparentemente los niveles de anticuerpos específicos parecen tener relación con el grado de protección (Leal et al. 2006).

La cisteino-endopeptidasa degradadora de vitelina, VTDCE, purificada y caracterizada a partir de huevos de *R. microplus*, fue utilizada en experimentos de inmunización de bovinos y mostró la inmunogenicidad de la proteína. La producción de anticuerpos específicos por animales

aumentaron gradualmente en respuesta a las inmunizaciones con VTDCE purificadas de huevos. Los bovinos inmunizados presentaron un índice de protección global de 21%, observándose una reducción del 18% del peso y de la fertilidad de los huevos de las teleógenas alimentadas en bovinos inmunizados con VTDCE (Seixas, Leal, et al. 2008). Estas características hacen de VTDCE, al igual que BYC, un antígeno potencial para componer una vacuna contra *R. microplus* (Seixas et al. 2003).

En diferentes fases del desarrollo se han detectado la presencia de los inhibidores BmTIs (*Boophilus microplus trypsin inhibitors*), lo cual indica su posible papel en la interacción parasito-huésped. Los BmTIs fueron usados como antígenos en una emulsión utilizando adyuvante completo de Freund, para inmunizar bovinos, que fueron posteriormente desafiados con larvas de garrapata *R. microplus*. Los bovinos inmunizados presentaron una reducción de 68% en el número de garrapatas, 71% del peso total de los huevos y 69% del peso total de las hembras ingurgitadas, cuando fue comparado el grupo inmunizado con los controles. La eficacia total de la vacunación fue de 73% (Andreotti et al. 2002).

Las GSTs (Glutathione S-transferases), son una familia de enzimas involucrada en la detoxificación metabólica de xenobióticos y compuestos endógenos (Agianian et al. 2003). Un suero producido en conejo contra GST de *R. microplus* presentó reactividad cruzada contra las rGSTs de *H. longicornis* y *R. appendiculatus* (I. Da Silva Vaz et al. 2004). Posteriormente fue demostrada la antigenicidad e inmunogenicidad en ratones y bovinos de GST de *H. longicornis* y GST de *R. microplus* expresada en *E. coli*. Se observó que la vacunación de bovinos con rGST de *H. longicornis* confirió una protección parcial contra *R. microplus*, obteniéndose un número menor de teleógenas obtenidas en el grupo de bovinos inmunizado con rGST de *H. longicornis*, tanto en condiciones de establo (Parizi et al. 2011), como en un experimento a campo (Parizi et al. 2012).

Otras diversas moléculas ya caracterizadas participan de diferentes funciones fisiológicas de la garrapata y son importantes para la comprensión de la interacción de la garrapata con su huésped. Ejemplos de ello son la THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*) (Sorgine et al. 2000),

paramiosina, proteína muscular (Ferreira et al. 2002), microfilina, un inhibidor de trombina (Ciprandi et al. 2006); calreticulina, una proteína ligadora de calcio y ligadora de C1q, moléculas del sistema de complemento plasmático (Sanchez Ferreira et al. 2002) y BmCl1, una cisteino-proteinasa posiblemente involucrada en la degradación de la hemoglobina en el intestino de la garrapata (Renard et al. 2000); entre otras.

Una herramienta de selección de antígenos vacunales cada vez más usada es la “vacunología inversa”, donde se utilizan criterios como alta tasas de expresión, importancia fisiológica, baja similitud con genes ortólogos del huésped, etc.(Lew-Tabor & Rodriguez Valle 2016) De esta manera, se llega a antígenos candidatos con mayores posibilidades de desarrollar protección (Maritz-Olivier et al. 2012). Otra metodología es la selección de epítopes protectores y la remoción de epítopes que no son inmunogénicos o que interfieren en la respuesta protectora inmune, aumentando así la protección desarrollada contra la infestación por la garrapata. Todos estos análisis en conjunto vienen siendo recientemente aplicados con éxito (Patarroyo et al. 2002)(Patarroyo et al. 2009) (Nuccitelli et al. 2011) (Singh et al. 2012) (Skwarczynski et al. 2012).

2. JUSTIFICATIVA:

La justificación básica del presente estudio es la evidente carencia de investigación relevante sobre la proteína Bm05br en la garrapata *R. microplus*, la cual es la causante de mayores perjuicios económicos a nivel nacional. Hasta ahora, como puede fundamentarse en la bibliografía, se han constatado resultados alentadores para rHq05 donde se mostró que la misma podría ser un potencial candidato para una vacuna contra garrapatas. Asimismo, recientemente, un análisis de proteómica identificó la presencia de Bm05br, homólogo de Hq05, en la saliva de *R. microplus* (Tirloni et al. 2014).

3. OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la importancia de Bm05br en la fisiología de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y determinar la capacidad de rBm05br de inducir una respuesta inmunoprotectora contra dichas garrapatas mediante ensayos clínicos controlados en establo.

3.1. Objetivos específicos:

- a) Comparar la secuencia de Bm05br con homólogos a Bm05br clonados de otras especies y poblaciones de garrapatas;
- b) Evaluar el grado de transcripción de Bm05br en tejidos y estadios de garrapatas por PCR cuantitativa (qPCR);
- c) Inmunolocalizar Bm05br en los tejidos de garrapatas por Western blot e Inmunohistoquímica;
- d) Determinar el efecto del silenciamiento del gen *Bm05br* de *R. microplus* por RNAi
- e) Determinar la capacidad inmunoprotectora de rBm05br contra *R. microplus* mediante:
 - i) Ensayos de alimentación de garrapatas “*in vitro*” con tubos capilares;
 - ii) Ensayos en bovinos en boxes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1. Muestras utilizadas:

A continuación se realizará una descripción de las diferentes muestras y tejidos de garrapatas que fueron utilizados en los diferentes experimentos.

4.1.1. Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa Porto Alegre:

Garrapatas de cepas Porto Alegre fueron criadas en terneros transportados de zonas naturalmente libres de garrapatas y mantenidos aislados en boxes de Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. Los terneros fueron infectados con larvas de garrapatas de 15 días de edad. Luego de 22 días, las hembras de garrapatas teleógenas y partenógenas fueron colectadas. Asimismo para la obtención de larvas y huevos de dichas garrapatas, teleógenas fueron incubadas para postura. Las hembras fueron incubadas a 28 °C y 80% de humedad relativa.

4.1.2. Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa Mozo:

Garrapatas de cepas Mozo fueron criadas en terneros traídos de zonas naturalmente libres de garrapatas y mantenidos aislados en boxes del División Laboratorios Veterinarios (DILAVE), Montevideo, Uruguay. Los terneros fueron infectados con larvas de garrapatas de 15 días de edad. Luego de 22 días, las hembras de garrapatas teleógenas y partenógenas fueron colectadas. Las hembras fueron incubadas a 28 °C y 80% de humedad relativa.

4.1.3. Garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato:

Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato originarias de colonias de “especies tropicales” de *R. sanguineus* sensu lato, establecidas en la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Brasil .(Cunha et al. 2009) fueron mantenidas en infestaciones experimentales en conejos New Zealand. Las garrapatas partenógenas (5 días post-infección) fueron colectados directamente de conejos,

mientras que la teleógenas fueron colectadas cuando cayeron espontáneamente del conejo. Las garrapatas fueron incubadas a 28 °C y 80% de humedad relativa.

4.1.4. Disección de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato y obtención de otros tejidos

Para llevar a cabo la disección de las garrapatas, las mismas fueron lavadas con etanol al 70% y enjuagadas con PBS estéril antes de la extracción de los distintos tejidos. Para la disección se colocaron las garrapatas sobre gotas de PBS estéril utilizando placas de Petri, mantenida sobre hielo. Se realizó un corte en la parte ventral de la garrapata, con el fin de levantar la cutícula ventral y poder observar y obtener los diferentes órganos. Luego de removidos los diferentes órganos los mismos fueron colocados en microtubos estériles mantenidos en hielo y conteniendo PBS (para obtención de proteínas) y TRIzol[®] (para obtención de RNA).

Los tejidos obtenidos de garrapatas teleógenas y partenógenas fueron: glándula salival (GS), ovario (OV), cuerpo graso (CG) e intestino.

También se obtuvieron tejidos de ovarios y glándulas salivales de diferentes pesos (desde 10 mg a 270 mg) de garrapatas partenógenas con el fin de realizar análisis de expresión génica y expresión de proteínas.

Otros tejidos obtenidos fueron de larvas (de 16 días), huevos (de 14 y 18 días) y machos de garrapatas *R. microplus* cepa Porto Alegre. Para la obtención de estos tejidos, los mismos fueron homogeneizados por congelamiento en nitrógeno líquido y luego se realizó una molienda de los mismos utilizando un mortero y un pistilo.

Para la obtención de hemolinfa, garrapatas teleógenas fueron lavadas con etanol 70% e inmovilizadas en placas de Petri mantenidas en hielo, la cutícula de dichas garrapatas fue cortada levemente con un bisturí estéril y la hemolinfa fue colectada con pipeta y conservada a -20 °C. Para la colecta de saliva se inyectó garrapatas teleógenas y partenógenas con pilocarpina, siguiendo el protocolo utilizado por Tirloni et al. (2014).

Para la obtención de cemento, las garrapatas fueron removidas de los terneros y el cemento mantenido en el hipostoma fue extraído con pinzas de dirección. Dicho cemento fue colocado en microtubo con PBS y se realizó la molienda con pistilo y fue mezclado con buffer de muestra (0,5 M Tris, pH 6,8, con 10% SDS, β -mercaptoethanol 3% y glicerol 30%) en una relación: dos volúmenes de suspensión de cemento por un volumen de buffer de muestra. La mezcla fue hervida 5 minutos y centrifugada a 14.000 g por 10 min (Bishop et al. 2002), trabajándose posteriormente con el sobrenadante.

Cuadro1: Muestras, tejidos y experimentos donde fueron utilizados:

Muestras	Tejidos	Experimento	Número utilizado
Garrapatas teleógenas (<i>R. microplus</i> cepa Mozo, <i>R. sanguineus</i> sensu lato)	Ovarios	Clonado de Bm05uy y Rs05br	5 a 10 garrapatas
Garrapatas teleógenas y partenógenas	Glándula salival, Ovario, Cuerpo graso, Intestino, larvas (de 16 días), huevos (de 14 y 18 días)	Expresión génica por qPCR	5 a 10 de cada órgano
Garrapatas partenógenas	Ovarios de garrapatas de 10, 16, 24, 35, 53, 84, 187,270 mg peso	Expresión génica por qPCR	5 a 10 garrapatas de cada peso.
Garrapatas teleógenas y partenógenas	Glándula salival, Ovario, Cuerpo graso, Intestino, Saliva, hemolinfa y cemento	Inmunolocalización por Western blot	5 a 10 de cada órgano
Garrapatas partenógenas	Glándula salival y ovarios de pesos hasta 20 mg, de 21 a 40mg y de 41 a 70 mg	Inmunolocalización por Western blot	10 garrapatas de cada grupo
Garrapatas teleógenas y partenógenas	Ovarios	Inmunolocalización por Inmunohistoquímica	20 para cada bloque
Garrapatas partenógenas	Ovarios de garrapatas de pesos entre 32 a 40 mg., de 50 a 57 mg, de 74 a 96 mg., de 164 a 207 mg y de 245 a 291 mg.	Inmunolocalización por Inmunohistoquímica	5 a 10 garrapatas de cada peso.

Garrapatas partenógenas	Ovários de garrapatas de 25 a 45 mg	Expresión génica por qPCR para RNAi	4 tejidos analizados individualmente
--------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------

4.2. Clonado de la secuencia codificante para la proteína *Bm05uy* y *Rs05br* en un vector de expresión procariota

4.2.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA de los diferentes tejidos de las garrapatas fue realizada utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) de la siguiente manera:

Se realizó un homogeneizado de cada tejido obtenido en 1 ml de TRIzol® y se colocó en vortex por unos seg. Luego se centrifugó a 15.000 g por 2 min para remover el material insoluble. Se colectó el sobrenadante y se lo centrifugó por 5 min a temperatura ambiente con el fin de producir la disociación de nucleoproteínas. Luego se adicionó 200 µl de cloroformo, mezclándolo vigorosamente y después se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4 °C, colectándose la fase acuosa superior (sobrenadante) a la que se le adiciono 500 µl de isopropanol al 100% y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 12.000 g por 10 min a 4 °C, se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70%. Se secó el pellet por 5 a 10 min y se suspendió el mismo en aproximadamente 10 µl de H₂O DEPC. Cuando se trabaja con RNA es necesario ser cuidadoso para evitar las posibles contaminaciones y degradación del RNA utilizando material esterilizado.

4.2.2. Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA

El RNA fue cuantificado y fue comprobada su pureza por espectrofotometría a 260/280 nm, utilizándose un espectrofotómetro SP-2000UV UV-Visible Spectrophotometer. Se realizó una dilución 1:500 del RNA a cuantificar (499 µl de H₂O DEPC y 1 µl de muestra) y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La cantidad de µg/µl se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Dilución} \times \text{coeficiente de extinción} \times \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

La concentración de RNA se calculó teniendo en cuenta que:

$$1 \text{ Unidad de } \text{DO}_{260} = 40 \mu\text{g de RNA} / \text{ml}$$

Además mediante esta medida se puede obtener una idea de la pureza del RNA:

- Si la relación $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} < 2$, indica que hay contaminación con proteínas o fenol y no se puede realizar una cuantificación precisa.
- Si la relación $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} = 2$, proporciona una estimación de la pureza del RNA y permite calcular la concentración del RNA presente en la muestra.

4.2.3. Tratamiento con DNasas

Para esto se utiliza el kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade) (Invitrogen). Para cada reacción se mezclan 1 μg de RNA, 1 μl de buffer 10X DNase I Reaction Buffer y 1 μl de la enzima DNase I, Amp Grade, 1 U/ μl , completando para 10 μl con agua DEPC. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos, pasado ese tiempo se añade 1 μl de solución de 25 mM EDTA, para cada 10 μl de reacción, y se incuba a 65 °C durante 10 minutos. El resultado del tratamiento con DNase I, fue confirmado por medio de la realización de un PCR cualitativo utilizando primers específicos de actina (Da Silva Vaz et al. 2005) y el RNA tratado con DNase como molde.

4.2.4. Transcripción Reversa

Fue realizada una Transcripción Reversa (RT) para obtener DNA copia (cDNA) a partir de los RNA obtenidos previamente. Para ello realizamos una mezcla de reacción utilizando los siguientes reactivos para cada muestra: 2 μl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl de desoxinucleótidos tri-fosfatos (dNTPs) a una concentración de 10 mM, 500 μg de cada muestra de RNA y cantidad suficiente de H₂O DEPC para completar un volumen final de 13 μl . Esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 min e inmediatamente se colocó en hielo. A continuación se adicionaron a la

mezcla 4 µl de First-Strand Buffer 5X, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de la enzima DNA polimerasa RNA dependiente SuperScript™ III RT (Invitrogen) en una concentración de 200 unidades de enzima (U)/µl. Se mezcló bien los componentes de la mezcla y se incubó a 50 °C por 60 min y 70 °C por 15 min en un termociclador Infinigen Thermal Cycler TC-XX/H. El cDNA resultante fue guardado a -70 °C hasta su utilización.

4.2.5. Amplificación por PCR cualitativo

Luego de obtenido el cDNA de los diferentes tejidos de las garrapatas se realizó una amplificación por PCR, utilizando primers específicos, proyectados en base a la secuencia del gen de *R. microplus* (T15540) depositada en BmiGI-TIGR Gene Indices (TGI)(Guerrero et al. 2005) y en Gao et al., (2009):

- Primer forward: 5' ATGGTGGCTTTCAAGGCAGCC'3;
- Primer reverse: 5' TAACCATGGGCCGGCGC'3

y primers específicos de actina como control (Da Silva Vaz et al. 2005).

Se realizó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra: 35 µl de agua Mili-Q; 5 µl Buffer A (Invitrogen); 5 µl Buffer B (Invitrogen); 1 µl de los primers forward y reverse respectivamente, a una concentración 10 µM, 1 µl de Elongase® Enzyme Mix (Invitrogen) y 1 µl de cDNA obtenido previamente por RT, consiguiendo así un volumen final de 50 µl. Las condiciones de la reacción de PCR fueron una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 34 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 59 °C, 1:30 min a 68 °C y una extensión final a 68 °C por 5 min. Las mismas se llevaron a cabo en un termociclador Infinigen Thermal Cycler TC-XX/H.

Con el fin de observar los productos obtenidos por PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE con 5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml por cada 100 ml. Se sembraron en cada pocillo 5 µl de los productos de PCR con 1 µl de buffer de carga 6X (Promega). Además, en un pocillo se sembró como referente de corrida un marcador de peso molecular Lambda HindIII DNA Markers (Invitrogen). La corrida fue realizada por 15 min a 200 voltios. El DNA se

visualizó mediante exposición a la luz UV.

4.2.6. Ligación de productos de PCR con el vector pGEM-T

Los productos amplificados por PCR codificante para *Bm05uy* o *Rs05br* luego fueron ligados al vector pGEM-T[®] (Promega). Dicho vector utilizado para clonar el producto de PCR se encuentra proyectado para ligar secuencias de DNA con adenina en sus extremos 5' como poseen los productos de amplificación cuando se utilizan polimerasas con actividad transferasa terminal como la *Taq*. La enzima *Elongase* carece de esa actividad. Por este motivo, previo a la ligación se realizó la adición de adenina a los productos de PCR, para lo cual se utilizó 1 µl *Taq* DNA Polymerase 10X Reaction Buffer (Fermentas), 1µl *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) (5 U/µl), 0,2 µl dATP (10 mM), 0,8 µl MgCl₂ (25 mM) y 2 µl de H₂O DEPC. De este modo, la enzima *Taq* DNA Polymerase adiciona adeninas a los extremos del producto, permitiendo el posterior clonado en vectores T. Esta mezcla de reacción se dejó a 72 °C por 20 min en termociclador Infinigen Thermal Cycler TC-XX/H. Para realizar la ligación se utilizó la T4 DNA Ligasa y el 2X Rapid Ligation Buffer provenientes del kit pGEM-T[®]-Easy Vector System, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Promega). Se utilizó una relación molar plásmido-inserto 1:1. Dado que el tamaño del inserto con la secuencia codificante para *Bm05br* y *Rs05br* (516 y 522 pb) es 5,8 veces menor que el tamaño del plásmido (3.015 pb), se utilizó una cantidad 10 veces menor de inserto que de plásmido en ng.

4.2.7. Transformación de la cepa *E. coli* TOP10 por choque térmico

Una vez realizado el ligado al vector pGEM-T, se procedió a realizar la transformación por choque térmico. Para dicho procedimiento se preparó competentemente (protocolo descrito en Anexo 3, b) a la cepa bacteriana *E. coli* TOP10 (Invitrogen) (se describe en Anexo 3, a). Una vez que se obtuvo la cepa bacteriana competente, se llevo a cabo la transformación para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

Se retiraron las células componentes de freezer (-70 °C) y se colocaron en hielo. Se les agregó 2 µl de DNA plasmídico de interfase, incubándose en hielo por 20 a 40 min. Luego se incubaron a 42 °C por 40 seg y se incubaron nuevamente en hielo por 1 min. Se adicionó 1 ml de LB mediante técnica aséptica y se incubó a 37 °C por 1 hora, de forma tal de permitir a la bacteria recuperarse y expresar la resistencia al antibiótico que lleva el plásmido. Posteriormente se centrifugó a 5.040 g por 5 min y se plaqueó en condiciones de esterilidad 100 µl en placas conteniendo LB con ampicilina (50 mg/ ml), Xgal (20 mg/ml) e IPTG (0,1 M). Se incubaron las placas overnight a 37 °C. El reconocimiento de colonias portadoras de plásmidos *pGem-Bm05uy* o *pGem-Rs05br* se realizó mediante la visualización de la ausencia de actividad β-galactosidasa sobre el sustrato cromogenico.

4.2.8. Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (Mini-prep)

A partir de una placa fresca con células transformadas con el plásmido a extraer, se tomó una colonia aislada y se inoculó en 2,5 ml de LB con ampicilina. Se dejó incubar overnight a 37 °C en shake (160 rpm). Se centrifugó las células a 12.000 g durante 30 seg para obtener un precipitado. Se removió y descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellets de bacterias en 100 µl de solución I (ver Anexo Soluciones), agitando vigorosamente en el vortex. Se incubó 10 min en hielo. Se adicionó 200 µl de Solución II (ver Anexo Soluciones), (la cual fue preparada en el momento) y se homogeneizó el contenido invirtiendo el microtubo rápidamente por 5 veces, colocando en hielo por 5 minutos como máximo. Luego se colocó 150 µl de solución III (ver Anexo Soluciones), se homogeneizó en vortex levemente y colocó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a microtubo nuevo. Se adicionó 1 volumen de fenol (450 µl), se agitó levemente y se centrifugó 12.000 g por 5 min. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo. Luego se agitó, centrifugo y colectó nuevamente. Se adicionó 1 volumen de cloroformo y se volvió a agitar, centrifugar y colectar de igual forma que antes. Se precipitó el DNA con 1 ml de etanol helado 100% y 40 µl de

Acetato de sodio 3 M (pH 5,2). Se incubó a -70 °C por 1 hora. Se centrifugó a 12.000 g por 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se invirtió el tubo en papel absorbente para secar. Luego se lavó el pellets con 1 ml de etanol 70%. Se descartó el etanol y dejó secar bien sobre papel por 10 min. Por último se resuspendió el material en 20 µl de solución conteniendo RNAsa (20 µg/ml) y se incubó por 30 min a 37 °C.

4.2.9. Digestiones con enzimas de restricción *Eco RI* y *Hind III*

Se realizó la digestión de los productos obtenidos de la fase anterior mediante las enzimas *EcoRI* (Fermentas) y *Hind III* (Fermentas). Se realizó una reacción que contuvo aproximadamente 150 ng/µl de productos, 1 µl de 10X Buffer *EcoRI*, 1 unidad de enzimas *Eco RI*. Luego se incubó a 37 °C durante 2 horas. Para las enzimas *Hind III*, se procedió de igual manera, solo se cambio el buffer de la reacción, usándose 10X Buffer R y enzima *Hind III*, en igual proporción que para *Eco RI*. Previo a la digestión con las enzimas de restricción se realizaron corridas en geles de agarosa con el fin de estimar la concentración de DNA de las muestras, para lo cual se las comparó con el marcador de peso molecular Lambda HindIII DNA Markers (Invitrogen). Posteriormente a la digestión con las enzimas de retricción tambien se realizaron electroforesis en geles de agarosa.

4.2.10. Secuenciación de DNA

Para la secuenciación del plásmido pGEM-T se utilizó los primers T7 y SP6. Posteriormente las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos GenBank. Para la visualización y edición de secuencias se utilizó el programa BioEdit (Hall 1999).

4.3. Caracterización *in silico* de las propiedades de las secuencias de Bm05br, Bm05uy y Rs05br

4.3.1. Alineamiento de secuencias

El análisis de las secuencias nucleotídicas, aminoacídica y los alineamiento de secuencias fueron realizados usando el software BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999) y MEGA versión 5.05 (Tamura et al. 2011). La predicción de la secuencia del péptido señal fue investigada utilizando SignalP4.1 (Nielsen et al. 1997). N-glycosylation fue investigada usando el programa NetNGlyc 1.0 (Gupta et al. 2002).

4.3.2. Construcción de Árbol filogenético

Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de *Bm05br*, *Bm05uy* y *Rs05br* obtenida por secuenciamiento y otras secuencias identificadas por el programa Blast de NCBI (Tatusova & Madden 1999) fueron utilizadas para el análisis filogenético y para la realización de un árbol filogenético usando el método *neighbor-joining* y *maximum-likelihood* con 1.000 y 10.000 repeticiones. Los número de acceso a GenBank de las secuencias usadas en el trabajo fueron: *R. microplus* Bm05br (KX611485), *R. annulatus* Ba05 (EF675686), *Haemaphysalis longicornis* (GQ499841.1), *I. scapularis* P19 (XM_002399589.1), *H. qinghaiensis* Hq05 (AY626791.1), *R. sanguineus* sensu lato Rs05br (KX611486), *R. microplus* Bm05uy (KX611484), *Pandinus cavimanus* (XM_015938856.1)

4.4. Análisis de expresión de Bm05br por PCR cuantitativo

4.4.1. Material utilizados:

Para realizar la determinación de la expresión génica de *Bm05br* en los diferentes tejidos y estadios del desarrollo de las garrapatas, se utilizaron muestras de RNA tratadas con DNase I, obtenidas de garrapatas partenógenas y teleógenas, como ser: glándula salival, ovario, cuerpo graso e intestino, larvas (16 días) y huevos (14 y 18 días). Asimismo, garrapatas partenógenas fueron

agrupadas por peso (10 garrapatas en cada grupos) Los pesos utilizados fueron desde 10 mg hasta 270 mg, según fue descripto en el cuadro 1.

El procedimiento utilizado para la extracción de RNA y obtención de cDNA se realizó según lo descripto en la pagina 51.

4.4.2. Diseño de los primers

El diseño de los primers es un parámetro clave para el buen funcionamiento y amplificación de la PCR. Según Chuang et al. (2013) para diseñar los cebadores hay que tener en cuenta diferentes aspectos que pueden afectar a la eficiencia de la reacción como la longitud del cebador, la temperatura de anillamiento o la especificidad. Para la amplificación del gen *Bm05br* se diseñaron primer específicos que amplifican un fragmento de 133 pb (forward: 5' TTCGACCGTGCCAGGACTGAG'3 reverse: 5'TGCACTTGAGCCACGAACTGGT'3), mientras que para la amplificación de 40S ribosomal, utilizado como gen de referencia, se utilizaron los primer ya diseñados por Parizi y col. (Parizi et al. 2013) de 106 pb, (forward: 5'ACGACCGATGGCTACCTCCTCCGC'3 reverse: 5'TGAGGCGAACCTGGTTGTGCTGAGCG'3).

4.4.3. Curva estándar y cálculo de eficiencia de amplificación

Es necesario conocer la eficiencia de PCR de los genes estudiados. Las eficiencias de la qPCR se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la qPCR. Para calcular las curvas estándar se llevó a cabo una qPCR para la cual se utilizan las diluciones seriadas (10, 50, 100, 200 y 500 ng) de cDNA seleccionado, todas por duplicado (repetido dos veces) para minimizar los errores.

La mezcla de reacción para la qPCR consiste en 12,5µl de Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, 1µl de Primer Forward, 1 µl de Primer Reverse, 7,5µl de agua DEPC y 3µl de la dilución del cDNA correspondiente. La reacción de qPCR se lleva a cabo en un termociclador *Rotor*

Gene[®] Q, (Qiagen). Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes: 5 min at 95 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anillamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Luego de realizada la amplificación, la curva de melting fue analizada usando los parámetros del instrumento (Rotor Gene[®] Q, Qiagen).

Finalizada la amplificación se comprueba que las mismas son las deseadas mediante el análisis de la curva estándar. Si la pendiente de la recta presenta un valor en torno a -3,32 nos estaría indicando que las curvas estándar presentan unas buenas características. El valor de la pendiente de la curva, se utiliza para calcular la eficiencia de amplificación de los primers la cual debe ser superior al 90% para que pueda ser considerada como aceptable. La eficiencia de amplificación se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{EFICIENCIA (E)} = 10^{-1/\text{pendiente}}.$$

$$\text{Si la eficacia es 100\%: } E = 10^{-1/-3,32} = 2$$

La concentración utilizada de primer para los experimentos de qPCR fue de 10 µM, dicha concentración fue definida por medio de la curva de eficacia de primers. La eficacia de los primers fue corroborada previamente en condiciones semejante a las utilizadas para la curva de eficacia ya descrita. Fueron testadas diferentes diluciones de primers (10, 15, 20 y 25 µM).

4.4.4. Cuantificación mediante qPCR del nivel de expresión de las muestras

La cuantificación relativa fue realizada utilizando 100 ng de cDNA de cada muestra. Se realizó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra: 12,5µl de Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, 1µl de Primer Forward, 1 µl de Primer Reverse, 7,5µl de agua DEPC y 3µl de la dilución del cDNA correspondiente a 100 ng. Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes: 5 min at 95 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C for 30 s, anillamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Luego de realizada la amplificación, la curva de melting fue analizada usando los parámetros del instrumento (Rotor Gene[®] Q, Qiagen). Todas las muestras fueron analizadas en duplicado y cada experimento fue realizado dos veces.

Para la cuantificación del nivel de expresión del gen *Bm05br* se utiliza la cuantificación relativa, es decir basándonos en la comparación con el nivel de expresión de genes de referencia. El gen de referencia seleccionado fue 40S ribosomal que cuentan con una expresión estable constatada en las condiciones estudiadas.

4.4.5. Análisis de los resultados de la expresión de las muestras

La cuantificación del nivel de expresión del gen *Bm05br* se realiza utilizando una cuantificación relativa mediante el modelo matemático de (Pfaffl 2001) y usado en el software (REST-MSC[®], versión 2) (Pfaffl et al. 2002). El valor de CP es el número de ciclos donde el producto amplificado se eleva por encima de un umbral determinado, de los genes de estudio con los genes de referencia.

En este modelo las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target (control-sample)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref (control-sample)}}}}$$

En esta ecuación el ratio del gen en estudio se expresa en una muestra frente a un control en comparación con un gen de referencia. E_{target} representa la eficiencia de la qPCR del amplicon en estudio; E_{ref} representa la eficiencia de la qPCR del gen de referencia; $\Delta CP_{\text{target}}$ es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen en estudio; y ΔCP_{ref} es la desviación en Ct del control menos la muestra del gen de referencia.

Los experimentos de qPCR fueron realizados de acuerdo con MIQE Guidelines (Bustin et al. 2010) (Fig S2).

La eficacia del PCR fue calculada de la porción logarítmica de la curva estándar. Los datos fueron corregidos para eficacias (arriba de 90%) de cada primer individualmente, seguido por normalización de la expresión según el gen de referencia.

4.5. Inmunolocalización de Bm05br

4.5.1. Expresión de rBm05br y producción de suero anti Bm05br

Las etapas de expresión y producción de la proteína recombinante (Bm05br), purificación de rBm05br, así como producción de anticuerpos, fueron realizadas y detalladas en la tesis de maestría de Alzugaray (2012). Brevemente, para la expresión de Bm05br se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) la cual fue transformada con el vector de expresión pET5a conteniendo la región codificante de Bm05br. La proteína recombinante Bm05br fue expresada en medio SOB con 1 mM de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a 37 °C por 4 horas. Luego de centrifugar (10.000g por 5 min a 4 °C), el pellet celular fue resuspendido en buffer de ligación. La disrupción celular fue realizada por sonication en hielo por medio de 5 pulsos de 30 seg e intervalos de 30 seg, de amplitud 40 MHz. La fracción soluble e insoluble fue separada por centrifugación a 10.000 g por 20 min a 4 °C. La fracción soluble conteniendo Bm05br fue purificada en columna de cromatografía de níquel sefarosa (HisTrap, GE Healthcare). Para ello, las muestras fueron filtradas con filtros con membranas de poros de 0,45 μ m y las muestras fueron aplicadas luego de que la columna fuera equilibrada con buffer de ligación. La elución de las proteínas fue realizada con un gradiente de imidazol (100, 200, 300 y 500 mM). La concentración proteica fue determinada utilizando el kit BSA Protein Assay (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la producción del anticuerpo anti Bm05br, un conejo fue inmunizado subcutáneamente tres veces con intervalos de 14 días con 100 μ g de rBm05br emulsificada con adyuvante Montanide 888/Marcol 52 (Exxon Mobil Corporation). La sangre del conejo fue colectada 14 días luego del último booster y el suero fue separado por centrifugación a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Alícuotas de suero fueron conservadas a -20 °C hasta su uso. Se realizó purificación de IgG utilizando columnas de HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.5.2. Material utilizado:

Para realizar la determinación de la expresión proteica de Bm05br en los diferentes tejidos y estadios del desarrollo de las garrapatas, se utilizaron muestras obtenidas de garrapatas partenógenas y teleógenas, como ser: glándula salival, ovario, cuerpo graso, intestino, saliva, hemolinfa y cemento. Asimismo, garrapatas partenógenas fueron agrupadas por peso (10 garrapatas en cada grupos) Los pesos utilizados fueron desde 10 mg hasta 270 mg; según fue descripto en el cuadro 1.

De igual manera se procedió para la obtención de muestras de ovarios destinadas a inmunolocalización por Inmunohistoquímica, mas detalles de dichas muestras se describen en el cuadro 1.

El procedimiento utilizado para la extracción de proteínas fue descripto en la pagina 51.

4.5.3. Extracción y preparación de extracto proteico:

Todos los tejidos extraídos fueron colocados en PBS y macerados con pistilo en microtubo colocado en hielo. El homogeneizado fue posteriormente centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4 °C para remover la parte la remoción del material insoluble y el sobrenadante soluble fue colectado. Los extractos proteicos fueron realizados de acuerdo con el método descripto por (Da Silva Vaz et al. 1998). Brevemente los tejidos fueron sonicados, solubilizados con desoxicolato de sodio al 0,5% y centrifugados por 32.000 xg por 40 min.

4.5.4. SDS page y western blot

La presencia de Bm05br nativa en los tejidos de garrapatas fue analizada utilizando SDS-PAGE (Laemmli 1970) y Western blot (Johnson et al. 1984). Para los análisis de Western blot se utilizó 20 µg de saliva, 60 µg de hemolinfa y 50 µg de cada tejido de garrapata partenógena y teleógena los cuales fueron corridos en geles de SDS-PAGE al 12%, seguidos por transferencia a membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con buffer de bloqueo (5% de leche

descremada con 0,1% Tween en PBS). El suero anti Bm05br fue diluido en buffer de bloqueo y absorbido por 1 hora con lisado de *E. coli* expresando vector pET5a. El lisado *E. coli* con pET5a fue preparado de acuerdo con Rott et al. (2000). Las incubaciones con el anticuerpo primario fueron realizadas overnight con suero policlonal anti rBm05br 1:1.000). Suero pre-inmune fue utilizado como control negativo (1:1.000). Las tiras incubadas en las distintas diluciones de suero de conejo se colocaron overnight a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con solución de bloqueo por 5 min cada uno. Luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo fosfatasa alcalina (Invitrogen) (1:5.000) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a realizar lavados con PBS Tween, lavó con TRF (Buffer de revelación para Fosfatasa alcalina) y se reveló con el sustrato cromogénico NBT/BCIP (Nitro-blue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3'-Indolyphosphate p-toluidine salt, Promega) en buffer de reacción

4.5.5. Inmunohistoquímica

Garrapatas teleógenas y partenógenas fueron disecadas en PBS según se describe previamente, los ovarios fueron fijados en 10% formalina tamponada durante 24 h e incorporados a Histogel® para la preservación de los tejidos durante el procesamiento histológico rutinario. Luego del procesamiento, cortes histológicos de 5 µm de espesor fueron confeccionados. Las láminas histológicas fueron incubadas en xilol, hidratadas en hidrato en concentraciones decrecientes de etanol y lavadas en agua desionizadas. La inhibición de la peroxidasa endógena se realizó utilizando 3% de H₂O₂ por 20 minutos y no utilizándose métodos de recuperación antigénica. Los sitios reactivos no específicos sobre secciones de tejido se bloquearon con Protein Block (Dako®) durante 7 minutos. El sistema de detección usado fue el MACH 4 Kit Universal con HRP (Biocare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los tejidos fueron incubados overnight (14 a 16 hs) a 4 °C con anticuerpo policlonal anti-Bm05br (1:700) y usando un control negativo con PBS. De igual forma se utilizó un anticuerpo preinmune (no relacionado) para control, en las mismas condiciones que el anticuerpo anti Bm05br. Las láminas fueron posteriormente incubadas en Probe (MACH 4)

por 5 minutos, fueron lavadas con agua desionizada y posteriormente incubadas con polímero (MACH 4) por 30 minutos. Luego del lavado de las láminas con agua desionizada por 5 minutos, la reacción fue revelada con cromógeno DAB (Dako[®]) por 15 segundos, lavadas con agua desionizada por 5 minutos y contracoloradas con hematoxilina de Harris por 20 segundos. Para el montaje de las láminas estas fueron incubadas en solución de xilol para clasificación, en soluciones creciente de alcohol para deshidratación y posteriormente montadas en resina del tipo Endellan (Merck[®]).

4.6. Silenciamiento génico de Bm05br por RNAi

4.6.1. Diseño de los primers y estrategias para la transcripción del dsRNA

Los experimentos con RNAi requieren RNA de cadena doble (dsRNA). Dado que la RNA polimerasa T7 utilizada sintetiza RNA de cadena sencilla (ssRNA), se utiliza la siguiente estrategia para producir dsRNA: Se preparan primers de DNA con promotores T7 opuestos en los extremos 5' de cada hebra, y los mismos fueron usados en una sola reacción de transcripción para sintetizar dsRNA sin un paso de unión o anillamiento.

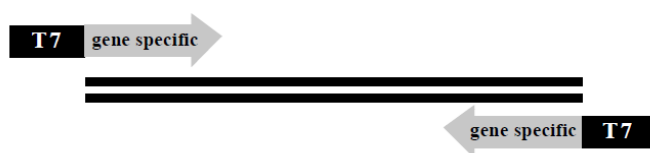


Figura 6: Esquema de PCR con el promotor T7 añadido a ambos primers de PCR

La secuencia de Bm05br (516 pb) fue amplificada por PCR desde el plásmido recombinante pET5a/Bm05br con primers gen específicos conteniendo el promotor T7 en el extremo 5',
(forward: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTGGCTTTCAAGGCAGCC'3
reverse: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACCCTGGATCTGAATGCCA'3).

El producto de PCR fue purificado utilizando Glassmilk DNA purification kit (BIO101Systems) y posteriormente dicho producto fue utilizado para síntesis de dsRNA usando T7 Ribo Max Express RNA Kit (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Los dsRNA sintetizados fueron evaluados en geles de agarosa al 2% y la concentración fue determinada por

espectrofotómetro a 260 nm (Ultrospec 1000, Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech). Como control (dsCont) se utilizó, dsRNA producido para el gen no relacionado, MSP1 de *Plasmodium falciparum* (accession number AF061132). Este gen fue obtenido gracias a la colaboración del Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de Parasitología, USP, Brasil). Para asegurar la especificidad de dsRNA y excluir potenciales secuencias no específicas, se utilizó el programa dsCheck (Naito et al. 2005). Como el genoma de *R. microplus* no está disponible, por el momento, este análisis fue realizado basándose en regiones similares de genes ortólogos y secuencias del genoma de *Drosophila melanogaster* (accession number AC092233). Asimismo, el algoritmo BLAST fue empleado para identificar secuencias no relacionadas usando las secuencias depositadas en GenBank (Sabirzhanov et al. 2011).

4.6.2. Material utilizado:

Para realizar la determinación del silenciamiento por RNAi en garrapatas partenógenas, se seleccionó garrapatas con pesos de 25 a 45 mg. Estos pesos mostraron ser los mejores para dicho experimento ya que permitieron una eficaz alimentación artificial a través de capilares. Detalles de las muestras extraídas para RNAi se observan en el cuadro 1.

Luego de realizado el experimento de RNAi, se disecaron 4 garrapatas a las 0hs, 24 hs y 48 hs de la inyección con dsRNA, con el fin de realizar la extracción de RNA y proteínas, de forma individual, siguiendo el protocolo de TRIzol[®], según las especificaciones del fabricante. El procedimiento utilizado para la extracción de RNA a obtención de cDNA se realizó según lo descrito en la pagina 51.

Asimismo, la obtención del extracto proteico en este caso, se realizó siguiendo el protocolo de TRIzol[®], siguiendo especificaciones del fabricante.

4.6.3. Protocolo de RNAi utilizando alimentación artificial por capilares

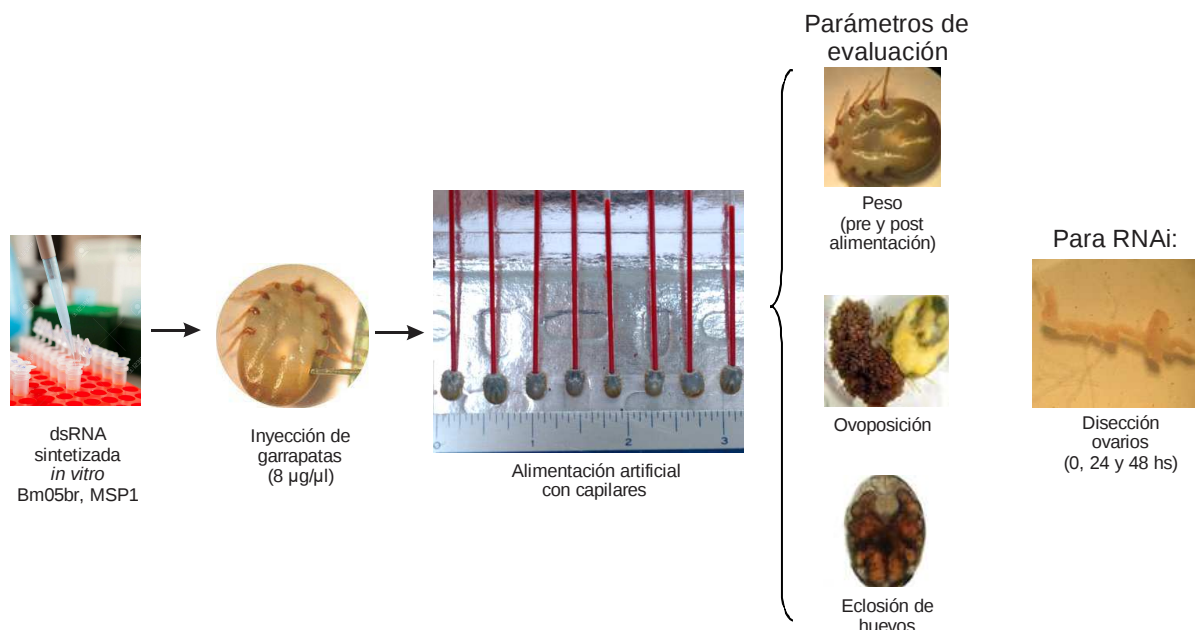


Figura 7: Flujograma de protocolo de RNAi seguido con alimentación artificial por capilares

Garrapatas partenógenas de la cepa Porto Alegre (con pesos entre 25 y 45 mg) fueron extraídas manualmente de los bovinos 20/21 después de la infestación. Se realizaron grupos de 23 garrapatas, las cuales fueron inmovilizadas en bandejas de cartón sobre cinta adhesiva. La solución de dsRNA fue inyectada en el hemocele (1 µL, 8 µg/garrapata) usando jeringas (Hamilton). Las garrapatas fueron artificialmente alimentadas a través de tubos de microcapilares conteniendo sangre citratada (citarato de sodio) de bovinos no infestados (Gonsioroski et al. 2012, Pohl et al. 2011). A las garrapatas se les permitió alimentarse por 28 hs, durante ese tiempo fueron conservadas a temperatura de 27-28 °C y humedad relativa de 80-90%. A las 0 hs, 24 hs y 48 hs luego de la inyección con dsRNA, cuatro garrapatas de cada grupo fueron disecadas y los ovarios fueron colectados para extracción de RNA y proteínas según el método de TRIzol®. La determinación de las fases de desarrollo del ovario se realizaron a través de evaluación óptica del desarrollo utilizando el sistema *ovarian growth phase* (OGP) descrito por (Seixas, Friesen, et al. 2008). La proporción de ovocitos maduros fue analizada midiendo el área ocupada por los ovocitos maduros e inmaduros en cada imagen usando el programa ImageJ (Abràmoff et al. 2004). Antes y

después del proceso de alimentación artificial, las garrapatas fueron pesadas para determinar la ingesta de sangre de cada una. Luego de eso, las garrapatas restantes (11 garrapatas) fueron colocadas en placas de Petri y mantenidas a 27 °C y 85% de humedad. Los parámetros biológicos analizados fueron (Bennett 1974, Fabres et al. 2010): Índice de eficacia nutrición (peso final/peso inicial), peso de huevos, peso de larvas e índice de eclosión $[(\text{peso de larvas}/\text{peso de huevos}) \times 100]$.

4.7. Determinación de la capacidad protectora de la *rBm05br* mediante:

4.7.1. Ensayos de alimentación artificial por capilares

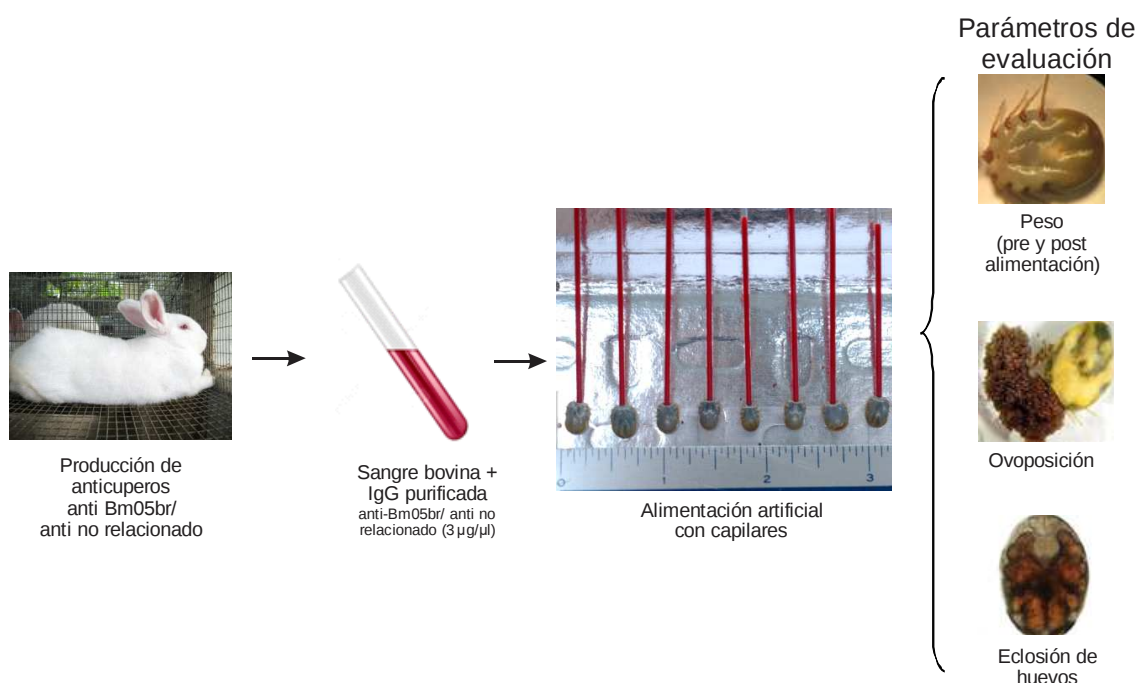


Figura 8: Flujograma de protocolo de alimentación artificial de anticuerpos anti Bm05br

Hembras partenógenas de *R. microplus* cepa Porto Alegre fueron recuperadas manualmente de bovinos 20/21 después de la infestación. Luego de limpiar y pesar se fijan en bandejas de cartón forrado. Las hembras con daños en la boca y/o con peso superior a 100 mg o inferior a 25 mg fueron descartadas (Gonsioroski et al. 2012). Luego, tubos capilares de microhematocrito (75 mm x 1.0 mm x 1.5 mm) lleno con sangre citratada de bovino fueron colocados en la parte de la boca de las garrapatas.

Las hembras fueron divididas en grupos experimentales (19 individuos) y alimentadas por

12 horas como sigue:

- Grupo alimentado con sangre citratada bovina suplementada con anticuerpos anti-*rBm05br* (dosis de 150 µg para cada garrapata: 3 µg/ µl).
- Grupo alimentado con sangre citratada bovina suplementada con anticuerpos no relacionado (dosis de 150 µg para cada garrapata: 3 µg/ µl) (Control no relacionado).
- Grupo alimentado con sangre de bovino con citrato únicamente (Control),

Luego de recibir el capilar de microhematocrito con los diferentes anticuerpos, se les dio otro capilar con sangre citratada a todos los integrantes de los grupos por igual tiempo. Luego del proceso de alimentación, las hembras fueron pesadas para determinar la ingestión de sangre. Después, fueron colocadas en placas de Petri y mantenidas a 27 °C y 85% de humedad por un período de 12 días. Una vez dada la postura, los huevos fueron pesados y colocados en tubos microtubo con algodón en la parte superior a 27 °C y 85% de humedad por 15 días, al cabo de ese período se volvió a realizar un pesaje. Los parámetros biológicos que fueron analizados, fueron los relacionados con la ovoposición (Bennett 1974), que serán presentados en los resultados. .

4.7.2. Ensayos de inmunización de bovinos en boxes

Este experimento fue un trabajo desarrollado en conjunto con una tesis de doctorado de la UFRGS. En la presente tesis solo se presentaran los resultados referentes a Bm05br. El ensayo de vacunación fue realizado utilizando dos proteínas en conjunto: Bm05br y Bm86uy (fue obtenida del clonado del RNA de intestino de garrapatas teleógenas, *R. microplus* capa Mozo, su expresión fue realizada en *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS con 1 mM de IPTG, por 4hs a 37°C)

Los bovinos fueron divididos en dos grupos: un grupo control (N° 1, 2, 3) y un grupo tratado (bovinos N° 4, 5, 6). Los bovinos del grupo control recibieron una emulsión compuesta por 0,5 ml PBS junto con 0,5 ml de adyuvante oleoso (Montanide 888 / Marcol 52) por dosis.

El grupo de animales tratado recibió una emulsión de 0,5 ml de solución de Bm05br (200 µg) en PBS junto con 0,5 ml de adyuvante oleoso (Montanide 888 / Marcol 52) por dosis, así como 0,5 ml de Bm86uy (100 µg) en PBS junto con 0,5 ml de adyuvante oleoso (Montanide 888 / Marcol 52) por dosis. Los antígenos fueron administrados subcutáneamente en diferentes lados del animal.

Ambos grupos recibieron tres dosis con un intervalo de 10 días entre cada dosis. Los bovinos fueron desafiados con 6.000 larvas de *R. microplus* de 10 días de edad (Cepa Mozo) y libre de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp.

Muestras de sangre fueron colectadas el primer día de inmunización (día 0) y 10, 30, 45, 60 y 80 días luego del último booster y las mismas fueron conservadas a 4 °C por 16 hs. El suero fue separado por centrifugación a 5.000 g por 5 min y alícuotas fueron conservadas a -20 °C.

4.7.2.1. Análisis serológico y análisis de garrapatas

La respuesta humoral de garrapatas fue verificada por Western blot y ELISA (Parizi et al. 2009). Brevemente, las placas de ELISA fueron cubiertas con 100 ng/pozo de rBm05br (fracción de elución usando buffer de elución con Imidazole 200 mM), en buffer carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,6) a 4 °C overnight. Las placas fueron lavadas tres veces con solución de lavado (0,5% Tween20 in PBS: PBST). Luego se realizó el bloqueo con 5% Tween20 a 4 °C y se lavó nuevamente. Los sueros fueron adicionados luego con una dilución de 1:6.400 en PBST e incubados por 1 hs a 37 °C. Las placas fueron luego lavadas con PBST y se utilizó una dilución de 1:10.000 de conjugado IgG anti-bovino peroxidasa en PBST blotto para la incubación secundaria, realizada por 1 hs a 37 °C. El revelado fue realizado usando 100 µl de solución de 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Invitrogen) y la densidad óptica (DO) fue medida a 450 nm con 100 µl de HCl 1 N.

Para los ensayos de SDS PAGE y Western blot, 0,36 µg de rBm05br fueron cargados en cada carril de geles de poliacrilamida al 12% seguido por transferencia en membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en PBS y posteriormente incubadas con un pool de suero de los animales vacunados con Bm05br y Bm86uy y los controles (1:500). Luego fue utilizado como anticuerpo secundario un conjugado anti IgG fosfatasa alcalina especie específica (suero bovino) (1:10.000). El revelado fue realizado utilizando NBT (nitro blue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma) en PBS.

Para el análisis de las garrapatas, las mismas fueron colectadas todos los días (a partir del día 20 post desafío). Luego garrapatas y huevos fueron pesados, clasificados e incubados como fue descrito previamente por Da Silva Vaz et al. (1998). La estimación de la eficacia de la vacuna fue evaluada por la determinación del efecto sobre el número de garrapatas teleógenas, peso de las garrapatas, ovoposición (peso de huevos/garrapatas que sobrevivieron) y fertilidad de huevos (peso de larvas/ peso de huevos) empleando la fórmula descrita previamente por Canales et al. (2009).

La eficacia de vacunación fue calculada como $100 \times [1 - (CRT \times CR0 \times CRF)]$, donde CRT, CR0 y CRF respectivamente representan el número de garrapatas teleógenas adultas, ovoposición y fertilidad de huevos comparando con el grupo control.

4.8. Análisis estadísticos:

Test estadístico ANOVA seguido por Tukey ($p < 0.05$) fueron realizados para los análisis de qPCR y qPCR de las muestras de RNAi. Para el análisis de los parámetros biológicos de RNAi y alimentación artificial fue realizado ANOVA seguido de Dunnett's ($p < 0.05$). Para todos los análisis se utiliza el programa Graph Pad Prism versión 6.00 Software (Graph Pad Software, Inc.). Para el ensayo de vacunación en boxes se utiliza el test de t de Student's ($P = 0.05$), donde fue comparado los resultados obtenidos del número total de garrapatas adultas, peso de garrapatas, ovoposición y fertilidad de huevos entre los grupos vacunado y control.

5. RESULTADOS:

5.1. Análisis de las secuencias de Bm05br, Bm05uy y Rs05br

La secuencia nucleotídica de Bm05br presenta un marco abierto de lectura (ORF) de 516 pb y una secuencia aminoacídica de 171 aminoácidos conteniendo un péptido señal con un sitio de clivaje entre los residuos aminoacídicos 19 y 20. El peso molecular predecible de la proteína madura es de 19 kDa. La proteína presenta un sitio de N-glicosilación: Asn-Glu-Thr en la posición 69-71.

El análisis comparativo de la secuencias de Bm05br y Bm05uy (clonada de garrapatas *R. microplus* cepa Mozo) indica 100% de identidad en la secuencia nucleotídica y aminoacídica.

La secuencia nucleotídica de Rs05br de *R. sanguineus* sensu lato muestra un ORF de 522 pb, codificante para un polipéptido de 173 aminoácidos con un peso molecular de 19,2 kDa. El análisis comparativo de Bm05br y Rs05br muestra un 95% de identidad en la secuencia nucleotídica y 99% de similaridad en la secuencia aminoacídica.

La comparación de las secuencias proteicas de *R. microplus* Bm05br y Bm05uy con otras secuencias homologas de garrapatas en GenBank muestran un 100% de similaridad con la secuencia de *R. annulatus* Ba05, mientras que se observa 86%, 67% y 62% de similaridad con las secuencias de *H. longicornis*, *I. scapularis* y *H. quighaiensis* respectivamente (Fig. 9)

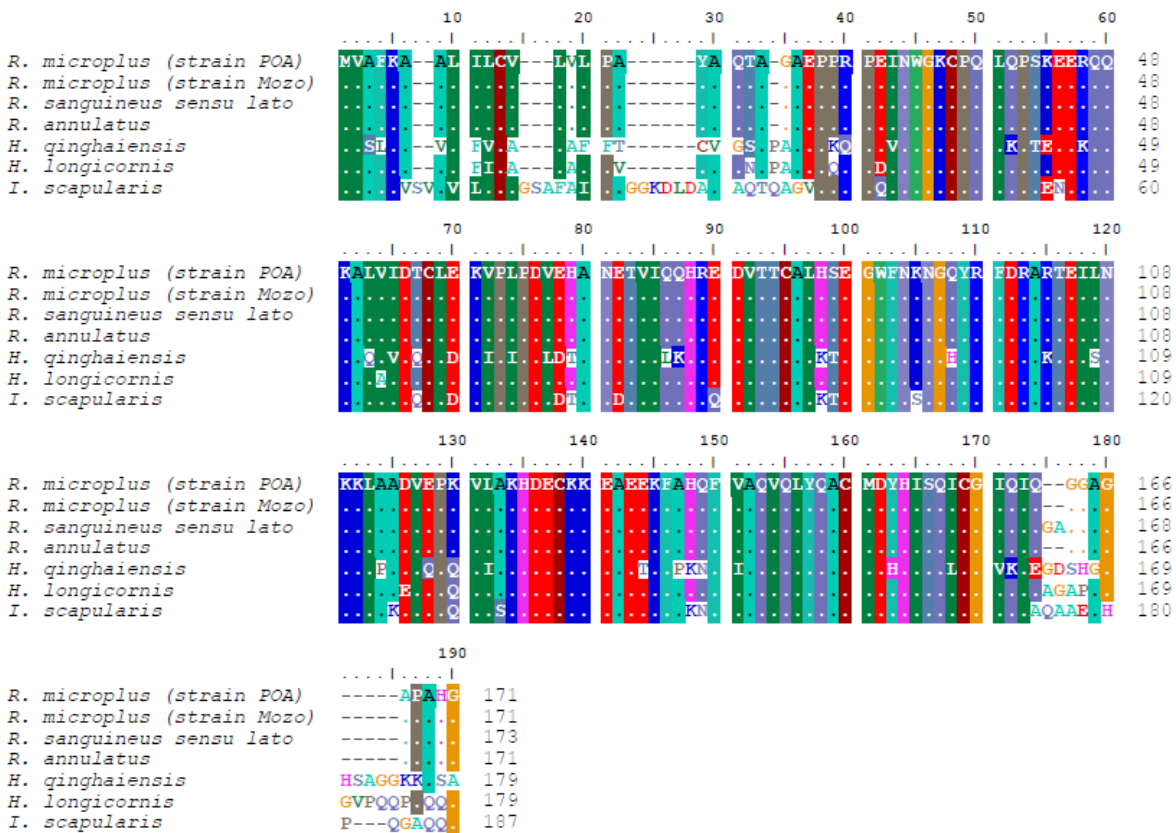


Figura 9: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducibles de Bm05br y otras secuencias similares de garrapatas. Los números de acceso al GenBank de las secuencias se encuentran en la sección Materiales y Métodos. Los números a la derecha indican el número total de aminoácidos de cada secuencia de dicha línea,

5.2. Análisis filogenético

Se realizó la construcción de un árbol filogenético con las secuencias de Bm05br, Bm05uy y Rs05br junto a otras secuencias nucleotídicas (Fig 10). Este análisis indicó que las secuencias de *Rhipicephalus* spp (*R. microplus*, *R. annulatus* y *R. sanguineus*) se agrupan en un mismo grupo. Mientras que las secuencias de *Haemaphysalis* spp (*H. longicornis* y *H. qinghaiensis*) y *Ixodes scapularis* forman un grupo distinto al de *Rhipicephalus*.

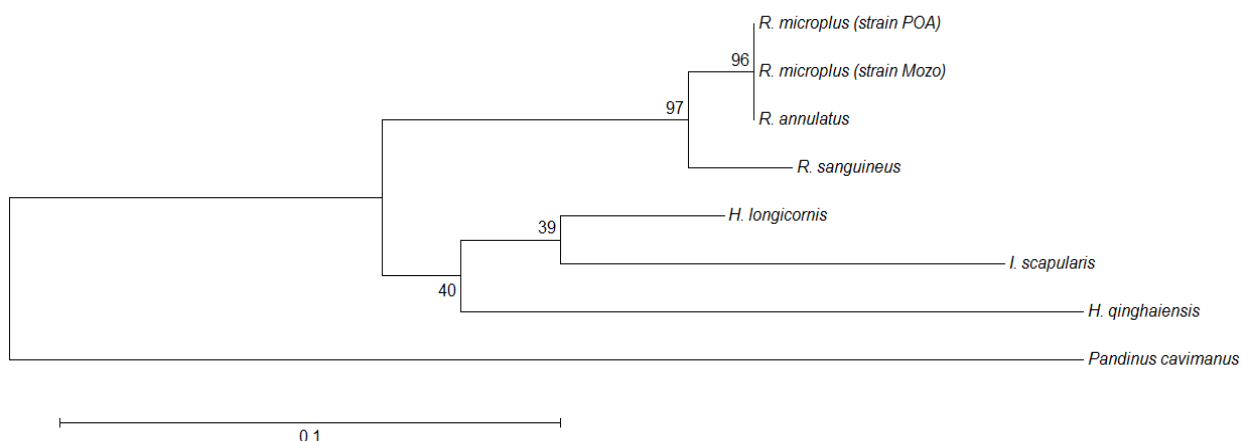


Figura 10: Árbol filogenético de *Rhipicephalus microplus* Bm05br y otras secuencias seleccionadas, generado por el programa MEGA. El árbol fue construido usando el método neighbor-joining basado en el alineamiento de nucleótidos (10,000 repeticiones). Los números de acceso al GenBank de las secuencias se encuentran en la sección Materiales y Métodos.

5.3. Perfil de expresión génica de *Bm05br*

Con la finalidad de evaluar la transcripción específica del gen *Bm05br* en los diferentes tejidos y estadios de la garrapata, se extrajo RNA total de huevos, larvas y diferentes órganos (glándula salival, ovarios, intestino y cuerpo graso de garrapatas partenógenas y teleógenas); los cuales fueron analizados por qPCR. La transcripción del gen de *Bm05br* fue detectada en todos los tejidos y estadios evaluados, excepto en intestino de garrapatas teleógenas (Fig. 11A). El mRNA de *Bm05br* estaba presente en glándula salival y ovarios independientemente del peso de la garrapata (Fig 11B, C y D). El mayor nivel de expresión del gen de *Bm05br* fue observado en cuerpo graso y glándulas salivales de garrapatas partenógenas. Asimismo, la expresión génica de *Bm05br* fue detectada en todos los estadios de desarrollo de huevos analizados. Un análisis más detallado de la transcripción del gen de *Bm05br* en glándula salival permitió observar la presencia de transcritos en garrapatas partenógenas de pesos entre 10 mg hasta 270 mg (Fig 11C).

Un perfil similar fue detectado en tejidos de ovarios de garrapatas partenógenas con el mismo rango de peso (Fig 11D).

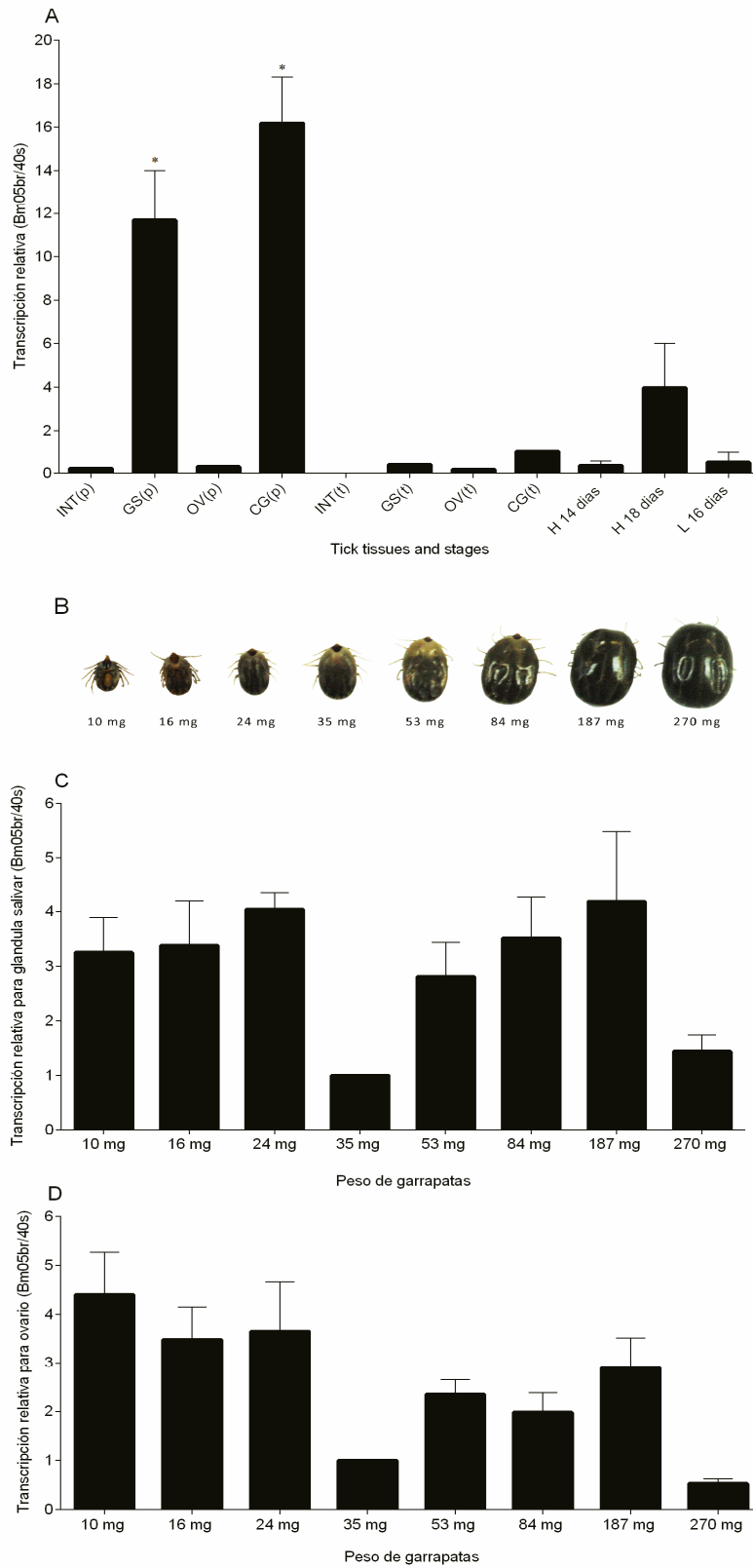


Figura 11: Perfil de expresión génica de *Bm05br* de *Rhipicephalus microplus* en diferentes tejidos y estadios de garrapatas. (A) Expresión relativa referente a la expresión de Bm05br en cuerpo graso de garrapatas teleógenas (1

unidad). (B) Imágenes representativas de diferentes pesos de garrapatas partenógenas usados en los diferentes grupos del perfil de expresión. (C y D) Perfil de expresión génica en glándula salival (C) y ovarios (D) de garrapatas de diferentes pesos. La expresión relativa se refiere a la expresión de Bm05br en glándula salival y ovarios de garrapatas partenógenas (35 mg). INT, intestino; GS, glándula salival; OV, ovario; CG, cuerpo graso; H, huevos; L, larvas; (p) partenógenas (t) teleógenas. Los números indican los días en que fueron colectados los huevos y larvas. Asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre cada parámetro entre sí determinadas por test de ANOVA seguido de test de Turkey ($P \leq 0.05$).

5.4. Identificación de Bm05br nativa con suero policlonal

La expresión de rBm05br fue realizada en *E. coli* y su purificación por cromatografía de afinidad, mediante una elución con un gradiente de imidazol (100 mM y 200 mM).

La proteína fue detectada en la fracción soluble y análisis de Western blot revelaron una proteína de aproximadamente 19 kDa (Fig 12A). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos mediante análisis *in silico* donde se estimó un peso molecular de 19,19 kDa). La recombinante Bm05br purificada fue utilizada para inmunización de conejos y producción de suero policlonal.

El suero de conejo anti rBm05br fue capaz de reconocer la proteína nativa y fue utilizado para determinar la presencia de Bm05br en tejidos de *R. microplus*. Bm05br nativa (con un peso molecular de 19 kDa) fue reconocida en ovarios y glándulas salivales de garrapatas de diferentes pesos (Fig. 12B). Asimismo, dicha proteína está presente en todos los tejidos identificados a excepción de intestino de garrapatas partenógenas y teleógenas (12C). Bm05br fue reconocida en glándulas salivales de garrapatas partenógenas de pesos correspondientes entre 21 a 70 mg así como en garrapatas teleógenas. De manera semejante, Bm05br fue identificada en saliva de garrapatas partenógenas y teleógenas y en machos de *R. microplus* (Fig. 12C). El suero pre inmune utilizado como control negativo no reconoció a Bm05br nativa en los diferentes tejidos (Fig. S1)

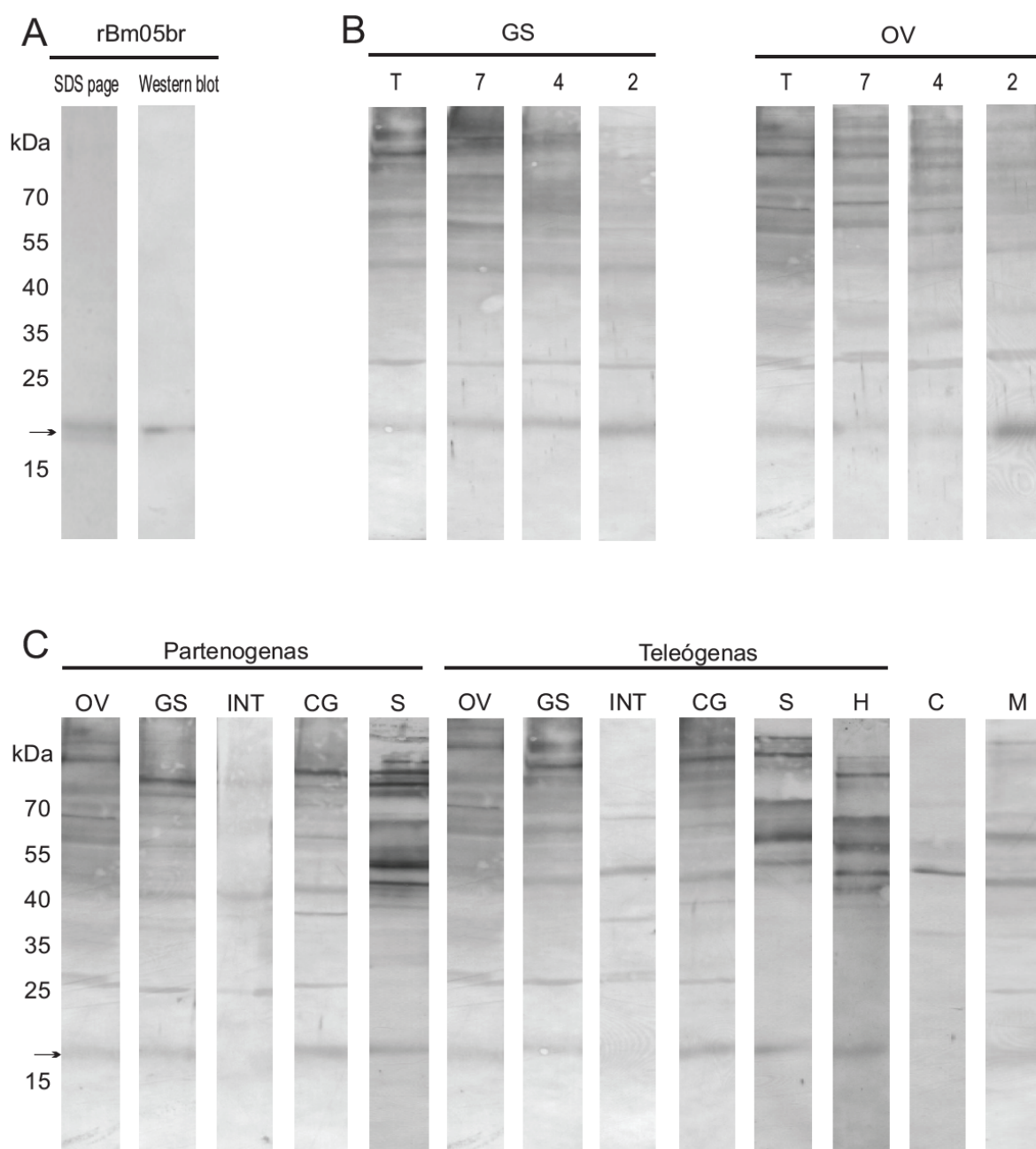


Figura 12: Presencia de Bm05br nativa en tejidos de *Rhipicephalus microplus*. (A) Bm05br recombinante analizada por SDS-PAGE al 12% teñidos con Coomassie blue G-250 y por Western blot usando anti Histidina. (B) Glándula salival (GS) y ovarios (OV) de garrapatas teleógenas *R. microplus* (T) o garrapatas partenógenas (tres grupos: 7, 41mg a 70 mg; 4, 21mg a 40 mg y 2, 20 mg o menos) fueron analizadas por Western blot. (C) Tejidos de garrapatas fueron analizados por Western blot usando suero anti- rBm05br. GS, glándula salival; OV, ovarios; CG, cuerpo graso; INT, intestino; S, saliva; H, hemolinfa; C, cemento; M, macho.

5.5. Inmunolocalización de Bm05br por Inmunohistoquímica

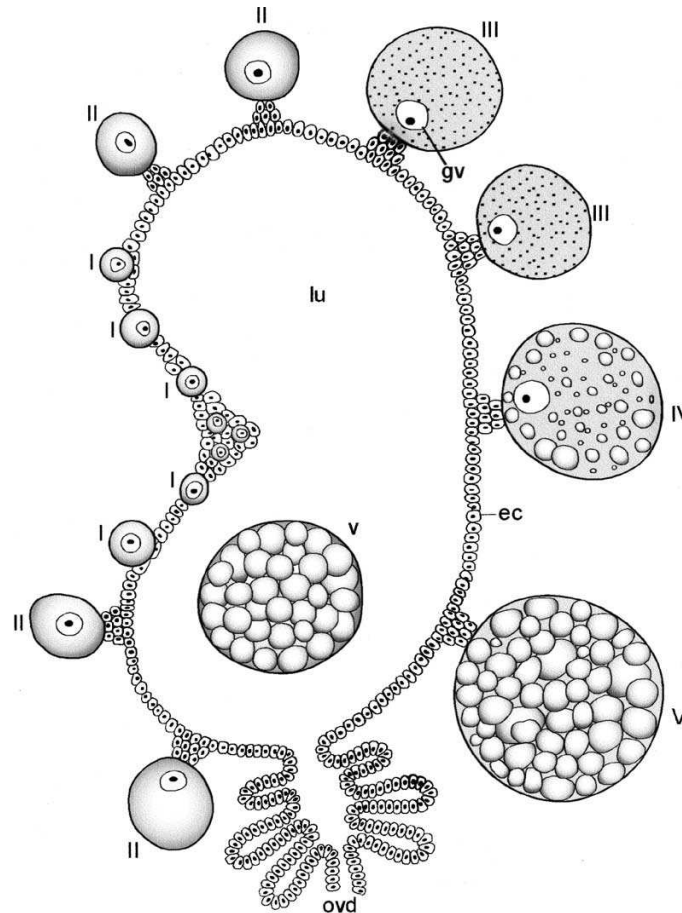


Figura13; Representación esquemática de los estadios de la ovogénesis en una garrapata *R. microplus*. I: ovocito I; II: ovocito II; III: ovocito III; IV: ovocito IV; V: ovocito V; ec: epitelio del ovario lu: lumen; ovd: oviducto; gv: vesícula germinal. (Saito et al. 2005)

La morfología característica de los ovocitos (Fig. 13):

- Ovocitos I: Redondeado con citoplasma homogéneo y sin gránulos de vitelina, la vesícula germinal tiene nucléolo prominente. En esta etapa, la vesícula germinal ocupa una gran área del citoplasma;
- Ovocitos II: Mayor volumen celular en comparación con el oocito I. En esta etapa, el ovocito no tiene gránulos evidentes en el citoplasma y la vesícula germinal y nucléolo siguen siendo prominentes.
- Ovocitos III: El citoplasma es rico en granulación gruesa y uniformemente distribuida y la vesícula germinal se ha desplazado a la periferia. En esta etapa, es posible identificar el corión que rodea al ovocito.

Ovocitos IV: Citoplasma con grandes y pequeños gránulos de vitelina. En esta fase, la vesícula germinal y el nucléolo son periféricos y el corión es evidente;

- Oocyte V: El citoplasma está completamente lleno de gránulos de vitelina grande y el corión es más grueso;

El análisis inmunológico del antígeno Bm05br en los tejidos de garrapatas partenógenas y teleógenas se utilizó para identificar componentes antigénicos relevantes. Dado que el anticuerpo anti Bm05br afectó el rendimiento reproductivo de las garrapatas, el mismo fue utilizado para localizar la proteína diana en secciones de tejido de ovario de garrapatas teleógenas y partenógenas (Fig14), así como en garrapatas partenógenas de diferentes pesos (Fig 15).

Por medio de estos ensayos, se logró identificar una proteína en los ovocitos con diferente grado de desarrollo. Asimismo, la marcación parece más intensa en las células más desarrolladas o estadios más maduros, lo cual indicaría que la expresión es mayor en estadios más desarrollados (Fig 14 A, D y 12 A, D, G, J, M, P). Al comparar los tejidos de garrapatas partenógenas de diferentes pesos, no se observaron diferencia de marcación entre las misma (15 A, D, G, J, M, P), como lo observado para estadios de garrapatas partenógenas y teleógenas. Los controles utilizados, tanto el control negativo (PBS) como el control con suero no relacionado no permitieron observar marcación, lo cual corrobora que la marcación observada con el suero anti Bm05br es específica del mismo.

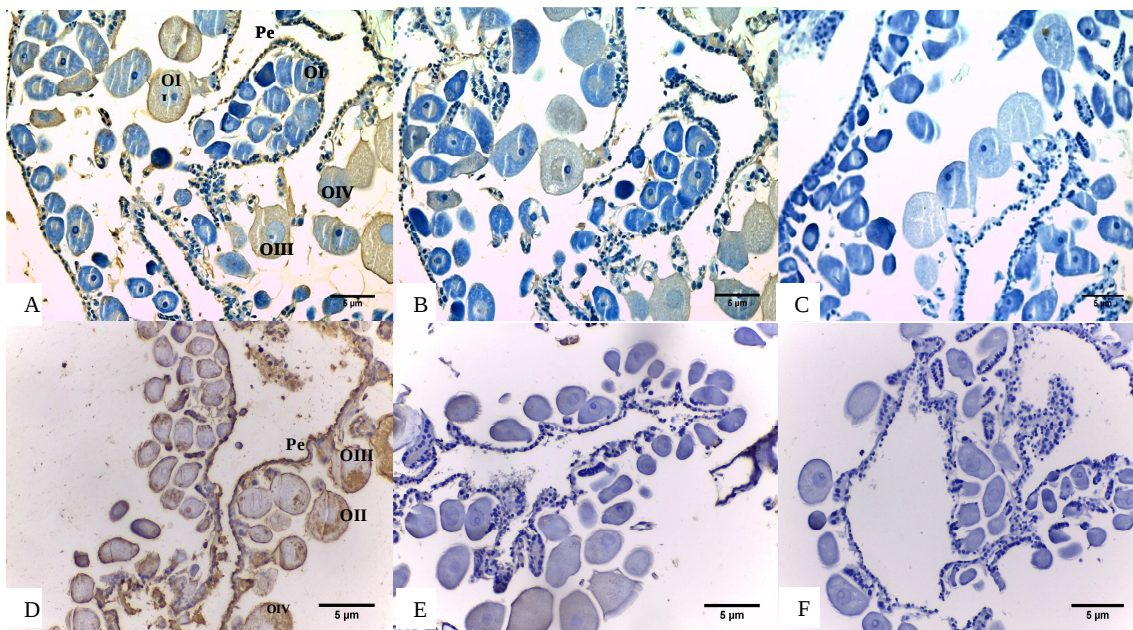


Figura 14: Inmunohistoquímica de garrapatas teleógenas y partenógenas de *R. microplus*. Cortes transversales de ovarios A a C: garrapatas teleógenas, D a F: garrapatas partenógenas, A, D: Secciones de tejidos de garrapatas con anticuerpos anti-rBm05br. B, E: Secciones de tejidos de garrapatas con suero control preinmune (no relacionado). C, F: Secciones de tejidos de garrapatas con PBS. Pe: pedicelo, OI: ovocito I, OII: ovocito II, OIII: ovocito III, OIV: Ovocito IV (Amplificación X20). Escala 5 µm.

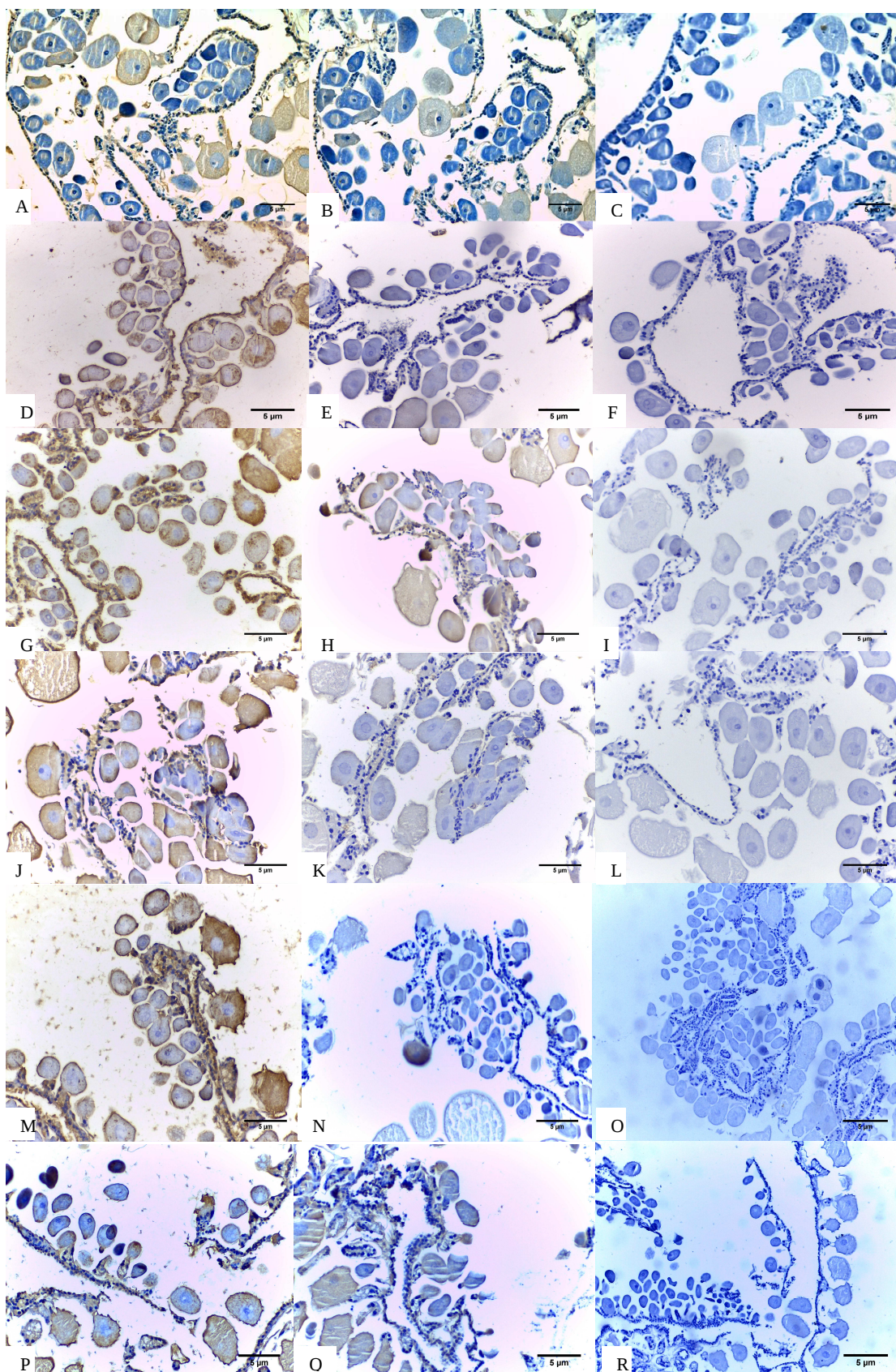


Figura 15: Inmunohistoquímica de garrapatas teleógenas y partenógenas de diferentes pesos de *R. microplus*. Cortes transversales de A a C: garrapatas teleógenas, D a F: garrapatas partenógenas pesos aproximados entre 32 a 40 mg., G a I: garrapatas partenógenas pesos aproximados 50 a 57 mg., J a L: garrapatas partenógenas pesos aproximados 74 a 96 mg., M a O: garrapatas partenógenas pesos aproximados 164 a 207 mg, P a R: garrapatas partenógenas pesos aproximados 245 a 291 mg. A, D, G, J, M, P: Secciones de tejidos de garrapatas con anticuerpos anti-Bm05. B, E, H, K, N, Q: Secciones de tejidos de garrapatas con suero control preinmune (no relacionado). C, F, I, L, O, R: Secciones de tejidos de garrapatas con PBS. (Amplificación X20) Escala 5 μ m.

5.6. Silenciamiento génico de Bm05br por RNAi

Con el fin de determinar el grado de transcripción, se realizaron ensayos de qPCR a cuatro ovarios de garrapatas partenógenas (hembras con peso de 25 a 40 mg) de cada grupo silenciado. El ensayo de qPCR mostró un nivel menor de mRNA de Bm05br en el grupo tratado con Bm05br-dsRNA comparado con los grupos controles inyectados con PBS y MSP1-dsRNA. Dicha diferencia entre los grupos fue observada en la mayoría de los ovarios evaluados 48 horas luego de la inyección con dsRNA (Fig 16A). Asimismo, la expresión proteica también se vio reducida en el grupo inyectado con dsRNA-Bm05br comparado con los grupos controles inyectados con PBS y MSP1-dsRNA (Fig 16B). De igual manera los ovarios de garrapatas inyectadas con Bm05br-dsRNA presentaron significativo atraso en el desarrollo (Fig. 16C). De acuerdo con el sistema de *ovarian growth phase* (OGP) propuesto por Seixas, Friesen, et al. (2008), los ovarios inyectados con Bm05br-dsRNA mostraron un desarrollo escala OGP 1 y 2, mientras que los controles exhibieron un grado de desarrollo de los ovarios escala OGP 3 y 4 (Fig. 16C). La proporción de ovocitos maduros decreció de un 60% en el grupo control PBS a un 10% en el grupo tratado con Bm05br-dsRNA (Fig. 16C). El índice de nutrición y el peso de huevos no se vio afectado por el silenciamiento génico de Bm05br (Fig 17A y B). Mientras que el tratamiento de RNAi con Bm05br-dsRNA afectó significativamente parámetros asociados con la reproducción, como ser índice de eclosión (Fig 17C y E) y peso de larvas (Fig 17D y E). El análisis del nivel de transcripción en glándula salival fue realizado también pero debido al pequeño tamaño de los órganos, los ensayos de qPCR no fueron factibles (debido a que en los ensayos de qPCR del silenciamiento se evaluaron cada tejido por separado y no todos los tejidos juntos como en los demás ensayos).

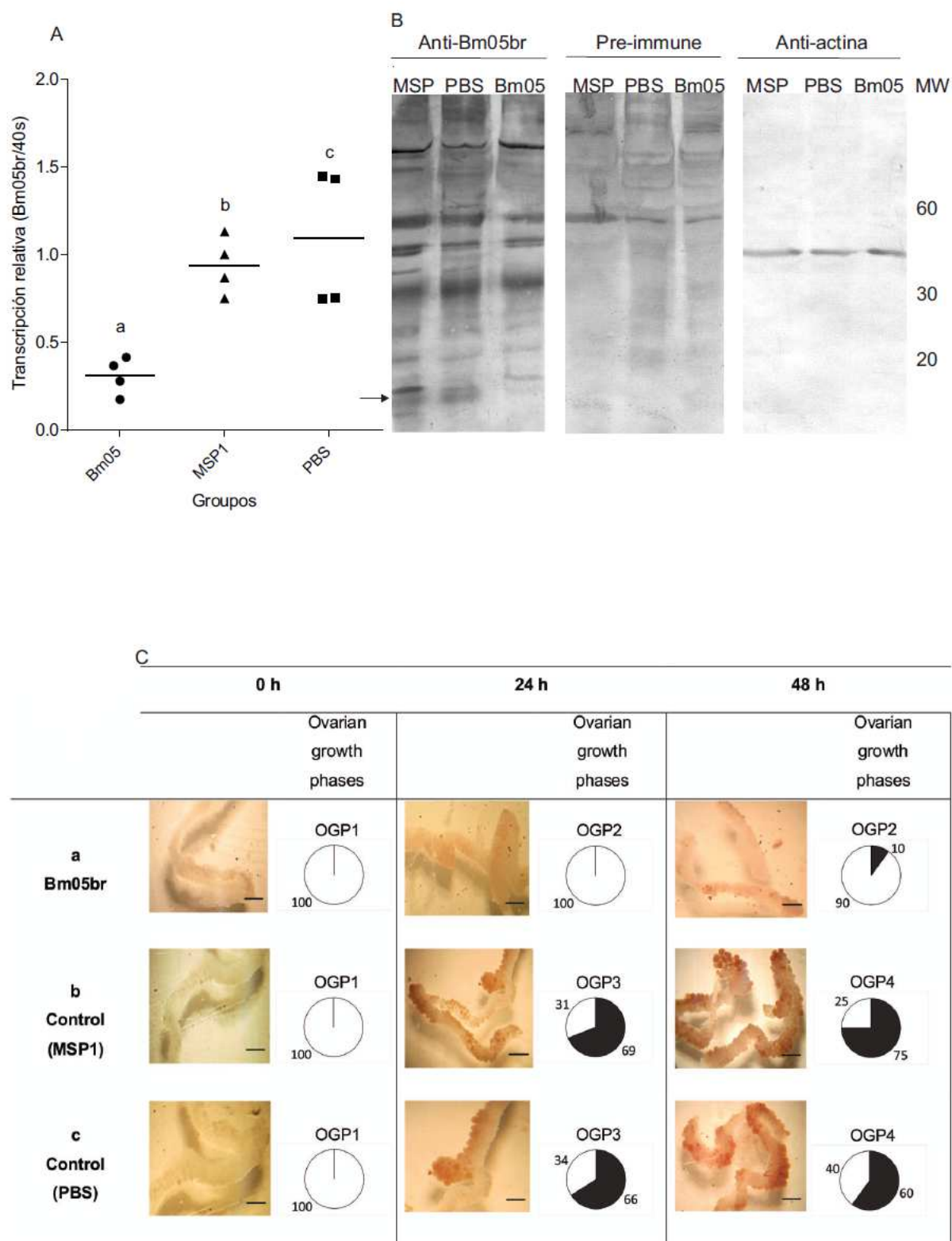


Figura 16: Silenciamiento de Bm05br mediante RNAi en ovarios de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. (A) La expresión relativa de Bm05br fue determinada por qPCR usando RNA extraído de cuatro ovarios de garrapatas *R. microplus* colectadas 48 horas luego de la inyección con Bm05br-dsRNA (Bm05) y los controles (MSP1 o PBS). Los

puntos representan los resultados de cada garrapata individualmente y la media de cada grupo. (B) Efecto de Bm05br-dsRNA sobre el nivel de proteínas en ovario. Proteína total fue extraída de ovarios de garrapatas inyectadas con dsRNA y controles. Fue realizado inmunoblot usando anticuerpos contra Bm05br. Suero contra actina y preimmune suero fueron usados como control de carga y control negativo respectivamente. (C) Ovarios de garrapatas inyectadas con Bm05br-dsRNA(a), control MSP1-dsRNA (b) y PBS (c) fueron disecados a 0 hs, 24 hs y 48 hs luego de la inyección con dsRNA para realizar una evaluación óptica del desarrollo. La proporción de ovocitos maduros e inmaduros fue analizada mediante la medida del área de cada segmento según se describen en materiales y métodos. Ovocito desarrollados están indicados en negro. Barra de escala: 5 mm. Letras denotan diferencias significativas determinadas por test de ANOVA seguida por Dunnett's (a, b) ($P<0.05$) (a, c) ($P<0.01$).

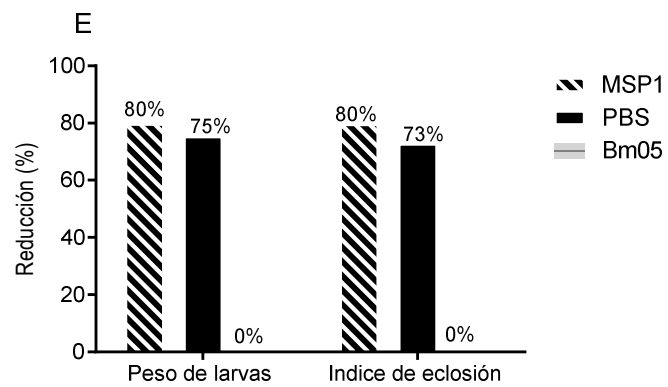
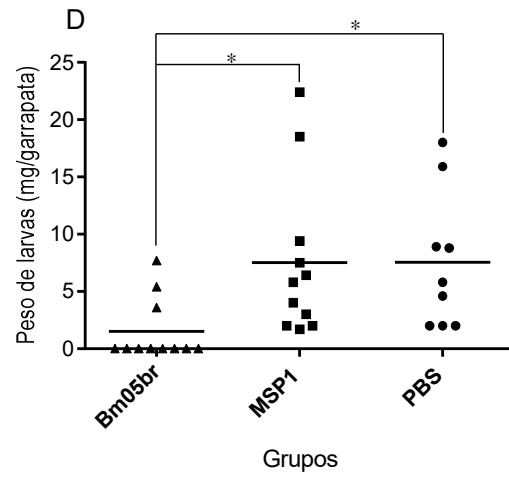
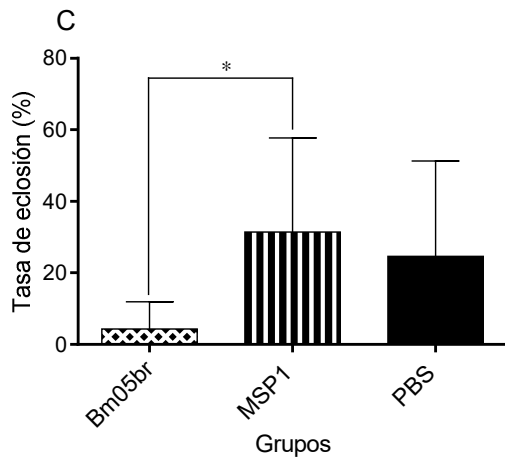
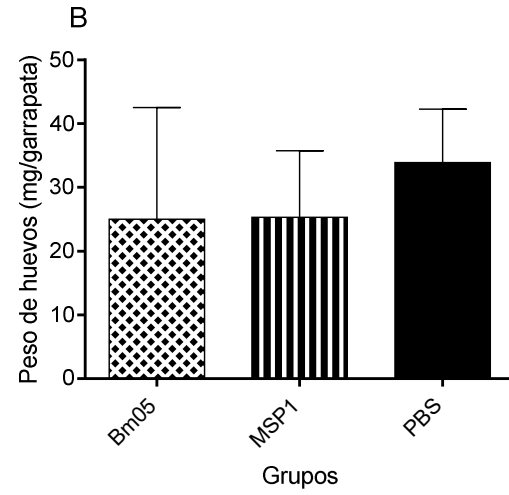
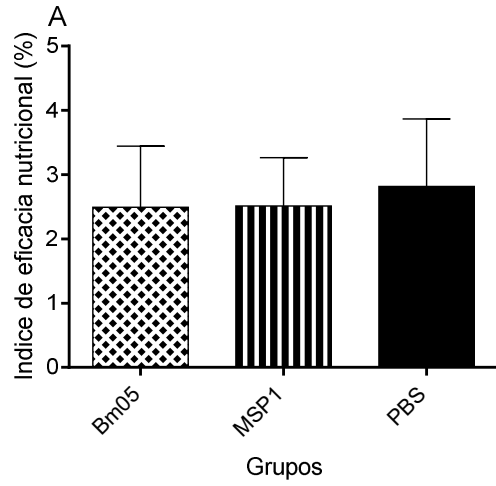


Figura 17: Efecto del silenciamiento de Bm05br por RNAi en parámetros asociados con la alimentación y ovoposición en garrapatas partenógenas de *Rhipicephalus microplus*. Las garrapatas fueron alimentadas artificialmente a través de capilares y mantenidas a 27 °C con 80% de humedad relativa. Los parámetros analizados fueron: (A) Índice de eficacia nutricional (%); (B) peso de huevos (mg/garrapatas); (C) tasa de eclosión (%); (D) peso de larvas (mg/garrapata); (E) Porcentaje de reducción de peso de huevos y larvas en el grupo tratado en relación con los controles. Asteriscos (*) denotan diferencias significativas determinadas por test de ANOVA seguido por Dunnett's ($P \leq 0.05$).

5.7. Alimentación artificial con capilares

Experimentos de alimentación artificial fueron realizados con el fin de evaluar los efectos de los anticuerpos contra Bm05br en los parámetros relacionados con la nutrición y ovoposición de las garrapatas. Fueron utilizadas diferentes concentraciones del anticuerpo, siendo las que se presentan en resultados, la concentración donde se observó diferencias significativas. Dichos ensayos de alimentación fueron realizados en dos oportunidades para corroborar los resultados obtenidos. En la Fig. 18 se detallan los principales parámetros relacionados con la nutrición y ovoposición de las garrapatas. No se encontraron diferencias significativas en el índice de eficacia nutricional entre los grupos evaluados, mientras que si se encontraron diferencias significativas en el parámetro asociado con la eclosión de los huevos entre los grupos alimentados con anticuerpos anti Bm05br y los grupos controles.

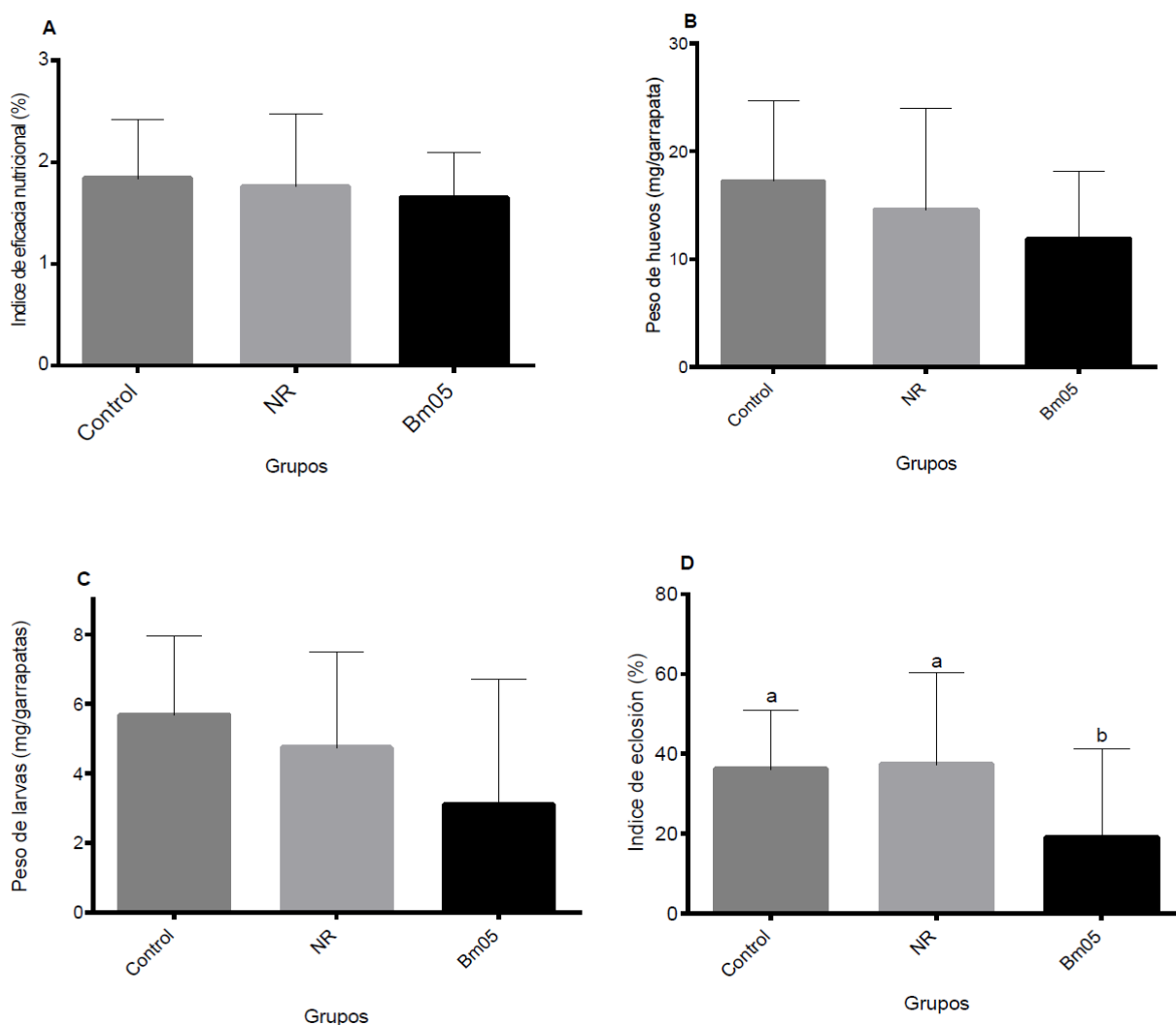


Figura 18: Parámetros asociados con el proceso de la ovoposición de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parcialmente alimentadas por alimentación artificial a través de capilares, mantenidos a 27 °C con humedad relativa de 80%. Garrapatas alimentadas con anticuerpos no relacionados (NR), solo sangre (Control) y con anticuerpos anti-Bm05br (Bm05). Los parámetros analizados fueron: (A) Índice de eficacia nutricional (%); (B) peso de huevos (mg/garrapatas); (C) tasa de eclosión (%); (D) peso de larvas (mg/garrapata). Letras (a,b) denotan diferencias significativas determinadas por test de ANOVA seguido por Dunnett's ($P \leq 0.05$).

5.8. Desarrollo de la respuesta humoral en bovinos

La cinética de la respuesta inmune humoral anti rBm05br inducida por la inmunización de bovinos con rBm05br conjuntamente con rBm86uy y posterior al desafío con garrapatas *R. microplus* fue monitoreada por ELISA (Fig. 19).

Fue observado un incremento en los niveles de anticuerpos en los bovinos vacunados

durante todo el período de inmunización y posterior a la infestación con garrapatas. Los niveles de anticuerpos permanecieron constantes hasta el final del experimento (día 150).

Ensayos de Western blot con sueros de los bovinos control e inmunizados mostró respuesta de anticuerpos positivos en bovinos inmunizados antes y después el desafío con larvas de *R. microplus*. En los sueros controles negativos no se observó respuesta a los anticuerpos anti-Bm05br antes y luego del desafío (Figura 20). Los resultados obtenidos en el estudio de la respuesta inmune humoral nos sugiere que ésta proteína es inmunogénica y que es capaz de desarrollar muy buenos niveles de anticuerpos sanguíneos

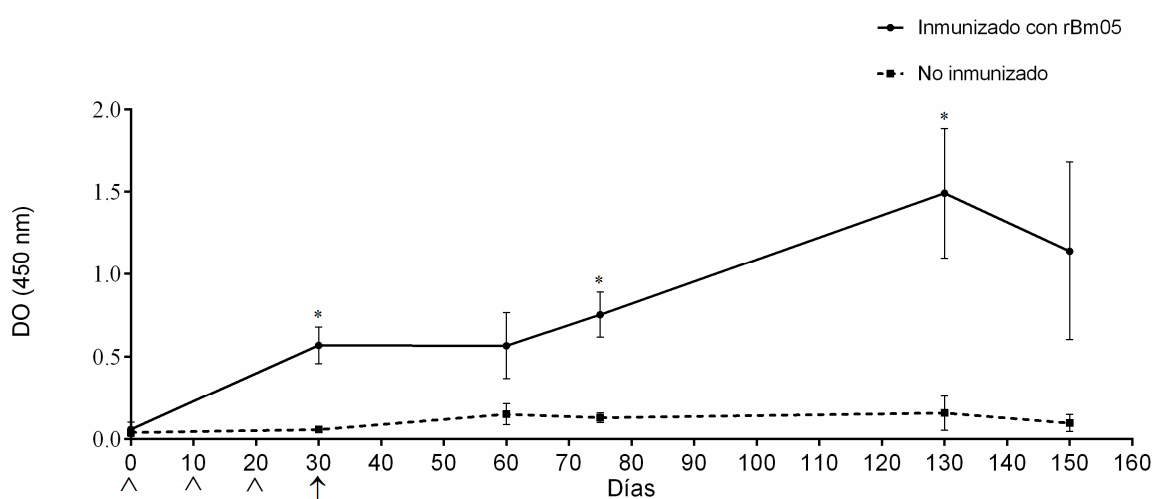


Figura 19: Niveles de anticuerpos anti-Bm05br de *R. microplus* en los sueros de bovinos con antígeno, medidos por ELISA (media $\pm$ DS). Sangre fue colectada de los bovinos por venopunción en el día de la primera inmunización (día 0, y días 30, 60, 75, 130 y 150, luego de la primera inmunización). Infestación con garrapatas (flecha), día de inmunización (marcas). DO: densidad óptica. (*)asteriscos denotan diferencias significativas determinadas por el test de t de Student's ($P = 0.05$),

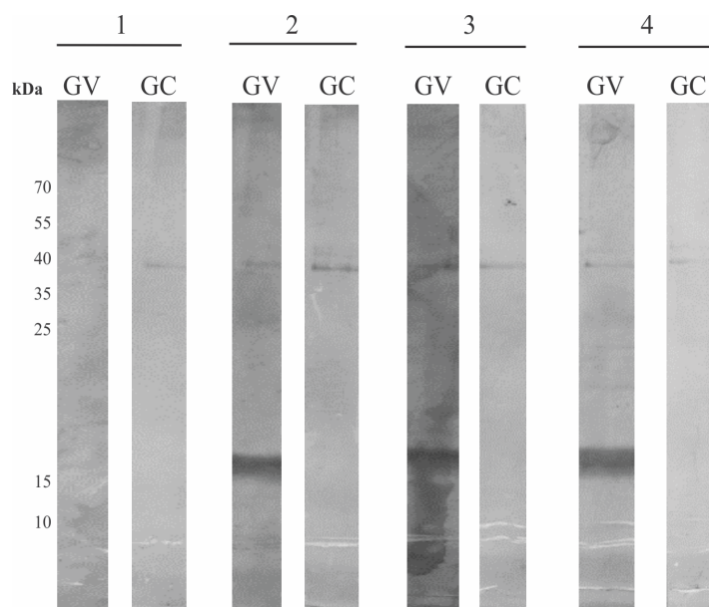


Figura 20: Western blot con rBm05br, usando una dilución de suero de 1/500. Pool de suero del grupo control (GC) y del grupo vacunado (GV). Línea 1, suero pre-inmune (día 0); línea 2, suero pre infestación (día 30 de la primera inmunización), línea 3, suero post infestación (día 60 de la primera inmunización); línea 4, suero día 75 de la primera inmunización.

5.9. Efectos de la vacunación sobre la infestación con garrapatas

Para determinar si la respuesta inmune inducida por la inmunización de rBm05br conjuntamente con Bm86uy en los animales vacunados fue protectora se infestó el ganado con larvas de *R. microplus*. La dinámica de la caída de garrapatas en los grupos vacunados y control se muestra en la Fig. 21. El número y peso total de las garrapatas teleógenas obtenidas fue significativamente menor en el grupo vacunado con respecto al grupo control, viéndose una reducción de 76,29 y 78,83% respectivamente. También fue observada una reducción del 51,23% de la fertilidad de los huevos obtenidos entre ambos grupos.

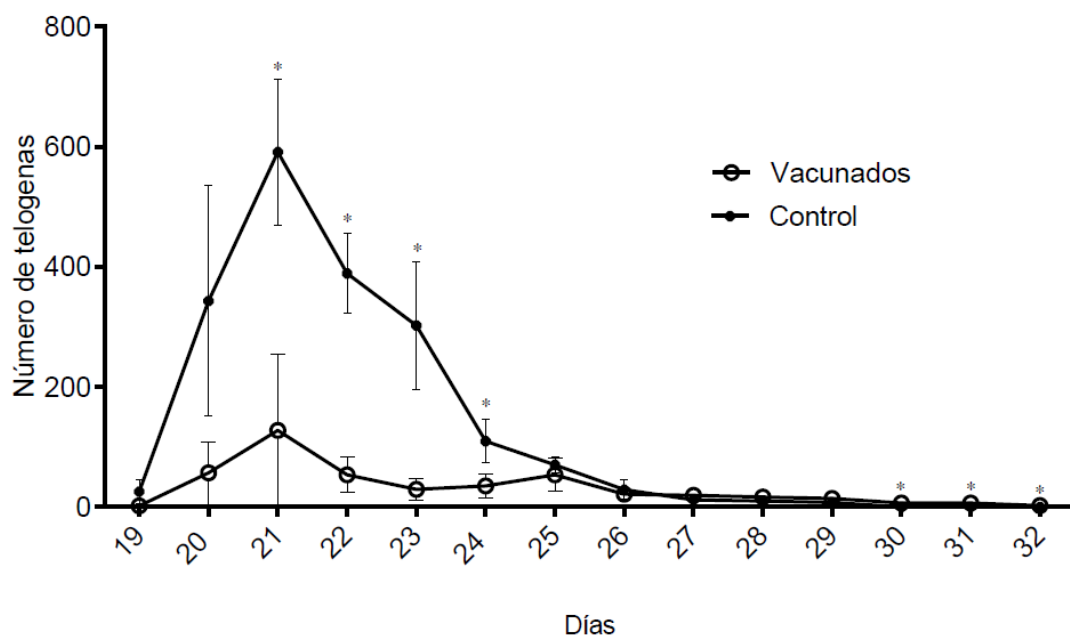


Figura 21: Dinámica del número de garrapatas totalmente ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* recuperadas en bovinos del grupo inmunizado con rBm05br y Bm86uy y el grupo control. (*)Asteriscos denotan diferencias significativas determinadas por el test de t de Student's ($P = 0.05$),

6. DISCUSIÓN

El control de los parásitos se tornó un gran problema en la últimas décadas, sobre todo por la aparición de poblaciones resistentes luego del uso indiscriminado de antiparasitarios (FAO 2004). La situación es similar para *R. microplus*, donde la resistencia a acaricidas fue identificada en prácticamente todos los países productores de ganado (Guerrero et al. 2012)(Klafke et al. 2006). Luego de no observarse la aparición de nuevos acaricidas, el control depende de nuevas drogas o un manejo adecuado de las ya existentes para retardar la aparición de resistencia (FAO 2004). Una alternativa al tema de la resistencia, podría ser el control inmunológico a través de vacunas (Willadsen 2006). El éxito de una vacuna contra garrapatas radica en la identificación y caracterización de moléculas inmunoprotectoras. Recientemente, un análisis proteómico de la saliva de *R. microplus* permitió identificar una proteína denominada Bm05 (Tirloni et al. 2014). Esta proteína fue clasificada en el grupo de “proteínas secretadas conservadas”, las cuales son proteínas muy abundantes en la saliva de *R. microplus* y con un posible rol en la alimentación de las garrapatas. En este trabajo, nosotros analizamos la secuencia, realizamos una localización tisular y estudiamos el efecto biológico del silenciamiento de Bm05br por RNAi, con el fin de aportar al conocimiento del posible rol de Bm05br en la fisiología de la garrapata. Asimismo, fueron realizados ensayos de evaluación de la capacidad protectora de Bm05br a través de alimentación artificial por medio de capilares así como ensayos de inmunización de bovinos en boxes, para evaluar el grado de protección inmunológica que es capaz de desarrollar rBm05br.

La secuencia de Bm05br es conservada y presenta homólogos en las otras especies de garrapatas. La comparación de la secuencia deducible de aminoácidos de Bm05br con otras especies de garrapatas mostró que esta proteína es similar a las proteínas de *R. annulatus*, *H. longicornis*, *I. scapularis* y *H. qinghaiensis*.

Asimismo, Bm05br y Rs05br (de *R. sanguineus* sensu lato) son muy similares, difiriendo solamente en dos aminoácidos en la secuencia de la proteína madura. En consecuencia, el análisis

de la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducible de aminoácidos mostró que las secuencias de *R. microplus* Bm05br (cepa Porto Alegre) y Bm05uy (cepa Mozo) son iguales. Los homólogos de Bm05br tienen un peso molecular de 26 kDa (Shahein 2008), sin embargo, en *H. qinghaiensis* dos isoformas de Hq05 fueron identificadas, con pesos moleculares de 23 kDa y 20 kDa. En este trabajo, nosotros identificamos solo una isoforma de 19 kDa, tanto para *R. microplus* como para *R. sanguineus* sensu lato. Un sitio de N- glicosilación fue predicho en las secuencias aminoácidas de Bm05br y de Rs05br (identificada por análisis *in silico*), dicho sitio también fue encontrado en Hq05 y Ba05, lo cual puede contribuir a la variación de peso molecular. Asimismo, el árbol filogenético de Bm05br realizado con secuencias nucleotídicas y otras secuencias de garrapatas de especie ixodidae, mostrado en la Fig 10 indican que este gen es conservado a lo largo de todas las especies de garrapatas testadas. El hallazgo de que *R. microplus* y *R. annulatus* tiene una secuencia idéntica no es inesperado, ya que estas especies son genéticamente relacionadas.

Hq05, el homólogo de Bm05br en *H. qinghaiensis*, indujo importantes niveles de protección inmune en ovejas, al ser usado en una vacuna contra *H. qinghaiensis*. Dicha vacuna causó la reducción de un 40% en la caída de huevos y un 37% en el índice de eclosión, sugiriendo que Hq05 es importante para la reproducción de las garrapatas (Gao et al. 2009). Esto es interesante ya que una vacuna basada en Bm05br puede también conferir protección contra otras especies de garrapatas, particularmente considerando el grado de conservación de la secuencia encontrada en los homólogos más cercanos. Asimismo, el gen de Bm05br está también expresado en machos de *R. microplus* y a pesar que la función biológica exacta en machos tampoco se conoce aún, esto también puede servir como posible blanco u objetivo para la respuesta inmune del huésped.

Bm05br y Ba05 de *R. annulatus* (Shahein 2008) presentan un perfil de expresión similar, siendo detectados en huevos y larvas. En cambio, Hq05 no fue encontrada ni en huevos ni en larvas de *H. qinghaiensis* (Gao et al. 2009). Nuestros experimentos muestran que la expresión génica de Bm05br es más alta en glándulas salivales de garrapata partenógenas que de garrapatas teleógenas, sugiriendo que Bm05br puede tener un rol en la alimentación de la garrapata. La proteína Bm05br

fue detectada en glándula salival, ovario, cuerpo graso, saliva y hemolinfa, pero no en intestino, de garrapatas partenógenas y teleógenas. La presencia de Bm05br en ovarios de garrapatas partenógenas y teleógenas puede sugerir un rol de Bm05br en la reproducción de las mismas garrapatas.

La presencia de Bm05br en glándula salival y saliva está de acuerdo con los análisis de proteómica previamente realizados donde fue encontrada Bm05 en saliva de *R. microplus* (Tirloni et al. 2014) sugiriendo su participación en la captación de sangre. Como fue demostrado para alguno de sus homólogos, rBm05br mostró ser inmunogénica en conejos. La proteína nativa fue reconocida por suero producido contra la proteína recombinante. En este estudio, Bm05br fue también reconocida por anticuerpos específicos contra la saliva de garrapatas partenógenas *R. microplus*. Sin embargo, rHq05 no fue reconocida por suero anti saliva de garrapata, sugiriendo que Hq05 nativa no está presente en saliva (Gao et al. 2009), o no es inmunogénica para el huésped durante la infestación natural debido a su baja concentración en saliva, como fue observada para otras proteínas (Chmelař et al. 2016). La calreticulina es otro ejemplo de proteína de saliva de garrapata que mostró una baja inmunogenicidad cuando fue naturalmente inoculada en el huésped a través de la alimentación de la garrapata (Sanchez Ferreira et al. 2002). Sin embargo, proteínas salivales no inmunogénicas pueden ser inmunogénicas cuando son inoculadas conjuntamente con adyuvante (Szahó et al. 1995, Sanchez Ferreira et al. 2002). Las garrapatas segregan un cono de cemento compuesto por muchas proteínas salivales, sin embargo Bm05br no fue identificada por anticuerpos específicos en el cemento de *R. microplus*.

La técnica de RNA de interferencia fue usada para el estudio de la función de Bm05br en garrapatas. Para evaluar el rol biológico de Bm05br por RNAi, fueron realizados ensayos de qPCR y Western blot usando ovario y glándulas salivales disecados de garrapata de los grupos tratados y control. Como *R. microplus* es una garrapata de un solo huésped, no volviendo a fijarse en el huésped una vez removida, empleamos la técnica de alimentación artificial usando sangre bovina citratada, establecida desde hace tiempo en el laboratorio (Pohl et al. 2011, Gonsioroski et al. 2012),

con el fin de analizar los efectos del silenciamiento génico de Bm05br en la reproducción. Para este experimento, fueron empleadas garrapatas partenógenas con peso entre 25 a 45 mg, siendo las mismas de peso adecuado para una correcta alimentación artificial a través de capilares (Pohl et al. 2011, Gonsioroski et al. 2012). Asimismo, ya había sido determinado por Gonsioroski et al. (2012) que las hembras de 25 a 60 mg de peso tenían una mejor performance en el proceso de alimentación artificial. Las hembras con un peso superior a 60 mg no aceptan fácilmente el capilar para la alimentación, probablemente debido a que con dicho peso, la degeneración de las glándulas salivales ocurre más rápido después de la separación del hospedero, lo que hace más difícil otra alimentación con sangre. De manera similar, las hembras menores de 25 mg no tomar una gran cantidad de sangre. Las hembras de la familia Ixodidae solo inician el período de alimentación luego del apareamiento (Sonenshine 1993), siendo probable que hembras con un peso promedio de 25 mg aún no estén en apareamiento, lo que las hace incapaces de ingerir grandes cantidades de sangre. En nuestros ensayos las garrapatas partenógenas *R. microplus* alimentadas con capilares de microhematocrito tuvieron un significativo incremento de peso.

Varios experimentos de RNAi previamente realizados han mostrado la efectividad de la técnica para ser usada y provocar el silenciamiento de genes en garrapata (Nijhof et al. 2007) (Kocan et al. 2007) (Fabres et al. 2010) (Pohl et al. 2011) (Lara et al. 2015) (Hajdusek et al. 2016). En este estudio, cuando las garrapatas fueron inyectadas con Bm05br-dsRNA, los niveles de RNA y proteínas en ovarios decrecieron y permanecieron bajos hasta 48 hs post inoculación, comparando con los grupos controles. Los ovarios de hembras inyectadas con Bm05br-dsRNA también mostraron pequeño tamaño y retraso en el desarrollo de los ovocitos. De acuerdo con el sistema de "ovarian growth phase" (OGP) propuesto por Seixas y col. (Seixas, Friesen, et al. 2008), el grupo de hembras inyectadas con Bm05br-dsRNA poseían un desarrollo de ovarios OGP 1 (donde los ovarios están translucidos y finos, los ovocitos son ovoides y presentan un diámetro menor a 150 μm de longitud) y OGP2 (donde algunos ovocitos han crecido hasta 250 μm de longitud, son opacos, pero no tiene la suficiente vitelina para ser visible aún). Los controles, en cambio exhibían

ovarios con desarrollo OGP3 (donde se ha dado ya un desarrollo del ovario, debido principalmente al desarrollo de los ovocitos, muchos ovocitos son de tamaño de 400 μm y de color marrón, mostrando la presencia de granos de vitelina) y OGP4 (donde se da un desarrollo total del ovario, siendo el mismo el órgano más grande del hemocele, y completamente cubierto de ovocitos con granos de vitelina desarrollados). Un retraso en el desarrollo del ovario fue observado también para garrapatas *Amblyomma hebraeum* tratadas con hormona 20-hydroxyecdysone, pero no con “vitellogenin uptake factor” (Seixas, Friesen, et al. 2008). Asimismo, se vio una reducción de la tasa de eclosión en un 73% y 79% y una reducción del peso de larvas en un 75% y 80%, cuando comparamos los resultados de los parámetros reproductivos del grupo tratado Bm05br-dsRNA con el grupo controles PBS y MSP1, respectivamente. Estos efectos biológicos, asociados con la reducción de la expresión génica de las garrapatas tratadas, sugieren que Bm05br podría estar involucrada en la reproducción de las garrapatas.

La alimentación artificial por capilares posibilita la identificación de antígenos protectivos contra garrapatas, ya que permite una primera aproximación sobre el grado de protección proporcionado por dichos anticuerpos. La técnica de alimentación artificial ha sido utilizada para diferentes estudios, ya que es útil para, investigar la habilidad del huésped de transmitir patógenos o para seguir el desarrollo de los parásitos dentro de las garrapatas (Baldrige et al. 2007) (Bouwknegt et al. 2010). Asimismo, esta técnica también se utiliza con el objetivo de observar los efectos fisiológicos causados por un microorganismo, por una droga (Pohl et al. 2011) o por un anticuerpo, siendo la ingurgitación total de garrapatas de importancia como un aspecto del experimento, dada la relación entre el peso de las hembras ingurgitadas y su capacidad de postura de huevos. Utilizando anticuerpos anti Bm05br (150 μg) en el proceso de alimentación artificial, se observó un incremento de peso en todos los grupos (tanto grupo en estudio, que recibieron anticuerpos, anti Bm05br así como grupos controles) en forma similar, indicando que la ingestión de esta concentración de anticuerpos no interfirió negativamente en el desarrollo de la garrapata. Asimismo, con respecto a los parámetros relativos a la ovoposición se encontraron diferencias

significativas en el índice de eclosión de los huevos, reflejando un resultado similar al observado para los experimentos de silenciamiento por RNAi. Se evaluaron diferentes concentraciones de anticuerpo siendo 150 µg, la concentración necesaria para poder observar diferencias fenotípicas entre los grupos en evaluación.

Los estudios previos de Gao y col. (Gao et al. 2009), comprobaron el potencial de Hq05 como posible candidato vacunal, ya que los mismos permitieron observar una significativa reducción de la cantidad de huevos puestos por las garrapatas (40%), y un descenso de la capacidad de eclosión de huevos en un 37% comparado con el grupo control. Otro homólogo a Bm05br testado en un ensayo de vacunación fue la recombinante P19 que junto con otras dos proteínas recombinante (rP8 y rP23), permitió observar que dicha inmunización, limita la alimentación de las ninfas de garrapatas en conejos, sugiriendo su posible capacidad como candidatos para el control de garrapatas (Schuijt et al. 2011). Luego de dichos ensayos, no se han investigado otros homólogos a Bm05br como inmunógenos en un ensayo vacunal. En base a eso, se estudió el potencial de rBm05br en bovinos en un ensayo multiantigénico. Durante este experimento de vacunación en bovinos, las inoculaciones contenían el adyuvante Montanide 888/Marcol 52, el cual mostró inducir una producción de anticuerpos adecuada. El análisis de Western blot de sueros de bovinos inmunizados con rBm05br y bovinos controles (inoculados con PBS) revelaron un reconocimiento específico de la proteína Bm05br no observado en los sueros de los animales controles. No se detectó ninguna señal anti rBm05br en los sueros de los bovinos controles. Asimismo, la presencia de anticuerpos anti Bm05br fue detectable hasta el final de la fase de infestación, lo que muestra que la inmunización resultó en el desarrollo de una respuesta inmune de memoria contra la proteína recombinante, sugiriendo que la proteína Bm05br podría estar secretándose por la saliva y activando el sistema inmune del huésped. Los bovinos vacunados con rBm05br y rBm86uy mostraron una reducción significativa tanto en el número como el peso de teleógenas. También se vio afectada la fertilidad de los huevos en el grupo vacunado. El uso de vacunas multi-antigénicas se ha descrito como útil para incrementar la eficacia de la vacunas, porque pueden optimizar la

respuesta inmune del huésped. Usualmente los antígenos secretados, como Bm05br, tienen el potencial de ser protectivos contra varias especies y estadios diferentes de garrapatas (Nuttall et al. 2006); asimismo, la presencia de diferentes antígenos en una vacuna puede proteger contra diferentes estadios del desarrollo de garrapatas y diferentes especies (Parizi et al. 2012), (de la Fuente 2012), (Willadsen 2008),(Nuttall et al. 2006). En el mismo sentido una vacuna doble acción con antígenos expuestos y ocultos, parece ser muy prometedora (Trimnell et al. 2002), como es el caso de la presente formulación, donde Bm05br (antígeno expuesto presente en la saliva de las garrapatas) junto con otro antígeno testado Bm86uy (el cual es un antígeno oculto), mostraron buenos niveles de protección.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo, hemos caracterizado, identificado y ubicado filogenéticamente a Bm05br y Bm05uy de *R. microplus* y a Rs05br de *R. sanguineus* sensu lato.

Se logró el silenciamiento de Bm05br, y se observó que una reducción en la expresión de Bm05br puede interferir en la fisiología reproductiva de las garrapatas. Los resultados sugieren que Bm05br tiene un rol en la ovogenesis, en el desarrollo de los ovocitos y en la embriogénesis de las garrapatas.

Con respecto a la evaluación de la capacidad protectora de Bm05br como antígeno candidato para una vacuna, consideramos que los resultados muestran el efecto del anticuerpo Bm05br a través de alimentación artificial, el cual reflejó diferencias significativas en algunos de los parámetros relacionados con la ovoposición.

En lo que tiene que ver con la inmunización de bovinos en boxes, consideramos que los resultados obtenidos son prometedores, siendo necesarios nuevos ensayos para esclarecer el presente escenario.

Finalmente, los datos presentados sugieren que Bm05br puede ser un antígeno candidato a ser usado para el desarrollo de una vacuna multiespecie contra garrapatas.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1: FIGURAS SUPLEMENTARIAS:

8.1.1. Figura suplementaria S1

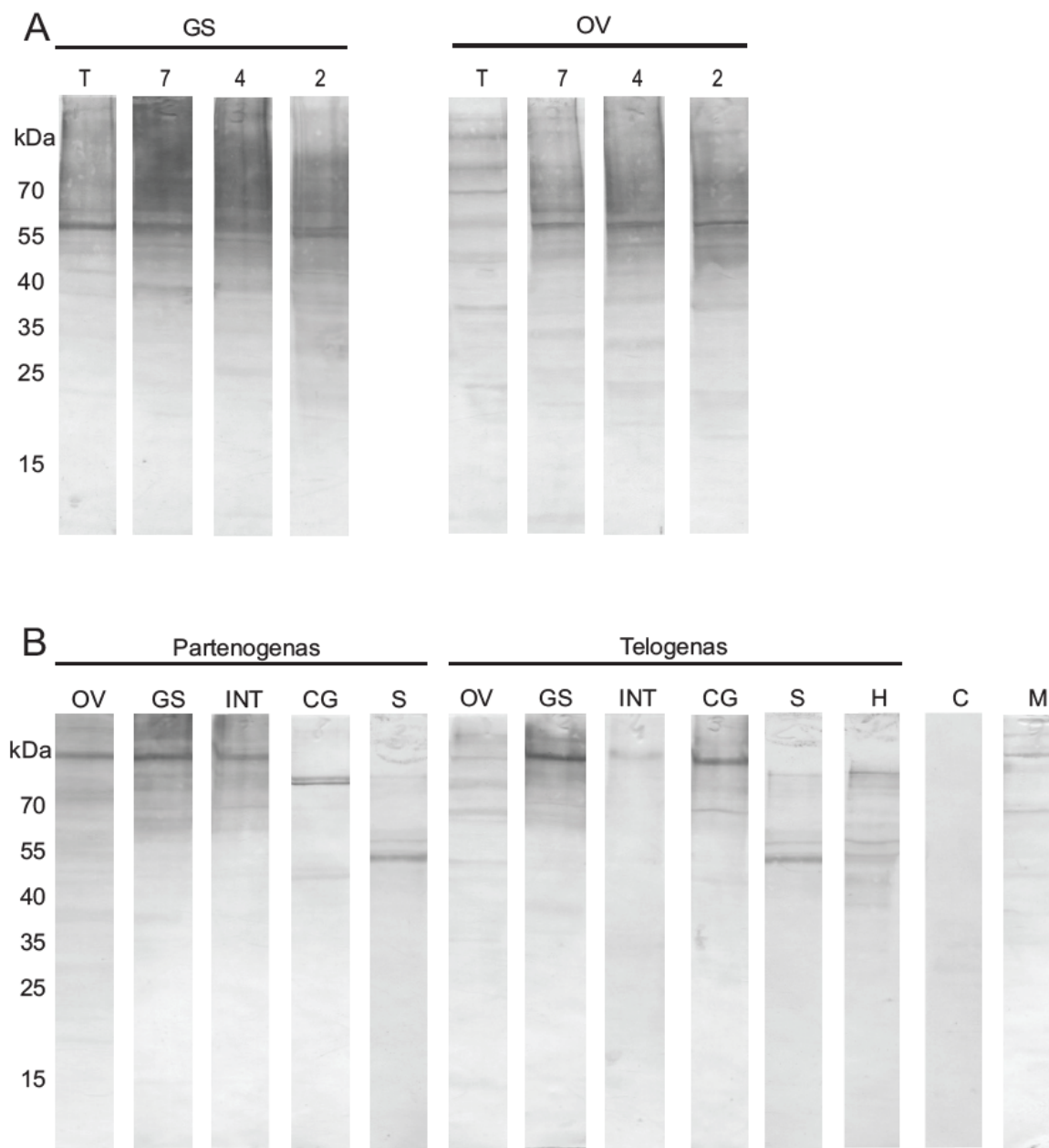


Figura suplementaria S1: (A) Expresión de Bm05br nativa en tejidos de *Rhipicephalus microplus* analizado por Western blot con suero pre inmune (1:1000). (B) Presencia de Bm05br en extractos de tejidos de *R. microplus* de glandula salival y ovarios de rangos de diferentes pesos analizados con suero pre inmune (1:1000). GS, glándula salival; OV, ovario; CG, cuerpo graso; INT, intestino; S, saliva; H, hemolinfa; C, cemento; M, macho; T: teleógenas; 7: partenógenas con peso entre 41 mg a 70 mg, 4: partenógenas con peso entre 21 mg a 40 mg; 2: partenógenas con peso igual o menor a 20 mg

8.1.2. Figura suplementaria S2:

Cuadro 2 MIQE Datos de experimentos de qRT-PCR	
Diseño experimental y recolección de muestras	Detalles
Descripción de muestras	Todas las muestras fueron colectadas, colocadas en TRIzol e inmediatamente frías
Número de muestras	Tejidos de garrapatas (ovarios, glándulas salivares, intestino y cuerpo graso): 6 -10 de cada tejido (juntos).
	Ovarios, glándulas salivares de diferentes pesos: 6 -10 de cada tejido y peso (juntos).
	Cuatro ovarios para RNAi: cada tejido fue evaluado por separado.
Número de replicas de muestras	Fue realizado en dos oportunidades
Condiciones de conservación de muestras	Muestras fueron colocadas en -70 °C por aproximadamente una semana.
Extracción de ácidos nucleicos	
Procedimiento	El RNA total fue extraído usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.
	Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf y utilizando pistilos fueron disgregadas con 1 ml de reactivo de TRIzol por cada 50 mg de tejido.
	El RNA purificado fue disuelto en agua tratada con DEPC y guardado a -70 °C.
Nombre del kit y detalles o modificaciones	Reactivo TRIzol (Invitrogen). Se siguió exactamente el protocolo del fabricante.
Reactivos adicionales utilizados.	Cloroformo (Merck); 2-propanol (Merck); Etanol (Merck); agua tratada con DEPC (Ambion)
Detalles del tratamiento de DNase o RNase	1 ug de RNA fue tratado con 1 U de Dnase I (Invitrogen) en un volumen final de 10 ul. La digestión de DNA se logró incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 1 ul de solución de EDTA 25 mM (Invitrogen), seguida por una incubación de 10 min a 65 °C para inactivar
Evaluación de la contaminación (DNA o RNA)	Fueron realizados ensayos de PCR usando muestras de RNA y primers de actina: (forward: 5'TGTGACGACGAGCTTGCCG'3; reverse: 5'GAAGCACTTGCGGTGGACAATG'3). No se observaron bandas de amplificación en ninguna muestra.
Cuantificación	Espectrofotómetro (Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech, ultraspec 1000).
Pureza	Determinación realizada a 260/280 (valor 1.70- 1.90)
Detalles del tratamiento de Dnase	La resuspensión del RNA fue realizada en agua tratada con DEPC y las reacciones de transcripción reversa fueron realizadas con muestras tratadas con DNase (Invitrogen).

Transcripción reversa	
Procedimiento/ kit	Life Technologies SuperScript III First-Strand Síntesis System con Oligo-dT ₂₀ primer
Cantidad de RNA	3.0 - 5.0 µg de RNA total
Volumen de reacción	20 µl
Temperatura y tiempo	65 °C por 5min; 50 °C por 60min; 70 °C por 15min
Información secuencias RT-qPCR	
Número de acceso a secuencias	40S ribosomal: EW679928
RT-qPCR oligonucleótidos	
secuencias de primers	40S ribosomal: forward: 5'ACGACCGATGGCTACCTCCTCCGC'3; reverse: 5'TGAGGCGAACCTGGTTGTGCTGAGCG'3
	Bm05br: forward: 5' TTCGACCGTGCCAGGACTGAG'3; reverse: 5'TGCACTTGAGCCACGAAGTGGT'3
Protocolo de RT-qPCR	
Condiciones de reacción	Volumen de reacción: 25 µl
	Primer: 1.0 µM
	cDNA: 100 ng
qPCR kits	Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit
Parámetros de termociclador	95 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anilamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s.
RT-qPCR instrumento	Rotor Gene® Q (Qiagen)
Optimización/validación	
Detalles de amplicón	tamaño de amplicón: 40S ribosomal (106 pb), Bm05br (133bp)
Eficacia de PCR calculada desde la pendiente	ovarios: 40s ribosomal: 91% Bm05br: 93%
	glándulas salivares: 40s ribosomal: 102% Bm05br: 97%
r2 de la curva de calibración	ovarios: 40s ribosomal: 0,97 Bm05br: 0,99
	glándulas salivares: 40s ribosomal: 0,99 Bm05br: 0,98
Rango lineal	Se consideró el rango lineal teniendo en cuenta la linealidad de las curvas estándar; de 10, 50, 100, 200 y 500 ng de cDNA
Análisis de datos	
Software estadístico	Relative Expression Software Tool (REST -MCS®, version 2) (Pfaffl et al. 2002)
Método de determinación de Ct	El gen constitutivo 40s ribosomal (GenBank: EW679928), sirvió como gen referencia para la normalización
	Los valores de Ct normalizados frente a los valores estándar de 40s ribosomal valores se obtuvieron para calcular la variación cuantitativa de los genes diana

Resultados de NTCs	La señal de la gráfica de amplificación fue muy tardía ($C_t > 34$) y por lo tanto hubo una diferencia de C_q entre el valor del control negativo y todos los cDNA de las muestras.
Número y etapa (RT o qPCR) de replicas técnicas	Las reacciones de qPCR fueron realizadas en duplicado
Justificación estadística	Replicas biológicas

8.2. ANEXO 2: PRESENTACIÓN DE DATOS EN ARTÍCULO:

Datos de caracterización molecular y funcional de Bm05br presentados en esta tesis, se encuentran en:



Molecular and functional characterization of Bm05br antigen from *Rhipicephalus microplus*



María Fernanda Alzugaray^{a,b}, Luís Fernando Parizi^b, Adriana Seixas^{b,c},
Uruguaysito Benavides^{a,b}, Itabajara da Silva Vaz Jr.^{b,d,e,*}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Alberto Lasplacas 1550 a 1620, Montevideo, Código postal 11600, Uruguay

^b Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, Campus do Vale, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^d Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 August 2016
Received in revised form
14 December 2016
Accepted 14 December 2016
Available online 15 December 2016

Keywords:
Bm05br
tick
Rhipicephalus microplus
RNAi
reproduction

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is a cattle-specific tick, causing considerable losses in the livestock industry. The identification of molecules responsible for modulation of host defenses during different parasite stages can help in the development of alternative methods, such as vaccination, to control tick infestations. Hq05, a protein of unknown function identified in the tick *Haemaphysalis qinghaiensis*, induced a significant protective immune response when used as a vaccine in sheep. In the present study, we investigated Bm05br, the Hq05 homologous gene from *R. microplus*. Besides *H. qinghaiensis*, Bm05br homologous found in other tick species such as *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes scapularis* were comparatively analyzed. Bm05br expression profile in different *R. microplus* tissues and life-stages was determined by qRT-PCR and Western blot. Bm05br was detected in ovaries, salivary glands and the fat body of both partially and fully engorged females. The highest transcription levels were observed in partially engorged females fat body and salivary glands. Gene knockdown by RNAi reduced egg hatching rate and the weight of tick larvae obtained from treated group, when compared to controls. These results indicate that Bm05br may be involved in *R. microplus* reproduction. Together with its distribution and high sequence conservation across different tick species, our data suggest Bm05br as a potential antigen for development of a multispecies anti-tick vaccine.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks are ectoparasites and important vectors of pathogens to both humans and animals (Bowman et al., 1996). Specifically, *Rhipicephalus microplus* causes major losses in the livestock industry due to a reduction in productivity and to the damage caused to host skin via scar tissue formation (de la Fuente et al., 2007). Chemical acaricides are the most common method for tick control, although

alternative methods in the form of vaccines are under development (de la Fuente and Contreras, 2015). The increasing knowledge about novel molecules involved in essential tick physiological processes, such as feeding and reproduction, is important for the identification of antigens for tick vaccines.

The immunogenic protein Ba05 was first identified in salivary glands and in 3-days-old eggs from the tick *Rhipicephalus annulatus* (Shahein, 2008). Subsequently, in *Ixodes scapularis* salivary glands, Schuijt et al. (2011) detected protein P19, a homolog of Ba05 with 93% identity in amino acid sequence, expressed in larval, nymphal and adult tick stages, as well as in female salivary glands. However, the function of P19 remains unknown. The protein did not show any activity typically found in tick saliva, such as anti-complement or anticoagulant (Schuijt et al., 2011). A vaccine trial using recombinant P19, in combination with two other recombinant proteins (rP8 and rP23), impaired nymph tick feeding on rabbits, suggest-

* Corresponding author at: Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Campus do Vale, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. Tel.: +55 51 3308 6078; fax: +55 51 3308 7309

E-mail addresses: mafealga@gmail.com (M.F. Alzugaray), luisfparizi@cbiot.ufgrs.br (L.F. Parizi), adriseixas@gmail.com (A. Seixas), ubenavides@gmail.com (U. Benavides), itabajara.vaz@ufgrs.br (I. da Silva Vaz Jr.).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.008>
1877-959X/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

ing that the combination could be a target for tick control (Schuijt et al., 2011). In 2009, Gao et al. identified another Ba05 homologue protein, named Hq05, in the tick *Haemaphysalis qinghaiensis* (Gao et al., 2009). Hq05 was recognized by anti-tick salivary glands serum, but not by anti-tick saliva serum, suggesting that Hq05 is not secreted during tick feeding. Sequence and phylogenetic analyses showed that Hq05 presented 78% similarity with Ba05 in amino acid sequence. Assessment by RT-PCR indicated that the Hq05 gene is expressed in nymphs and in adult salivary glands. In vaccination trial against *H. qinghaiensis*, recombinant Hq05 was shown to reduce egg laying by 40% and egg hatching by 37% (Gao et al., 2009).

Recently, a proteome analysis identified the presence an Hq05-homologue, called Bm05, in *R. microplus* saliva (Tirloni et al., 2014). In the present work, we contribute to the current knowledge of this antigen by describing it from two different populations of *R. microplus* ticks, from Brazil (Bm05br) and Uruguay (Bm05uy), and one Brazilian *R. sanguineus* sensu lato population (Rs05br). We compared the coding sequences and investigated the biological role of Bm05br by means of gene silencing (RNAi), to gain insight into the role of Bm05br protein in tick fitness and fecundity. This technique was first used in ticks by Aljamali et al. (2003) to describe the effects of silencing of a salivary gland-specific histamine binding protein on the feeding pattern of *Amblyomma americanum* females. After that, this technique rapidly became widely adopted, and different strategies have been used to conduct tick gene silencing by RNAi (Miyoshi et al., 2004; Narasimhan et al., 2004; Galay et al., 2016). RNAi experiments presented here were based on Bm05br-dsRNA inoculation into the tick hemocoel, followed by artificial feeding using the capillary method described by (Gonsioroski et al., 2012). The reproduction parameters of females treated with Bm05br-dsRNA were affected (egg hatching rate and the weight of tick larvae), suggesting that Bm05br has a role in tick reproduction. This approach aims to explore the physiological role of the antigen Bm05br in order to provide a better understanding of tick physiology, as well as to characterize a potential novel vaccine target.

2. Material and methods

2.1. Animal hosts and ticks

New Zealand White rabbits were used for *R. sanguineus* sensu lato tick infestation (ticks originated from a colony of *R. sanguineus* sensu lato 'tropical species' established at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil) (Cunha et al., 2009), and Hereford cattle were used for infestation with *R. microplus* (Porto Alegre strain, Brazil). Animals were housed at the Faculdade de Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. The *R. microplus* Mozo strain (Uruguay) was reared in Hereford cattle at a tick-free area at the División Laboratorios Veterinarios (DILAVE), Montevideo, Uruguay. The experiments were approved and conducted following the guidelines of the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFRGS and DILAVE. *Rhipicephalus microplus* of Porto Alegre (Brazil) and Mozo (Uruguay) strains were reared on Hereford calves (*Bos taurus taurus*), which were brought from a naturally tick-free area and maintained in insulated pens. Calves were infested with 15-day-old tick larvae. After 22 days, partially and fully engorged adult female ticks were collected for tissue dissection. *R. sanguineus* sensu lato were maintained by experimental infestation on rabbits. Partially engorged females (5 days post-infestation) were collected directly from rabbits, while fully engorged females were collected after spontaneous detachment. For all species, females were kept at 27 °C and 85% relative humidity for egg laying. Larvae were collected 5 days after hatching. Partially engorged ticks were grouped according to their weight (10 ticks

in each group) for gene expression analyses in salivary gland and ovary, as described below. For transcription analysis, 8 groups of partially engorged ticks ranging from 10 mg to 270 mg (10 ticks in each group) were separately evaluated. For protein expression analysis, 3 groups of partially engorged ticks (10 ticks in each group) were assessed: ticks weighting less than 20 mg, between 21 mg and 40 mg and between 41 mg and 70 mg. The grouping of partially engorged tick by weight was used to represent different stages of development, since *R. microplus* is a one-host tick and it is hard to separate or distinguish stages beyond the binary classification in partially or fully engorged. For RNAi experiment ticks weighting between 25 mg and 45 mg were selected, because this range showed the best performance for artificial capillary feeding.

2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. The concentration and quality of the RNA were determined by spectrophotometry (Ultrospec 1000, Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech). Total RNA was resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and treated with DNase I (Invitrogen). The total RNA was reverse-transcribed using oligo (dT) p12–18 primer and Superscript[®] III (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. The resulting cDNA was stored at –70 °C until use.

2.3. Cloning of Bm05br and homologous sequences

The same procedure was used for Bm05br, Bm05uy, and Rs05br, using total RNA extracted from ovaries of *R. microplus* ticks from Porto Alegre strain (from Brazil), Mozo strain (from Uruguay) and *R. sanguineus* sensu lato ticks (from Brazil), respectively. Tick ovary RNA was extracted and RT-PCR was performed using specific primers (forward: 5'ATGGTGGCTTTCAAGGCAGCC13; reverse: 5'TAACCATGGGCGGCGC13) based on *R. microplus* gene sequence (T15540) deposited in BmiGI-TIGR Gene Indices (TGI) (Guerrero et al., 2005); and Gao et al. (2009). The PCR products were separated by electrophoresis on 0.8% agarose gel and a fragment with 516 bp was excised and purified using the Glassmilk DNA purification kit (BIO 101 Systems). The amplified fragments were ligated into pGEM-T easy vector (Promega), transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells, and sequenced using vector-specific primers (T7 and SP6).

In addition, for Bm05br, the procedure was continued until protein expression. Mature Bm05br protein-encoding sequence was directionally cloned into pET-5a expression vector. The Bm05br ORF was amplified from the pGEM-T clone containing Bm05br using the following gene-specific primers: forward: 5'TTTTTCATATGGTGGCTTTCAAGGCAGCC13; reverse: 5'AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTACCATGGGCCGCGCA13. The PCR product and pET-5a vector were digested with *Bam*HI and *Nde*I restriction enzymes. The amplicon was separated by electrophoresis on 0.8% agarose gel, excised, purified and ligated into plasmid pET-5a (Novagen).

2.4. Sequence alignment and phylogenetic analysis

DNA sequence analysis, amino acid translations and sequence alignments were done using BioEdit version 7.2.5 software (Hall, 1999). A rooted neighbor-joining phylogenetic tree was created using the MEGA software, version 5.05, for phylogenetic analysis using coding mRNA sequences (Tamura et al., 2011). Bootstrap support was assessed using 1,000 and 10,000 replicates. The prediction of a secretory signal sequence was investigated using SignalP4.1 server program (Nielsen et al., 1997). N-glycosylation was predicted using the NetNGlyc 1.0 server program (Gupta

et al., 2002). GenBank accession numbers of the sequences used in this work are: *R. microplus* Bm05br (KX611485), *R. annulatus* Ba05 (EF675686), *Haemaphysalis longicornis* (GQ499841.1), *I. scapularis* P19 (XM_002399589.1), *H. qinghaiensis* Hq05 (AY626791.1), *R. sanguineus sensu lato* Rs05br (KX611486), *R. microplus* Bm05uy (KX611484), *Pandinus cavimanus* (XM_015938856.1).

2.5. qRT-PCR

For analysis of mRNA expression levels using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), gene specific primers were designed (forward: 5' TTCGACCGTGCCAGGACTGAGI3 and reverse: 5'TGCACCTTGAGCCACGAAGTGGT3) to amplify a 133-bp fragment of *Bm05br*. The amplification of a 106-bp fragment of the 40S ribosomal RNA (Parizi et al., 2013) was used as a reference gene (forward: 5'ACGACCGATGGCTACTCTCCGCI3 and reverse: 5'TGAGGCGAAGCTGGTTGTGCTGAGCGI3). Relative quantification was carried out with 100ng of cDNA prepared from the gut, salivary glands, ovary and fat body of partially and fully engorged females, 14- and 18-day old eggs, and 16-day old larvae. Additionally, cDNA from ovary and salivary glands from ticks of different weights, as well as from ovaries dissected during RNAi silencing experiments, were analyzed by this protocol. Cycling parameters were 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. After amplification was complete, a melting curve analysis was performed using the default parameters of the instrument (Rotor Gene® Q, Qiagen). All samples were analyzed in duplicate and each experiment was repeated twice. The relative expression ratio of *Bm05br* gene in each experiment was calculated according to the mathematical model described by Pfaffl, (2001) and used in the Relative Expression Software Tool (REST –MCS©, version 2) (Pfaffl et al., 2002). PCR efficiency was calculated from the log-linear portion of the standard curves. Data were corrected for efficiencies (above 90%) for each primer assay individually, followed by normalization of expression of target genes to the expression of reference gene. The qPCR experiment was performed in accordance with the Minimum Information Required for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments (MIQE) Guidelines (Bustin et al., 2010) (Supplementary Fig. S2).

2.6. RNA interference

The *Bm05br* sequence (516bp) was amplified by PCR from the recombinant plasmid with gene-specific primers containing the T7 promoter recognition sites at the 5' ends (forward: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTGGCTTCAAGGCAGCCI3 and reverse: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGACCTGGATCTGAATGCCAI3).

The PCR product was purified using a Glassmilk DNA purification kit (BIO101Systems) and used to synthesize dsRNA with a T7 Ribo Max Express RNA Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The dsRNA synthesis was evaluated by 2% agarose gel electrophoresis, and the concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm (Ultrospec 1000, Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech). dsRNA produced from an unrelated gene, *MSPI* from *Plasmodium falciparum* (accession number AF061132), was used as control (dsCont). This gene was obtained from a plasmid kindly provided by Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de Parasitologia, USP, Brazil). To ensure dsRNA specificity and to exclude potential nonspecific targets, dsCheck program (Naito et al., 2005) was used to determine the dsRNA sequence. Because *R. microplus* genome is not available, this analysis was performed based on similar regions of the orthologous genes and genome sequences of *Drosophila melanogaster* (accession number AC092233). Also, BLAST algorithm was employed to identify pos-

sible off-target sequences using sequences deposited in Genbank (Sabirzhanov et al., 2011).

Partially engorged female ticks of the Porto Alegre strain (weighing between 25 mg and 45 mg) were manually removed from experimentally infested cattle. Groups of 23 females were immobilized on a glass plate covered with double-sided adhesive tape, and dsRNA solutions were injected into the hemocele (1 µL, 8 µg/tick) using syringe (Hamilton). These ticks were artificially fed using microhematocrit capillary tubes filled with blood from non-infested bovines, collected in the presence of sodium citrate (Gonsioroski et al., 2012; Pohl et al., 2011). The females were allowed to feed for approximately 28 h, and then kept in separate vials at 27–28 °C and 80–90% relative humidity. After 0 h, 24 h or 48 h of dsRNA injection (four females for each time-point), ticks were dissected and the ovaries were collected for RNA and protein extraction. The determination of ovarian growth phases was done by optical assessment of development using the ovarian growth phase (OGP) system (Seixas et al., 2008). The proportion of mature oocytes was analyzed by measuring the area occupied by mature and immature oocytes in each image, using the software ImageJ (Abràmoff et al., 2004). Before and after the feeding process, the females were weighed to determine blood ingestion. After that, the remaining females (11 ticks) were placed in Petri dishes and maintained at 27 °C and 85% humidity. The biological parameters analyzed were: nutrition index (NI), weight of eggs, weight of larvae and hatching rate (Bennett, 1974; Fabres et al., 2010).

2.7. Expression and purification of recombinant Bm05br (rBm05br)

E.coli BL21 (DE3) strain was transformed with the expression vector pET-5a containing the *Bm05br* coding region. The recombinant protein *Bm05br* was expressed in SOB medium with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37 °C for 4 h. After centrifugation (10,000 g; 5 min at 4 °C) the cell pellet was suspended in binding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, pH 7.4) with 20 mM imidazole. Cell disruption was achieved by sonication on ice at 40 MHz in 5 pulses of 30 s at 30 s intervals. The soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 10,000 g for 20 min at 4 °C. The soluble fraction containing the rBm05br was purified by nickel-chelating Sepharose chromatography (HisTrap, GE Healthcare). Briefly, samples were filtered through 0.45 µm-pore membranes (Whatman) and then applied onto the column previously equilibrated with binding buffer. Protein elution was done with imidazole gradient (100, 200, 300, and 500 mM). Protein concentration was determined using the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions.

2.8. Tick tissue, saliva, hemolymph and cement collection for protein extract preparation

Salivary glands, ovaries, guts, and fat bodies of partially and fully engorged ticks were separated using a fine-tipped forceps, washed, and homogenized in PBS using a pestle on an ice bath. The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C to remove insoluble material, and the soluble supernatant was collected. Protein extracts were prepared in PBS according to the method previously described (Da Silva Vaz et al., 1998). Tick hemolymph was collected as follows: engorged *R. microplus* females were washed in ethanol 70% and immobilized on Petri dishes kept at 4 °C; the cuticle was slit with a razor blade, the exuding hemolymph was recovered with pipette and stored at –20 °C. Saliva was collected after pilocarpine injection as previously described (Tirloni et al., 2014). To obtain cement, ticks were removed from calves and placed in a tube. Cement that

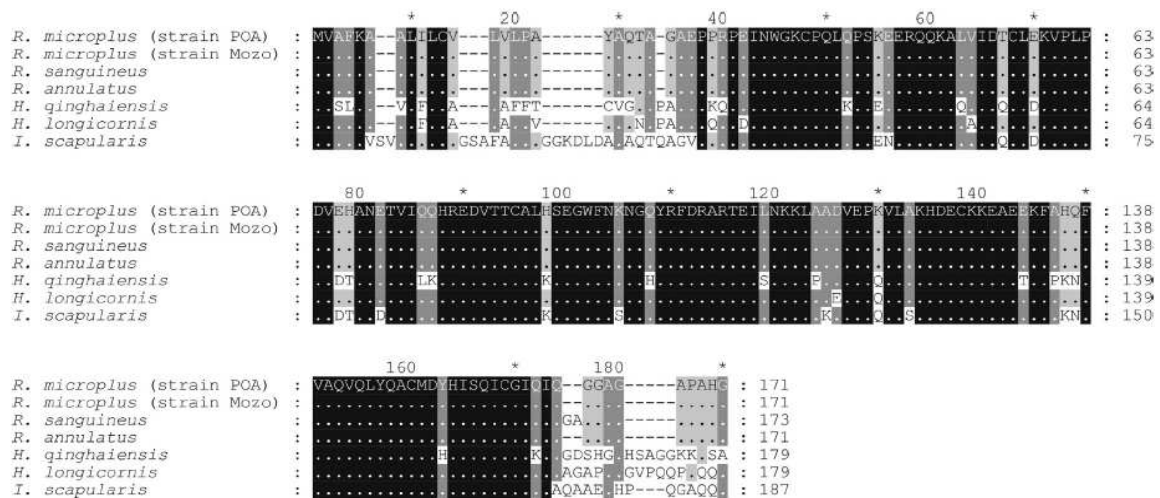


Fig. 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of Bm05br and similar tick sequences. Genbank accession numbers: *Rhipicephalus microplus* Bm05br (KX611485), *R. annulatus* Ba05 (EF675686.1), *Haemaphysalis longicornis* (GQ499841.1), *Haemaphysalis qinghaiensis* Hq05 (AY626791.1), *Ixodes scapularis* (XM_002399589.1), *R. sanguineus sensu lato* Rs05br (KX611486), *R. microplus* Bm05uy (KX611484), *Pandinus cavimanus* (XM_015938856.1). Numbers on the right indicate total number of amino acids on sequences in each line; the degree of residues conservation is indicated by the gray scale.

was still attached to mouthparts was removed using forceps. The cement was homogenized in PBS on a tissue grinder, and mixed with sample buffer (0.5 M Tris, pH 6.8, containing 10% SDS, β -mercaptoethanol 3% and glycerol 30%) in the following ratio: two volumes of cement suspension to one volume of sample buffer. The mixture was boiled for 5 min, and centrifuged at 14,000 g for 10 min (Bishop et al., 2002). All supernatants were analyzed on 12% SDS–PAGE gels, as described below.

2.9. Anti-Bm05br serum production

One rabbit was subcutaneously immunized three times at 14-days intervals, with 100 μ g of rBm05br emulsified in Montanide 888/Marcol 52 adjuvant (Exxon Mobil Corporation). The rabbit's blood was collected 14 days after the last booster, and serum was separated by centrifugation at 10,000 g for 5 min at 4 °C. Serum aliquots were preserved at –20 °C until use. IgG was purified from serum samples using HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare) following the manufacturer's recommendations.

3. SDS-PAGE and Western blot analyses

rBm05br production and the presence of native Bm05br in tissues were analyzed by SDS–PAGE (Laemmli, 1970) and Western blot (Johnson et al., 1984). For Western blot analyses, rBm05br (1 μ g protein/lane), saliva (20 μ g protein/lane), hemolymph (60 μ g protein/lane) and tissue extracts (50 μ g protein/lane) were resolved in 12%–SDS–PAGE, followed by electrotransfer to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk–0.1% Tween in PBS and further incubated with anti-rBm05br rabbit serum (1:400 for tissue from dsRNA-treated ticks or 1:1,000 for all other tissue samples). Polyclonal antibody against actin (A2066, Sigma) was used (1:2,000) as loading control in samples from RNAi experiments, to normalize the signal from the target protein. Pre-immune serum was used as negative control (1:400 for tissue from dsRNA-treated ticks or 1:1,000 for all other tissue samples). Alternatively, for rBm05br expression analysis, anti-histidine tag antibodies (1:1,000) were also used. After primary incubations, anti-IgG alkaline phosphatase conjugate (1:5,000) was used

as secondary antibodies. Alkaline phosphatase revelations were performed with NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Sigma) in development solution (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl in 100 mM Tris pH 9.5).

3.1. Statistical analyses

ANOVA and Tukey post hoc test ($p < 0.05$) were used for qRT-PCR analysis; for qRT-PCR of RNAi samples, larvae weight, and hatching rate, ANOVA was used followed by Dunnett's test ($p < 0.05$). All analyses were performed using Graph Pad Prism version 6.00 Software (Graph Pad Software, Inc.).

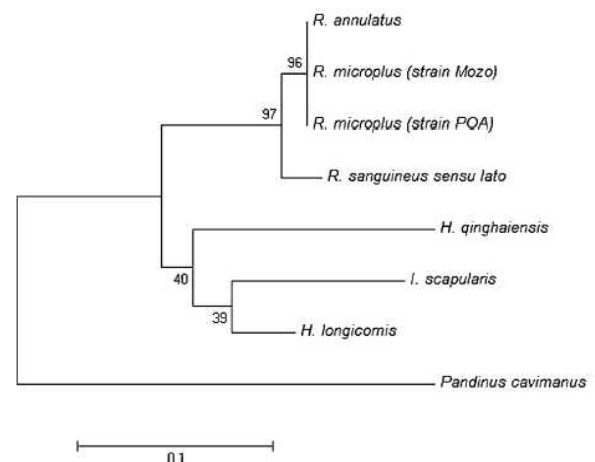


Fig. 2. Phylogenetic tree of Bm05br from *Rhipicephalus microplus* and other selected sequences, generated by the program MEGA. The tree was built using neighbor-joining method based on the alignment of the nucleotide sequences (10,000 replicates). Numbers close to the nodes show the support value for each branch. GenBank accession number for all sequences can be found in Material and methods.

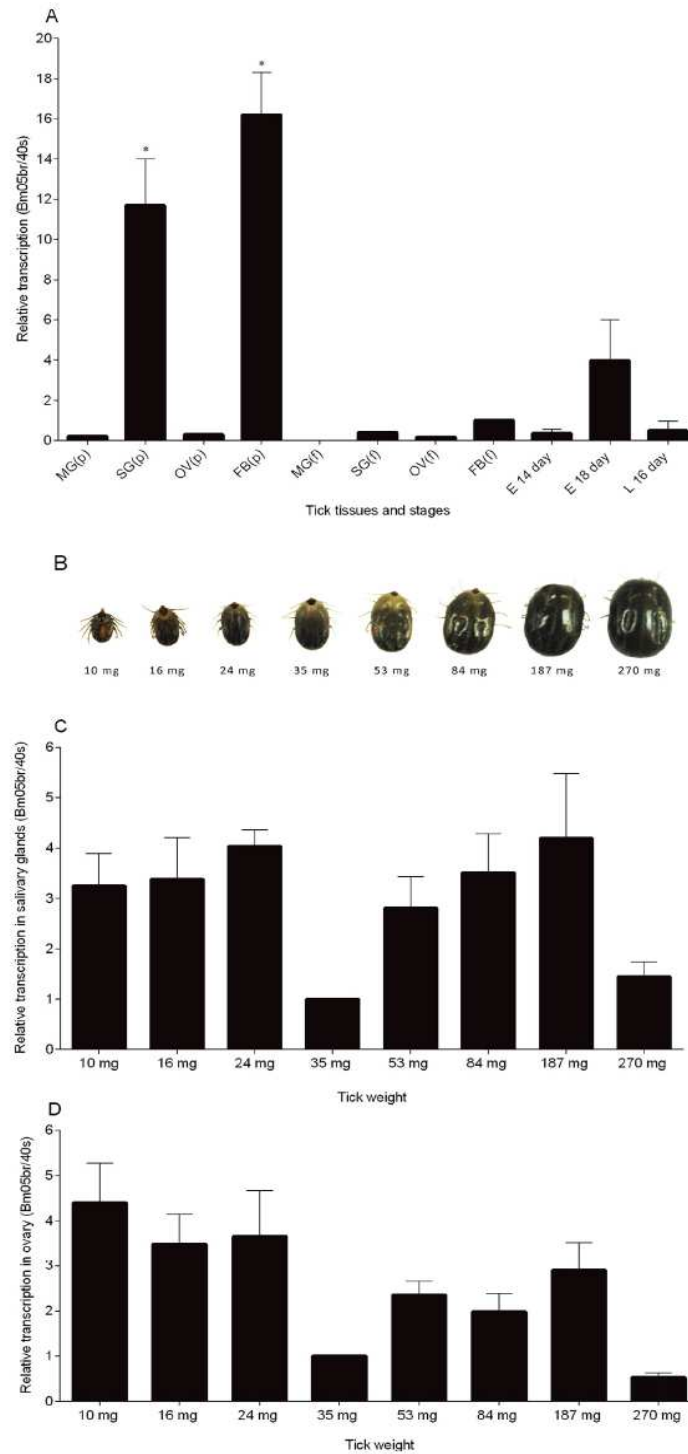


Fig. 3. Bm05br gene expression profile in *Rhipicephalus microplus* tissues and different stages. (A) Relative expression refers to Bm05br expression (1 unit) in fully engorged female fat body. (B) Representative images of ticks allocated by weight in the different groups used for Bm05br expression profile. (C and D) Gene expression patterns in salivary glands (C) and ovaries (D) from ticks of different weights. Relative expression refers to Bm05br expression (1 unit) from salivary glands or ovary of partially engorged adult

4. Results

4.1. Bm05br, Bm05uy and Rs05br sequence analyses

Bm05br nucleotide sequence showed an ORF of 516 bp, and the 171-residue deduced amino acid sequence containing a signal peptide with cleavage site between amino acid residues 19 and 20. The predicted molecular mass for the mature protein is 19 kDa. The deduced protein has one potential N-glycosylation site, Asn-Glu-Thr, at position 69–71. Comparative analysis of Bm05br and Bm05uy (cloned from tick strain Mozo) indicated 100% identity in mRNA and protein sequences.

The nucleotide sequence of Rs05br from *R. sanguineus* sensu lato showed an ORF of 522 bp, encoding a polypeptide of 173 amino acids with a calculated molecular weight of 19.2 kDa. Comparative analysis of Bm05br and Rs05br showed 95% identity in nucleotide sequence, and 99% in the amino acid sequence.

Comparison of *R. microplus* Bm05br and Bm05uy protein sequences with tick homologous sequences in GenBank showed 100% identity with *R. annulatus* Ba05, whereas similarities of 86%, 67% and 62% were found for sequences from *H. longicornis*, *I. scapularis* and *H. qinghaiensis*, respectively (Fig. 1).

4.2. Phylogenetic analysis

A neighbor-joining tree constructed with Bm05br, Bm05uy, Rs05br and other nucleotide sequences is shown in Fig. 2. This analysis indicates that *Rhipicephalus* spp sequences (*R. microplus*, *R. annulatus* and *R. sanguineus* sensu lato) grouped in the same clade, while sequences from *Haemaphysalis* spp (*H. longicornis* and *H. qinghaiensis*) and *Ixodes scapularis* form a clade distinct from *Rhipicephalus*.

4.3. Bm05br gene expression profile

To evaluate tissue- and life stage-specific expression of *Bm05br*, total RNA from eggs, larvae, and from adult organs (salivary glands, ovaries, midgut and fat body of partially and fully engorged female ticks) were subjected to qRT-PCR analysis. *Bm05br* transcription was detected in all tissues and stages evaluated, except in the midgut of fully engorged ticks (Fig. 3A). *Bm05br* mRNA was present in salivary gland and ovary, regardless of the tick's weight (Fig. 3B, C and D). The highest *Bm05br* expression levels were observed in fat body and salivary glands of partially engorged females. Also, *Bm05br* expression was detected in all stages of egg development analyzed. A more detailed analysis of *Bm05br* expression in salivary glands showed the presence of transcripts in partially engorged female ticks weighing between 10 mg and 270 mg (Fig. 3C). Similarly, *Bm05br* was detected in ovary tissue of partially engorged ticks of the same weight range (Fig. 3D).

4.4. Production of recombinant Bm05br protein

rBm05br was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography, eluting at 100 mM and 200 mM imidazole. The protein was detected in the soluble fraction, and Western blot analysis revealed a protein of approximately 19 kDa recognized by anti-histidine antibodies (Fig. 4A). This result is in accordance with *in silico* molecular weight estimation (19.19 kDa). The purified rBm05br was used for subsequent rabbit immunization and Western blots.

4.5. Recognition of native Bm05br by immune sera

Rabbit serum against rBm05br was able to recognize the native protein, and was used to determine the presence of Bm05br in *R. microplus* tissues. Native Bm05br (apparent molecular mass of 19 kDa) was recognized in ovaries and salivary glands of ticks of different weights (Fig. 4B) by the serum. The protein was present in all tissues, except the midgut, from partially and fully engorged female ticks and in cement (4C). Bm05br was recognized in salivary glands of partially engorged females weighing between 21 and 70 mg, as well as in fully engorged females. In ovary, Bm05br was recognized in ticks weighing between 40 mg and 70 mg, and in fully engorged females. Similarly, Bm05br was identified in saliva of partially and fully engorged ticks and in male (Fig. 4C). The pre-immune serum did not recognize native Bm05br in these tissues (Supplementary Fig. S1).

4.6. RNA interference silencing of Bm05br gene

Individual qRT-PCR analysis of four tick ovaries (from females weighing between 25 mg to 40 mg) from each experimental group showed a decreased abundance of Bm05br mRNA in Bm05br-dsRNA-treated ticks compared to PBS and MSP1-dsRNA injected controls; the difference was observed in most of the ovaries evaluated 48 hours after the dsRNA inoculation (Fig. 5A). Also, the expression of Bm05br protein was reduced in Bm05br-dsRNA-treated ticks compared to PBS and MSP1-dsRNA injected controls (Fig. 5B). Ovaries dissected from females injected with Bm05br-dsRNA presented significantly delayed development (Fig. 5C). According to the ovarian growth phase (OGP) system proposed by Seixas et al. (2008), Bm05br-dsRNA injected females showed ovaries between OGP stages 1 and 2, whereas the controls exhibited ovaries around OGP 3 and 4 (Fig. 5C). The proportion of mature oocytes decreased from 60% in PBS control group to 10% in Bm05br-dsRNA-treated ticks (Fig. 5C). The nutrition efficacy index and weight of eggs was not affected by Bm05br gene knockdown (Fig. 6A and B). However, RNAi treatment with Bm05br-dsRNA had significant effects on parameters associated with reproduction, like eggs hatching rate (Fig. 6C and E) and larvae weight (Fig. 6D and E). Analysis of the transcription level in salivary glands was attempted; however, due to the small size of these organs, the qRT-PCR analysis was not feasible.

5. Discussion

In response to concerns regarding the spread of worldwide acaricide resistance, new tick control strategies, such as vaccines, have been proposed (Willadsen, 2006). The success of a tick vaccine depends on the identification and characterization of immune-protective molecules. Recently, a proteomic analysis in *R. microplus* saliva identified a protein denominated Bm05 (Tirloni et al., 2014). This protein was classified in the group of "secreted conserved proteins", which are proteins abundant in *R. microplus* saliva, and with probable role in tick feeding. In the present work, we analyzed the sequence, tissue localization and the biological effect of silencing Bm05br by RNAi, in order to improve the knowledge about the role of this protein on tick physiology.

Bm05br sequence is conserved, with homologues in other tick species. Comparison of the deduced amino acid sequence of Bm05br with other tick sequences showed that this protein is similar to *R. annulatus*, *H. longicornis*, *I. scapularis* and *H. qinghaiensis* proteins. Additionally, Bm05br and Rs05br (from *R. sanguineus*

female ticks (35 mg). MG, midgut; SG, salivary glands; OV, ovary; FB, fat body; E, eggs; L, larvae; (p), partially engorged adult female ticks; (f), fully engorged adult female ticks. Numbers indicate the day of eggs and larvae collection. Asterisks (*) denote significant differences as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

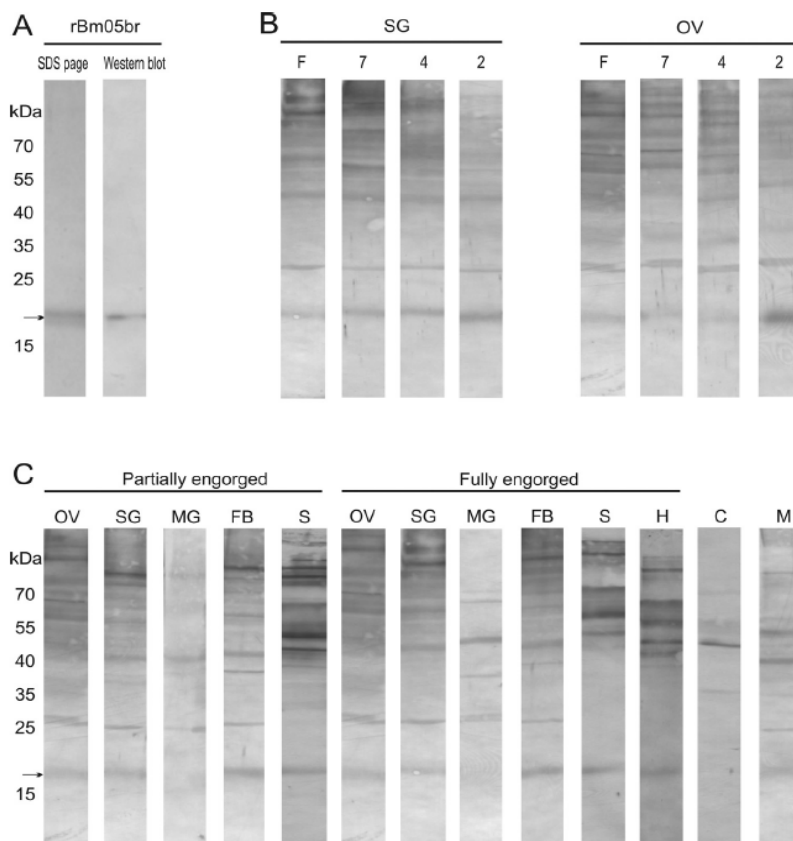


Fig. 4. Presence of native Bm05br in *Rhipicephalus microplus* tissues. (A) Recombinant Bm05br analyzed by SDS-PAGE 12% stained with Coomassie blue G-250 and by Western blot using anti-histidine tag antibodies. (B) Salivary glands (SG) and ovaries (OV) of *R. microplus* fully engorged females (F) or partially engorged females (three groups: 7, 41 mg to 70 mg; 4, 21 mg to 40 mg; and 2, 20 mg or less) were analyzed by Western blot. (C) Tick tissues were analyzed by Western blot using rBm05br anti-serum. SG, salivary glands; OV, ovary; FB, fat body; MG, midgut; S, saliva; H, hemolymph; C, cement; M, male.

sensu lato) are very similar, differing only by two amino acids in the mature protein. Accordingly, analysis of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *R. microplus* Bm05br (Porto Alegre strain) and Bm05uy (Mozo strain) shows they are identical. Bm05br homologues have molecular weights around 26 kDa (Shahein, 2008); however, in *H. qinghaiensis* two isoforms of Hq05 were identified, with molecular weights of 23 kDa and 20 kDa. In our study, we identified only one 19-kDa isoform, both in *R. microplus* and in *R. sanguineus sensu lato*. One N- glycosylation site is predicted in Bm05br and in Rs05br amino acid sequences (identified by *in silico* analyses), like found for Hq05 and Ba05, which can contribute for the observed molecular weight variations. Also, the phylogenetic tree of Bm05br nucleotide sequences and other ixodidae tick species shown in Fig. 2 indicates that this gene is conserved among all tested tick species. The finding that *R. microplus* and *R. annulatus* have identical sequences was not unexpected, since these species are genetically closely related.

Hq05, the Bm05 homologue from *H. qinghaiensis*, induced important levels of immune protection in sheep, when used as vaccine antigen against *H. qinghaiensis*; the vaccine caused a reduction of 40% and 37% in egg laying and hatching rate, respectively, suggesting Hq05 is important for tick reproduction (Gao et al., 2009). This is interesting since a vaccine based on Bm05br may also induce immunity and confer protection against other tick species, partic-

ularly considering the degree of sequence conservation found in the closest homologues. Furthermore, Bm05br is also expressed in males and, although the exact biological function of Bm05br in male remains to be explained, it could also serve as a target for the host immune system.

Bm05br and *R. annulatus* Ba05 (Shahein, 2008) have similar expression profile, being detected in eggs and larvae. In contrast, Hq05 was not detected in eggs and larvae of *H. qinghaiensis* (Gao et al., 2009). Our experiments showed that Bm05br gene expression is higher in salivary glands of partially engorged ticks than of fully engorged ticks, suggesting that Bm05br could play a role during tick feeding. The Bm05br protein was detected in female salivary glands, ovaries, fat body, saliva and hemolymph, but not in midgut of partially and fully engorged ticks. The presence of Bm05br in partially and fully engorged female ovaries may suggest a role for this protein in tick reproduction.

The presence of Bm05br protein in female salivary glands and saliva is in accordance with previous proteomic analyses that showed Bm05 in *R. microplus* saliva (Tirloni et al., 2014), suggesting the participation in blood uptake. As demonstrated for some of its homologous proteins, rBm05br showed to be immunogenic in rabbits. The native protein was recognized by serum produced against the recombinant protein. In this study, Bm05br was also recognized by specific antibodies against saliva of partially engorged

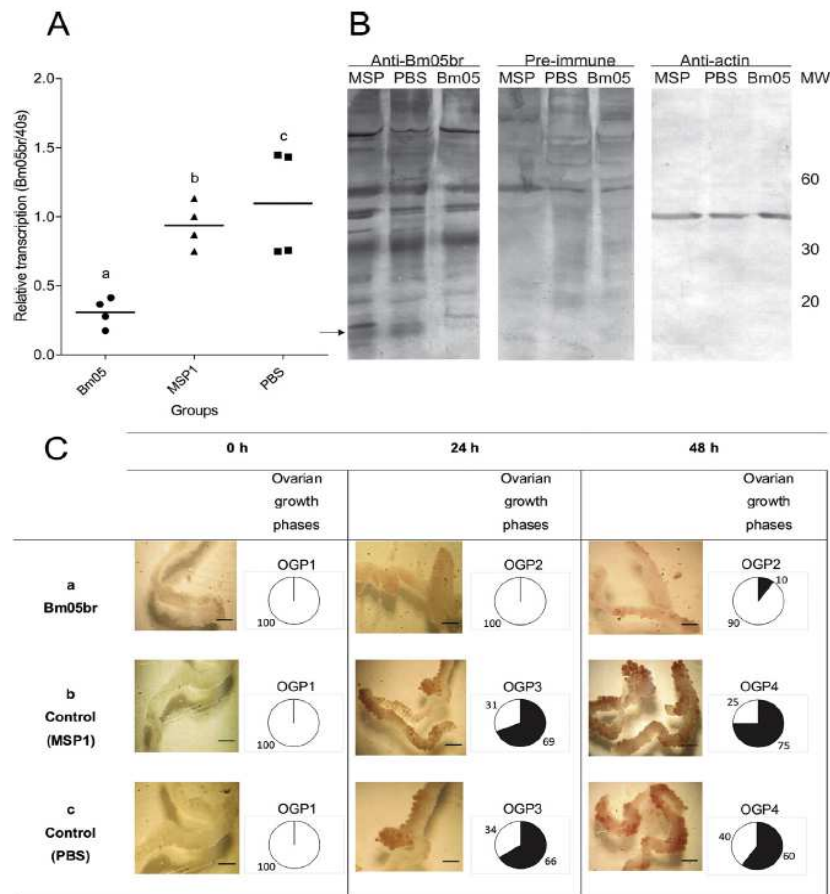


Fig. 5. RNAi-mediated Bm05br silencing in *Rhipicephalus microplus* tick ovary. (A) Relative expression of Bm05br was determined by qRT-PCR using RNA extracted from ovaries of four *R. microplus* females collected 48 hours after repletion and injected with Bm05br-dsRNA (Bm05br), and from ticks in control groups (MSP1-dsRNA or PBS). Points represent results from individual ticks, and the line indicates the group's average. (B) Effect of Bm05br-dsRNA on Bm05br protein levels in ovary. Total protein was extracted from the ovary of dsRNA-injected and control ticks. Immunoblotting was performed using antibodies against Bm05br. Serum against actin, and pre-immune serum were used as loading and negative control, respectively. (C) Ovaries from females injected with Bm05br-dsRNA (a), control MSP1-dsRNA (b), or PBS (c) were dissected at 0 h, 24 h and 48 h after dsRNA inoculation for optical assessment of development. The proportion of mature and immature oocytes was analyzed by area measurements, as described in Material and methods. Developed oocytes area is indicated (black). Scale bar: 5 mm. Different letters indicate significant differences as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (a, b) ($P < 0.05$) (a, c) ($P < 0.01$).

R. microplus. In contrast to our results, rHq05 was not recognized by anti-tick saliva serum, suggesting that native Hq05 is not present in saliva (Gao et al., 2009), or it is not immunogenic for the host during natural parasitism due to the low concentration in saliva, as observed for other proteins (Chmelář et al., 2016). Calreticulin is another example of salivary tick protein which shows a low immunogenicity when naturally inoculated in the host during tick feeding (Sanchez Ferreira et al., 2002). Nevertheless, non-immunogenic salivary proteins can be immunogenic when inoculated in the presence of adjuvant (Szahó et al., 1995; Sanchez Ferreira et al., 2002). Ticks secrete a cement cone composed of many salivary proteins; however Bm05br was not recognized by specific antibodies in cement of *R. microplus*.

RNA interference technique was used to study the function of Bm05br in ticks. To evaluate the biological role of Bm05br by RNAi experiments, qRT-PCR and Western blot were performed using ovary and salivary glands dissected from treated and control groups. Because *R. microplus* is a one-host tick and do not reattach

to the host after being removed, we took advantage of the artificial feeding technique already established in our lab using bovine blood (Pohl et al., 2011; Gonsioroski et al., 2012), in order to analyze the effects of Bm05br gene silencing in ticks's reproduction. For this experiment, partially engorged female ticks weighting between 25 mg and 45 mg were used, since this stage is adequate for artificial feeding through capillaries (Pohl et al., 2011; Gonsioroski et al., 2012).

Several previous RNAi experiments have shown that double-stranded RNAs are effective to knock down different genes in ticks (Nijhof et al., 2007; Kocan et al., 2007; Fabres et al., 2010; Pohl et al., 2011; Lara et al., 2015; Hajdusek et al., 2016). In this study, when female ticks were injected with Bm05br-dsRNA, Bm05br RNA and protein levels in ovaries decreased and remained low up to 48 h post-inoculation, compared with the control groups. Ovaries from females injected with Bm05br-dsRNA also showed smaller size and delayed oocyte development. According to the ovarian growth phase (OGP) system proposed by Seixas et al. (2008), Bm05br-

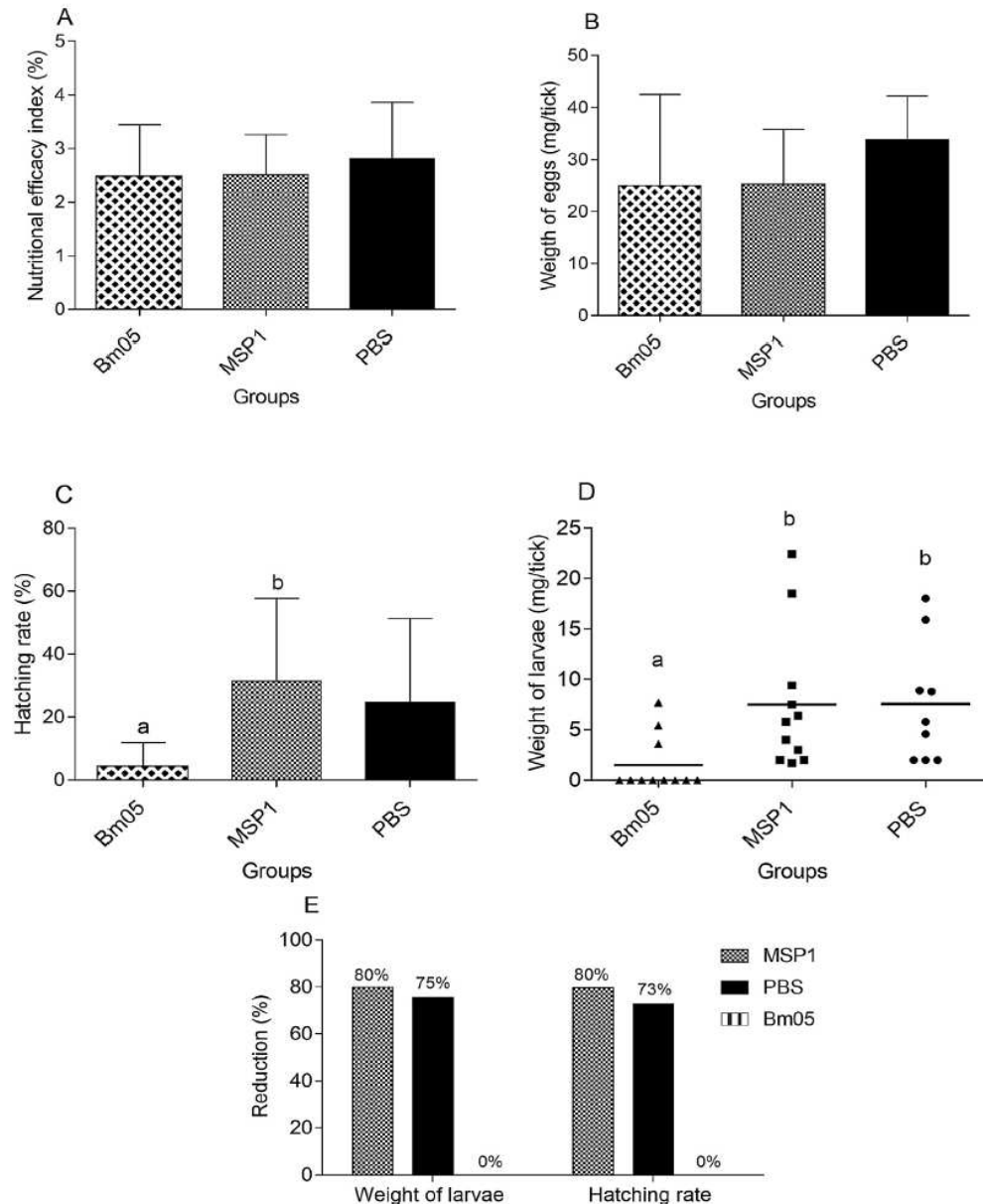


Fig. 6. Effect of Bm05br silencing by RNAi on parameters associated to feeding and oviposition in partially fed *Rhipicephalus microplus* females. Ticks were artificially fed through capillaries, and kept at 27 °C and 80% relative humidity. Analyzed parameters were: (A) Nutritional efficacy index (%); (B) eggs weight (mg/tick); (C) hatching rate (%); (D) larvae weight (mg/tick). (E) Percentage reduction of eggs and larvae weight in treated group is presented relative to controls. Different letters indicate significant differences as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

dsRNA injected females generally possessed ovaries between OGP 1 (thin and translucent ovaries, oocytes are ovoid in shape and less than 150 μm in length) and OGP 2 (same oocytes have grown to about 250 μm in length, are opaque, but have not yet taken up a visible amount of yolk). The controls, in turn, generally exhibited ovaries of approximate OGP 3 (growth of the ovary has occurred, due primarily to oocyte development; many oocytes are as large as 400 μm and with brown color, showing the presence of yolk gran-

ules) and OGP 4 (ovary is the largest organ in the haemocoel and is completely covered with large, yolk-filled oocytes). A delay in ovary development was observed in virgin *Amblyomma hebraeum* females treated with the hormone 20-hydroxyecdysone, but not with the "vitellogenin uptake factor" (Seixas et al., 2008). In addition, 73% and 79% reduction in egg hatching and 75% and 80% reduction in the weight of larvae were observed in the Bm05br-dsRNA-treated group compared with PBS and MSP1 controls, respectively. These

biological effects, associated to a reduction in Bm05br gene expression in the treated ticks, suggest that Bm05br may be involved in tick reproduction.

In conclusion, we have characterized *R. microplus* Bm05br and showed that a reduction in Bm05br expression can interfere with tick reproductive biology. Taken together, these results suggest that Bm05br may have a role in oogenesis, oocyte development and embryogenesis in ticks. Finally, the data suggest that this molecule can be used as an antigen in the development of a multispecies vaccine to be used as an alternative method for tick control.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular, CAPES (Brazil) and Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ProyectoPPTA-270, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (POS.NAC.2013.1.12235) (Uruguay).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.008>.

References

- Abbramoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.*, <http://dx.doi.org/10.1117/1.3589100>.
- Aljamali, M.N., Bior, A.D., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2003. RNA interference in ticks: A study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol.* 12, 299–305.
- Bennett, G.F., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature humidity and light. *Acarologia* 16, 250–257.
- Bishop, R., Lambson, B., Wells, C., Pandit, P., Osaso, J., Nkonge, C., Morzaria, S., Musoke, A., Nene, V., 2002. A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*, located in the secretory cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. *Int. J. Parasitol.* 32, 833–842.
- Bowman, A., Dillwith, J., Sauer, J., 1996. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol. Today* 12, 388–396.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S.B., Olsvik, P.A., Penning, L.C., Toegel, S., 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* 11.
- Chmelař, J., Kotál, J., Kopecký, J., Pedra, J.H.F., Kotsyfakis, M., 2016. All For One and One For All on the Tick-Host Battlefield. *Trends Parasitol.* 32, 368–377.
- Cunha, N.C., Fonseca, A.H., Rezende, J., Rozental, T., Favacho, A.R.M., Barreira, J.D., Massard, C.L., Lemos, E.R.S., 2009. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesqui. Veterinária Bras.* 29, 105–108, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000200003>.
- Da Silva Vaz, I., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., Rosa De Lima, M.F., Gonzales, J.C., Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A., 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 331–341.
- de la Fuente, J., Contreras, M., 2015. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14, 1367–1376.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., 2007. Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Vet. Res. Commun.* 31, 85–90.
- Fabres, A., De Andrade, C.P., Guizzo, M., Sorgine, M.H.F., De, O., Paiva-Silva, G., Masuda, A., Da Silva Vaz, I., Logullo, C., 2010. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology* 137, 1537–1546.
- Galay, R.L., Hernandez, E.P., Talactac, M.R., Maeda, H., Kusakisako, K., Umamiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T., 2016. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 813–816.
- Gao, J., Luo, J., Fan, R., Schulte-Spechtel, U.C., Fingerle, V., Guan, G., Zhao, H., Li, Y., Ren, Q., Ma, M., Liu, Z., Liu, A., Dang, Z., Sugimoto, C., Yin, H., 2009. Characterization of a concealed antigen Hq05 from the hard tick *Haemaphysalis qinghaiensis* and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep. *Vaccine* 27, 483–490.
- Gonsioroski, A.V., Bezerra, I.A., Utiumi, K.U., Driemeier, D., Farias, S.E., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2012. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. *Exp. Parasitol.* 130, 359–363.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rousseau, M.E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., Nene, V., 2005. BmIGI A database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 585–595.
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S., 2002. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *Pacific Symp. Biocomput.* 7, 310–322.
- Hajdusek, O., Sima, R., Perner, J., Loosova, G., Harcubova, A., Kopacek, P., 2016. Tick iron and heme metabolism – New target for an anti-tick intervention. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 565–572.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*
- Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H., 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* 1, 3–8.
- 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. *Parasitol. Res.* 100, 1411–1415.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lara, F.A., Pohl, P.C., Gandara, A.C., Ferreira, J.D.S., Nascimento-Silva, M.C., Bechara, G.H., Sorgine, M.H.F., Almeida, I.C., Vaz, I.D.S., Oliveira, P.L., 2015. ATP binding cassette transporter mediates both heme and pesticide detoxification in tick midgut cells. *PLoS One* 10, 1–20.
- Miyoshi, Tsuji, Islam, N., Kamio, M.K., Fujisaki, K., 2004. Gene Silencing of a Cubilin-Related Serine Proteinase from the Hard Tick *Haemaphysalis longicornis* by RNA Interference. *J. Vet. Medicine Sci.* 66, 1471–1473.
- Naito, Y., Yamada, T., Matsumiya, T., Ui-Tei, K., Saigo, K., Morishita, S., 2005. dsCheck: Highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 33, W589–591.
- Narasimhan, S., Montgomery, R.R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J.F., Sauer, J.R., Cappello, M., Kantor, F.S., Fikrig, E., 2004. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1141–1146.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10, 1–6.
- Nijhof, A.M., Taoufik, A., de la Fuente, J.J., Kocan, K.M., de Vries, E., Jongejans, F., 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin: in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 37, 653–662.
- Parizi, L., Acevedo, N.W., Benavides, C., Seixas, U., Logullo, A., Konnai, C., Ohashi, S., Masuda, K., da Silva, A., Vaz, I.J., 2013. Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 492–499.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 1323–1333.
- Sabirzhanov, B., Sabirzhanova, I.B., Keifer, J., 2011. Screening target specificity of siRNAs by rapid amplification of cDNA ends (RACE) for non-sequenced species. *J. Mol. Neurosci.* 44, 68–75, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-011-9514-6>.
- Sanchez Ferreira, C.A., Da Silva Vaz Jr., I., Silvada Silva, S., Haag, K., Valenzuela, J., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* calreticulin. *Exp. Parasitol.* 25–34.
- Schuijt, T.J., Narasimhan, S., Daffre, S., DePonte, K., Hovius, J.W.R., van't Veer, C., van der Poll, T., Bakhtiari, K., Meijers, J.C.M., Boder, E.T., van Dam, A.P., Fikrig, E., 2011. Identification and characterization of *Ixodes scapularis* antigens that elicit tick immunity using yeast surface display. *PLoS One* 6, e15926.
- Seixas, A., Friesen, K.J., Kaufman, W.R., 2008. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.* 54, 1175–1183.
- Shahein, Y.E., 2008. Molecular cloning and expression of a larval immunogenic protein from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 281–289.
- Szabó, M.P.J., Mukai, L.S., Rosa, P.C.S., Bechara, G.H., 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 32, 43–50.
- 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.
- Tirloni, L., Reck, J., Terra, R.M.S., Martins, J.R., Mulenga, A., Sherman, N.E., Fox, J.W., Yates, J.R., Termignoni, C., Pinto, A.F.M., Vaz, I.D.S., 2014. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS One* 9, e94831.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138, 161–168.

Datos completos de evaluación de la capacidad protectora de Bm05br serán presentados en un artículo en redacción:

A vaccine cocktail protects against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*

Uruguaysito Benavides; María Fernanda Alzugaray; Carolina Acevedo; Gabriela Sabadin; Luis Fernando Parizi; Lucas Tirloni; Adriana Seixas; María Angélica Solari; Ulises Cuore; Patricia Berasain, Carlos Logullo; Itabajara da Silva Vaz Jr.

8.3. ANEXO 3: MEDIO DE CULTIVO, SOLUCIONES Y PROTOCOLOS GENERALES

MEDIOS DE CULTIVO:

Medio Luria-Bertani (LB): 10 g triptona; 5 g extracto de levadura; 10g NaCl. Se llevo a un litro con agua destilada, se ajusto el pH a 7 y se esterilizó mediante autoclavado a 1 atm durante 20 min.

Para los medios solidos se agregó 1.5% agar.

Se utilizó Ampicilina y se agregó a una concentración de 50 mg/ml

Medio SOB: 20 g de triptona; 5 g de extracto de lavadura y 0,5 g de NaCl por litro. Luego de esterilizar mediante autoclavado 1 atm. durante 20 min, se agregan 10 ml de KCl 250 mM y 5 ml de MgCl₂ estériles.

SUPLEMENTOS:

Ampicilina: Se prepara una solución madre 100 mg/ml en H₂O.

Bromuro de Etidio (EtBr): Se prepara una solución madre de 10 mg/ml en H₂O.

Isopropil β-D-1 –tiogalactopiranosido (IPTG): Se prepara una solución madre 100 mM en H₂O

SOLUCIONES:

Soluciones utilizadas para extracción y análisis de RNA

H₂O DEPC: 1 ml de DEPC (diethylpyrocarbonato) en 1 lts de agua miliQ.

Etanol 70%: 70 ml Etanol, 30 ml de H₂O destilada.

Soluciones utilizadas para la extracción y análisis de DNA

Solución I: Glucosa 50Mm, Cl 25mM (pH8); EDTA 10Mm (pH 8)

Solución II: NaOH 0,2N; SDS 1% (preparar en el momento)

Solución III: Acetato de K 5M; Acido Acético, H₂O

Buffer Tris-acetato (TAE) 50X: 242 g de Tris base; 57,1 ml de ácido acético glacial; 10 ml EDTA 0,5M pH8 por litro.

Buffer de carga 6X para DNA: 30% glicerol; 0,25% azul de bromofenol; 0,25% azul de xilencianol.

Soluciones utilizadas para la expresión y análisis de proteínas

SDS-PAGE:

Sample buffer (SB) 4X: 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 400 mM DDT; 8% SDS; 0,4% Azul de bromofenol y 40% de glicerol.

Buffer de corrida Tris-glicina: 25 mM Tris, 250 mM glicina pH 8,3; 0,1% SDS.

Azul de Coomassie: 0,05% Coomassie brilliant blue; 45% EtOH; 10% ácido acético.

Solución decolorante: 70% Ácido acético, 30% EtOH.

Western blot:

Buffer de transferencia: 25 mM Tris, 250 mM glicina pH8,3; 0,1% SDS; 20% v/v EtOH.

PBS (Phosphate Buffered Saline): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄.

PBST (PBS +Tween 20): PBS plus, 0,05% Tween 20 v/v)

Solución de bloqueo para Western blot: PBST, 5% leche en polvo descremada, p/v).

TRF (Buffer de revelación para Fosfatasa): 100 mM Tris- HCl pH9,5; 100mM NaCl; 5mM MgCl₂

Purificación por Columnas HisTrapTM FF[®]

Buffer de ligación: 20 mM Fosfato de Sodio, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4

Buffer de elusión (100 mM a 500 mM): 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 100 a 500 mM imidazole, pH 7.4

Purificación por Columnas HiTrapTM Protein G HP[®]

Buffer de ligación: Na₂HPO₄·7H₂O 20 mM pH 7,0.

Buffer de elusión: Glicina-HCl 100mM pH 2,7.

Buffer de Neutralización: Tris-HCl 1M pH 9,0

Protocolos complementarios y descripciones generales:

a. Cepa Bacteriana *E. coli* TOP10 (Invitrogen)

Esta cepa bacteriana es ideal para amplificar plásmido para su producción con alta eficiencia. Permite la replicación estable del plásmido con alto número de copias. El genotipo de las células TOP10 ofrece las siguientes características: F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(araleu)$ 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. Debido a la mutación en el gen *endA1* esta cepa es deficiente en endonucleasas lo que mejora la producción de DNA plasmídico. Además la mutación en el gen *recA1* implica que son deficientes en recombinación, lo que aumenta la estabilidad del inserto en un plásmido. La mutación *hsdR* impide el clivaje del DNA por el sistema de endonucleasas EcoK. El gen *lacZ* $\Delta M15$ en el epitoma F' permite la selección por color azul-blanco de los plásmidos recombinantes y el gen *mcrA* es importantes para la transformación eficiente del DNA metilado en los preparados genómicos. (One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen).

b. Preparación de células competentes para choque térmico

Se incubó colonias aisladas de una placa fresca en 100ml de LB. Se llevó al shaker 37°C por aproximadamente 3 hs, hasta que llegó a una DO₆₀₀ aproximadamente de 0,35- 0,4. Se comenzó a procesar cuando llegó a 0,35. Se transfirió a tubos estériles de 50 ml, colocando luego 10 min en hielo. Se centrifugó a 2.700g por 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet con 30 ml de MgCl-CaCl₂ (80mM MgCl₂, 20mM CaCl). Se centrifugó nuevamente a 2.700 g por 10 min a 4°C y se descartó el medio. Luego se resuspendió con vortex suave en 2 ml de 0,1M de CaCl₂ por cada 50 ml del cultivo original y por último se congeló las células competentes, para lo cual se juntó los 2 ml de cada tubo obtenido anteriormente y se agregó 140 μ l de DMSO por cada 4 ml de células resuspendidas, mezclando suavemente y dejando 15 minutos en hielo. Luego de los 15 minutos se repitió este último procedimiento. Se alicuotó de a 50 μ l en tubos estériles y se guardó a -70°C.

9. REFERENCIAS

- Abbassy, M., Stein, K. & Osman, M., 1994. New artificial feeding technique for experimental infection of Argas ticks (Acari: Argasidae). *Journal of medical entomology*, 31(2), pp.202–205.
- Abel, I. et al., 2008. Artificial feeding of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) fasting females through capillary tube technique. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, (17), pp.128–132.
- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J., 2004. Image processing with imageJ. *Biophotonics International*, 11(7), pp.36–41.
- Agianian, B. et al., 2003. Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology*, 326(1), pp.151–165.
- Ali, A. et al., 2016. A revision of two distinct species of Rhipicephalus: R. microplus and R. Australis. *Ciência Rural, Santa Maria* .
- Alim, M.A. et al., 2009. Legumains from the hard tick Haemaphysalis longicornis play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. *International Journal for Parasitology*, 39(1), pp.97–107.
- Aljamali, M.N. et al., 2003. RNA interference in ticks: A study using histamine binding protein dsRNA in the female tick Amblyomma americanum. *Insect Molecular Biology*, 12(3), pp.299–305.
- Aljamali, M.N., Sauer, J.R. & Essenberg, R.C., 2002. RNA interference: Applicability in tick research. *Experimental and Applied Acarology*, 28(1–4), pp.89–96.
- Alvarado, R.. & Gonzalez, J.C., 1979. A postura e a viabilidade do Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) en condiciones de laboratorio. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, (21), pp.31–36.
- Alves-Branco, F. de P.J., Echevarria, F.A.M. & Siqueira, A.S., 1983. Garça-vaqueira (Egretta ibis) e o controle biológico do carrapato (Boophilus microplus). *Comunicado Técnico da EMBRAPA*,

1, pp.1–4.

Alzugaray, M.F., 2012. Búsqueda del antígeno “ oculto ” Bm05 en garrapatas del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* , producción de la proteína recombinante y evaluación de su uso en vacunas .

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), pp.350–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02871>.

Andreotti, R. et al., 2002. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, 2(4), pp.557–563.

Angus, B.M., 1996. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal for Parasitology*, 26(12), pp.1341–1355.

Baldrige, G.D. et al., 2007. Infection of *Ixodes scapularis* ticks with *Rickettsia monacensis* expressing green fluorescent protein: A model system. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), pp.163–174.

Barber, G.N., 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(2), pp.113–126.

Benavides, E., Rodrigues, J.L. & Romero, A., 2000. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistent to different acaricides. *Ann N.Y. Acad. Sci*, (916), pp.668–671.

Benavides, E. & Walker, A.R., 1992. Secrecion natural de saliva en la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann), alimentada artificialmente en tubo capilares. *Revista Colombiana de Entomologia*, 1(1), pp.1–7.

Bennett, G.F., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia*, 16, pp.250–257.

Bishop, R. et al., 2002. A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*, located in the secretory e cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. *International Journal for Parasitology*, 32(7), pp.833–842.

- Bonnet, S. et al., 2007. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*, 134, pp.197–207. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006001545><http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=616648&fulltextType=RA&fileId=S0031182006001545>.
- Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D. De & Barbosa, C.D.S., 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 20(2), pp.89–96. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722481>.
- Bouwknegt, C. et al., 2010. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology*, 52(2), pp.183–192.
- Broadwater, A.H. et al., 2002. Glass Capillary Tube Feeding: A Method for Infecting Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with The Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Medical Entomology*, 39(2), pp.285–292. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-39.2.285>.
- Brum, J.G.W., 1988. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecia lapagei* Grimont et al., 1981: etiopatogenia e sazonalidade. *Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*.
- Burgdorfer, W., 1957. Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *Journal of Infectious Diseases*, 100(3), pp.212–214.
- Burkot, T.R. et al., 2001. Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. *Journal of medical entomology*, 38, pp.167–171.
- Bustin, S.A. et al., 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC molecular biology*, 11(74).

- Campos, R.A. et al., 2010. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Genetics and molecular research : GMR*, 9(3), pp.1421–1430.
- Canales, M. et al., 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick. *Vaccine*, 15(4), pp.414–422. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X96001922>.
- Canales, M. et al., 2009. Protective efficacy of bacterial membranes containing surface-exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. *Vaccine*, 27(52), pp.7244–7248.
- Carrington, J.C. & Ambros, V., 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* (New York, N.Y.), 301(5631), pp.336–338.
- Castro-Janer, E. et al., 2011. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), pp.148–155.
- Castro-Janer, E. et al., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) using in vitro larval bioassays. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), pp.300–306.
- Castro Janer, E. et al., 2010. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), pp.172–177.
- Chabaud, A.G., 1950. Sur la nutrition artificielle des tiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 25(1–2), pp.42–47.
- Chendrimada, T.P. et al., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), pp.740–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature03868>.
- Chmelař, J. et al., 2016. All For One and One For All on the Tick-Host Battlefield. *Trends in*

- Parasitology*, 32(5), pp.368–377.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H. & Yang, C.-H., 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), pp.1541–1549. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.
- Ciprandi, A. et al., 2006. Boophilus microplus: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, 114(1), pp.40–46.
- Csordas, B.G. et al., 2016. New insights from molecular characterization of the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus in Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria*, 25(3), pp.317–326.
- Cunha, N.C. et al., 2009. First identification of natural infection of Rickettsia rickettsii in the Rhipicephalus sanguineus tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(2), pp.105–108. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- Cuore, U. et al., 2007. Primer diagnostico de resistencia al Fipronil en la garrapata comun del ganado Boophilus microplus. *Veterinaria (Uruguay)*, (42), pp.35–41.
- Decrem, Y. et al., 2008. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by Ixodes ricinus. *International Journal for Parasitology*, 38(5), pp.549–560.
- Dougherty, W. et al., 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact*, 7(5), pp.544–552.
- Estrada-Peña, A., Venzal, J.M. & Sánchez Acedo, C., 2006. The tick Ixodes ricinus: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. *Medical and veterinary entomology*, 20(2), pp.189–197.
- Fabres, A. et al., 2010. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi

- on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology*, 137(10), pp.1537–1546. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500916> [Accessed September 23, 2013].
- FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants-guidelines, Executive Summary, Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome. , p.11.
- Fernandez-Ruvalcaba, M. et al., 2004. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Experimental and Applied Acarology*, 32(4), pp.293–299.
- Ferreira, C. a S. et al., 2002. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125(Pt 3), pp.265–274.
- Filipowicz, W. et al., 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3 SPEC. ISS.), pp.331–341.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–811. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653> <http://www.nature.com/nature/journal/v391/n6669/pdf/391806a0.pdf>.
- Fonseca, A.H., Dutra, A.E.A. & Pina, I.G., 1999. uso de sangue de frangos e de bovinos na alimentacao de argas *miniatus* atraves de membrana de silicone. *Revista Brasileira de Ciência Veterinaria*, 6(3), pp.167–170.
- Francischetti, I.M.B. et al., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, pp.2051–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785505&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Frisch, J.E., 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International Journal for Parasitology*, 29(1), pp.57–71.
- Gao, J. et al., 2009. Characterization of a concealed antigen Hq05 from the hard tick *Haemaphysalis*

- qinghaiensis and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep. *Vaccine*, 27(3), pp.483–490.
- García-García, J.C.J.C. et al., 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 18(21), pp.2275–2287.
- 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, pp.S353–S366.
- Gern, L. et al., 1991. *Ixodes* (Pholeaioxodes) hexagonus, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Medical and veterinary entomology*, 5(4), pp.431–435.
- Gern, L., Lebet, N. & Moret, J., 1996. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Experimental and Applied Acarology*, 20(11), pp.649–658.
- Gern, L., Zhu, Z. & Aeschlimann, A., 1990. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65(1), pp.89–93.
- Ghosh, S. & Khan, M.H., 1999. Immunization of cattle against *Hyalomma anatolicum anatolicum* using larval antigens. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(2), pp.203–205.
- Ghosh, S., Khan, M.H. & Gupta, S.C., 1998. Immunization of rabbits against *Hyalomma anatolicum anatolicum* using homogenates from unfed immature ticks. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36(2), pp.167–170.
- Gonsioroski, A.V. et al., 2012. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* females. *Experimental Parasitology*, 130(4), pp.359–363. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.006> [Accessed September 23, 2013].
- Gonzales, J.C., 1975. O contole do carrapato bovino. *Porto Alegre, Sulina*.
- Gonzalez, S. et al., 2006. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature*, 440(7084), pp.702–706.

- Gough, J. & Kemp, D., 1993. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *Journal of Parasitology*, 79(6), pp.900–907.
- Graf, J.F. et al., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129 Suppl(2), pp.S427–S442.
- Gregory, R.I. et al., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.235–240.
- Guerrero, F.D. et al., 2005. BmiGI: A database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), pp.585–595.
- 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), pp.421–427.
- Guo, S. & Kemphues, K.J., 1995. par- 1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser / Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. *Cell*, 81, pp.611–620.
- Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S., 2002. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 7, pp.310–322.
- Habedank, B. & Hiepe, T., 1993. In-vitro fütterung von zecken, *Dermacentor nuttalli*, OLENEV 1928 (Acari: Ixodidae) über eine silikonmembran. *Dermatologische monatschrift*, 179(9), p.292/295.
- Haddon, W.J., 1956. An artificial membrane and apparatus for the feeding of the human body louse *Pediculus humanus corporis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 5(2), pp.315–325.
- Hajdusek, O. et al., 2009. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp.1033–1038.

- Hajdusek, O. et al., 2016. Tick iron and heme metabolism - New target for an anti-tick intervention. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(4), pp.565–572.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp.95–98. Available at: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>.
- Hokama, Y., Lane, R.S. & Howarth, J.A., 1987. Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. *Journal of Medical Entomology*, 24(3), pp.319–323.
- Hood, S., Edelsten, R. & Branagan, D., 1976. The maintenance of the argasid tick *ornithodoros moubata* on embryonated hen eggs. *Tropical Animal Health Production*, 8(3), pp.163–167.
- Hu, C.M., Gern, L. & Aeschlimann, A., 1992. Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. *Parasite Immunol*, 14(4), pp.415–427. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1437234>.
- Hunter, T. et al., 1975. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.*, 250(2), pp.409–417. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=803491.
- Inokuma, H., Kemp, D. & Willadsen, P., 1994. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Veterinary Parasitology*, 53(3–4), pp.293–299.
- Jamroz, R.C. et al., 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 46(5), pp.685–695.
- Johnson, D.A. et al., 1984. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Analysis Techniques*, 1(1), pp.3–8.
- Jongejan, F. & Uilenberg, G., 2005. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(7), p.S3.

Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182004005967 [Accessed September 22, 2013].

- Jonsson, N.N. et al., 2000. Evaluation of TickGARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology*, 88(3–4), pp.275–285.
- Kelly, A. & Hurlstone, A.F., 2011. The use of RNAi technologies for gene knockdown in zebrafish. *Briefings in Functional Genomics*, 10(4), pp.189–196.
- Kemp, D.H. et al., 1975. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology*, 70(2), pp.243–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1128926>.
- Kemp, D.H. et al., 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal for Parasitology*, 16(2), pp.115–120.
- Kemp, D.H. et al., 1989. Vaccination against *Boophilus microplus*: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Experimental & Applied Acarology*, 7(1), pp.43–58.
- Kirch, H.J. et al., 1991. Artificial Feeding of *Ornithodoros-Concanensis* (Acari, Argasidae) Nymphs on Bovine Blood and Morphological-Changes in Erythrocytes Undergoing Hemolysis in the Tick Midgut. *Journal of Medical Entomology*, 28(3), pp.450–455.
- Klafke, G.M. et al., 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142(3–4), pp.386–390.
- Kocan, K.M. et al., 2005. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of medical entomology*, 42(5), pp.864–874.
- Kocan, K.M. et al., 1986. Percutaneous infection of nymphal *Dermacentor andersoni* with *Anaplasma marginale*. *American journal of veterinary research*, 47(8), pp.1662–1664.

- Kocan, K.M., 1995. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), pp.121–151.
- 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(6), pp.1411–1415.
- Kröber, T. & Guerin, P.M., 2007a. An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*, 63(1), pp.17–22.
- Kröber, T. & Guerin, P.M., 2007b. In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, 23(9), pp.445–449.
- van der Krol, A.R. et al., 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant cell*, 2(4), pp.291–299.
- Kuhnert, F., Diehl, P.A. & Guerin, P.M., 1995. The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro. *International Journal for Parasitology*, 25(8), pp.887–896.
- Kunz, S.E. & Kemp, D.H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 13(4), pp.1249–86.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7711312>.
- Kurti, T.J. et al., 2008. Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10), pp.963–968.
- de la Fuente, J. et al., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 8(1), pp.23–28.
- de la Fuente, J., 2012. Vaccines for vector control: Exciting possibilities for the future. *Veterinary Journal*, 194(2), pp.139–140.
- De La Fuente, J. et al., 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology Research*, 96(3), pp.137–141.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lara, F.A. et al., 2015. ATP binding cassette transporter mediates both heme and pesticide detoxification in tick midgut cells. *PLoS ONE*, 10(8), pp.1–20.
- Leal, A.T. et al., 2006. Vaccination of bovines with recombinant Boophilus Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3–4), pp.341–345.
- Lee, Y. et al., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lee, Y. et al., 2002. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*, 21(17), pp.4663–4670.
- Lee, Y. et al., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415–419.
- Leemon, D.M. & Jonsson, N.N., 2012. Comparative studies on the invasion of cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) and sheep blowflies (*Lucilia cuprina*) by *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), pp.248–259.
- Lew-Tabor, A.E. & Rodriguez Valle, M., 2016. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(4), pp.573–585. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>.
- Logullo, C. et al., 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116 (Pt 6, pp.525–532.
- Lösel, P., Guerin, P. & Diehl, P., 1993. Contrasting effects of sera from rabbits and cattle infested with ticks on the in vitro feeding performance of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Veterinary Parasitology*, 47(3–4), pp.355–360.
- Macaluso, K.R. et al., 2001. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont*,

- N.Y.), 1(1), pp.45–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12653135>.
- Mango, C.K.A. & Galun, R., 1977. *Ornithodoros moubata*: Breeding in vitro. *Experimental Parasitology*, 42(2), pp.282–288.
- 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(3), pp.179–187. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.01.003>.
- Martinez, J. et al., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), pp.563–574.
- Martins, J.R. & Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary record*, 149(July), p.64.
- Matzke, M. a & Birchler, J. a, 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature reviews. Genetics*, 6(1), pp.24–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630419>.
- De Meillon, B. & Golberg, L., 1947. Preliminary studies on the nutritional requirements of the bedbug (*Cimex lectularius*) and the tick (*Ornithodoros moubata*). *Journal of Experimental Biology*, 24(3), pp.41–63.
- Meister, G. et al., 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15(2), pp.185–197.
- Miyoshi et al., 2004. Gene Silencing of a Cubilin-Related Serine Proteinase from the Hard Tick *Haemaphysalis longicornis* by RNA Interference. *Journal Veterinary Medicine Science*, 66(11), pp.1471–1473.
- Miyoshi, T. et al., 2004. Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8), pp.799–808.
- Monin, R., Gern, L. & Aeschlimann, A., 1989. A study of the different modes of transmission of *borrelia burgdorferi* by *ixodes ricinus*. *Zentralblatt Bakteriologie*, 18, pp.14–20.

- Moorhouse, D.E. & Tatchell, R.J., 1966. The feeding processes of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini): A study in host-parasite relations. *Parasitology*, 56, pp.623–632.
- Mourelatos, Z. et al., 2002. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes and Development*, 16(6), pp.720–728.
- Murrell, A. & Barker, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56(3), pp.169–172.
- Musyoki, J.M. et al., 2004. Comparative studies on the infectivity of *Theileria parva* in ticks fed in vitro and those fed on cattle. *Experimental and Applied Acarology*, 32(1–2), pp.51–67.
- Naito, Y. et al., 2005. dsCheck: Highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), pp.W589-591.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell*, 2(4), pp.279–289.
- Narasimhan, S. et al., 2004. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.1141–1146. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=337020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nielsen, H. et al., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10(1), pp.1–6. Available at:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030614959&partnerID=tZOtx3y1>.
- Nijhof, A.M. et al., 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *International Journal for Parasitology*, 37(6), pp.653–662.
- Nuccitelli, A. et al., 2011. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus* infections. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp.10278–10283.
- Nuñez, J.L., Muñoz Cobenas, M.E. & Moltedo, H.L., 1982. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del Ganado vacuno. *Buenos Aires: Hemisfério Sur*, p.19.
- Nuttall, P. a. et al., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 28(4), pp.155–163.
- Nyindo, M. et al., 1996. Immunity induced by vaccination with *Rhipicephalus appendiculatus* salivary gland antigens does not augment protective immunity acquired naturally by exposing rabbits to adult ticks. *J Med Entomol*, 33(4), pp.559–565. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8699449>.
- Okamura, K. et al., 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes and Development*, 18(14), pp.1655–1666.
- Opdebeeck, J.P. et al., 1988. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midgut of ticks. *Parasite Immunology*, 10(4), pp.405–410. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3174172>.
- Osborne, R. & Mellor, P., 1985. Use of a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. *Tropical Animal Health Production*, 17(1), pp.31–38.
- Parizi, L. et al., 2013. Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(6), pp.492–499.
- Parizi, L.F. et al., 2009. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), pp.282–290.
- Parizi, L.F. et al., 2011. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology*, 127(1), pp.113–118.
- Parizi, L.F. et al., 2012. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus)*

- microplus: A field evaluation. *Vaccine*, 30(48), pp.6912–6917. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.078> [Accessed September 23, 2013].
- Patarroyo, J.H. et al., 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 166(3–4), pp.333–339.
- Patarroyo, J.H. et al., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88(3–4), pp.163–172.
- Pedra, J.H.F. et al., 2006. Disruption of the salivary protein 14 in *Ixodes scapularis* nymphs and impact on pathogen acquisition. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), pp.677–682.
- Perez-Cogollo, L.C. et al., 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168(1–2), pp.165–169.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR J. D. Moore & K. Stenning, eds. *Nucleic Acids Research*, 29(9), p.e45. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), p.e36.
- Pham, J.W. et al., 2004. A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 117(1), pp.83–94.
- Piper, E.K. et al., 2010. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology*, 40(4), pp.431–441.
- Playford, M., 2005. Review of research needs for cattle tick control, Phases I and II. *Meat &*

Livestock Australia Ltd. Locked Bag 991.

- Pohl, P.C. et al., 2011. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. J. D. Moore & K. Stenning, eds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(4), pp.1323–1333. Available at: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> [Accessed September 23, 2013].
- Pruett, J.H., 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites - A review. *International Journal for Parasitology*, 29(1), pp.25–32.
- Purnell, R.E. & Joyner, L.P., 1967. artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of theileria. *Nature*, (216), pp.484–485.
- Purnell RE., 1970. Infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva* using an artificial feeding technique. *Research in Veterinary Science*, 11(4), pp.403–405.
- Rand, K.N. et al., 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus* (vaccine development/cDNA/epidermal growth factor-like repeats/membrane glycoprotein). *Biochemistry*, 86, pp.9657–9661.
- Rand, T.A. et al., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), pp.621–629.
- Rangel, C. et al., 2008. Alimentação artificial por meio do tubos capilares de fêmeas parcialmente inguritadas do carrapato *Dermacentor (Anocentor) nitens*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. , (17), pp.35–39.
- Rau, U. & Hannoun, C., 1968. The use of a capillary-tube technique for artificilly feeding *Argas reflexus reflexus* ticks. *Bulletin of the World Health Organization*, 39(2), p.332.
- Rechav, Y. et al., 1999. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*. *J Med Entomol*, 36(4), pp.414–419.
- Renard, G. et al., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. , 30, pp.1017–1026.
- Roberts, J.A., 1968. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus*

- (Canestrini). *J Parasitol*, 54, pp.657–662. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3277013>.
- Rodríguez, M. et al., 1994. High level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnology*, 31, 33(2), pp.135–146.
- Rodriguez Valle, M. et al., 2004. Integrated control of Boophilus microplus ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine GavacTM. *Experimental and Applied Acarology*, 34(3–4), pp.375–382.
- Rott, M.B. et al., 2000. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta tropica*, 75(3), pp.331–340.
- Ruiz, L.M. et al., 2006. A theoretical analysis of codon adaptation index of the Boophilus microplus bm86 gene directed to the optimization of a DNA vaccine. *Journal of Theoretical Biology*.
- Ruiz, N. et al., 2015. Non-Invasive Delivery of dsRNA into De-Waxed Tick Eggs by Electroporation. *Plos One*, 10(6), p.e0130008. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0130008>.
- Sabirzhanov, B., Sabirzhanova, I.B. & Keifer, J., 2011. Screening target specificity of siRNAs by rapid amplification of cDNA ends (RACE) for non-sequenced species. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44(1), pp.68–75.
- Saito, K.C. et al., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 129(3–4), pp.299–311.
- Samish, M. & Glazer, I., 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17(8), pp.368–371.
- Sanchez Ferreira, C.A. et al., 2002. Cloning and partial characterization of a Boophilus microplus calreticulin. *Experimental parasitology*, (101), pp.25–34.
- Schuijt, T.J. et al., 2011. Identification and characterization of Ixodes scapularis antigens that elicit

- tick immunity using yeast surface display. *PLoS ONE*, 6(1), p.e15926.
- Seifert, G.W., Springell, P.H., & Tatchell, R.J., 1968. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58, pp.415–430.
- Seixas, A., Leal, A.T., et al., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(3–4), pp.332–340.
- Seixas, A., Friesen, K.J. & Kaufman, W.R., 2008. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*, 54(7), pp.1175–1183.
- Seixas, a et al., 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126(Pt 2), pp.155–163.
- Shahein, Y.E., 2008. Molecular cloning and expression of a larval immunogenic protein from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(3–4), pp.281–289.
- Da Silva Vaz, I. et al., 2004. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Molecular Biology*, 13(3), pp.329–335.
- Da Silva Vaz, I. et al., 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(3–4), pp.331–341.
- Da Silva Vaz, I. et al., 2005. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Veterinary Parasitology*, 127(2), pp.147–155.
- Singh, B. et al., 2012. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. *Infection and Immunity*, 80(4), pp.1491–1501.
- Skwarczynski, M. et al., 2012. Peptide-Based Subunit Vaccine against Hookworm Infection. *PLoS*

ONE, 7(10).

- Soares, C.A.G. et al., 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal Ixodes scapularis ticks. *Insect Molecular Biology*, 14(4), pp.443–452.
- Soberanes, C.N. et al., 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado Boophilus microplus en Mexico. *Tec. Pec. Mex.*, (40), pp.81–92.
- Sonenshine, D.E., 1993. Biology of Ticks. In *Biology of Ticks Volume II*. pp. 3–65.
- Sontheimer, E.J. & Carthew, R.W., 2005. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 122(1), pp.9–12.
- Sorgine, M.H.F. et al., 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick Boophilus microplus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), pp.28659–28665.
- Sutherst, R.W. et al., 1983. The effect of cattle tick (Boophilus microplus) on the growth of Bos indicus x B. taurus steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, (34), pp.317–327.
- Szahó, M.P.J. et al., 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 32(1), pp.43–50.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), pp.2731–2739.
- Tatusova, T.A. & Madden, T.L., 1999. Erratum to ``BLAST 2 SEQUENCES , a new tool for comparing protein and nucleotide sequences [FEMS Microbiol . 174 (1999) 247 ^ 250] 1. *FEMS microbiology letters*, 177(1999), pp.187–188.
- Taylor, M.A., 2001. Recent developments in ectoparasitocides. *Veterinary Journal*.
- Tellam, R.L. et al., 2002. Reduced oviposition of Boophilus microplus feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, 103(1–2), pp.141–156.
- Tirloni, L. et al., 2014. Proteomic analysis of cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*, 9(4), p.e94831.

- Tomari, Y. et al., 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5700), pp.1377–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550672>.
- Toutoungi, L.N. & Gern, L., 1993. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*, 17(8), pp.581–586.
- Trimnell, A.R. et al., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, 23(34), pp.4329–4341.
- Trimnell, A.R., Hails, R.S. & Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine*, 20(29–30), pp.3560–3568.
- Uchikawa, K., 1976. A membrane feeding method for *Argas japonicus* (Ixodoidea : Argasidae) and applications of this method for culturing the tick and for oral infection of Japanese encephalitis virus. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 27(3), pp.207–216.
- Valenzuela, J.G., 2004. Exploring tick saliva: from biochemistry to “sialomes” and functional genomics. *Parasitology*, 129 Suppl(129), pp.S83–S94. Available at: <http://journals.cambridge.org>.
- Voigt, W. et al., 1993. In vitro feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology*, 107(3), pp.257–263.
- De Vos, S. et al., 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 25(3), pp.245–261.
- Waladde, S.M. et al., 1993. Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphs in vitro on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology*, 107 (Pt 3(1991), pp.249–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233588>.
- Walker, A.R. et al., 1979. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria*

- parva. *Research in veterinary science*, 26, pp.264–265.
- Wetzel, H., 1979. Artificial membrane for in vitro feeding of piercing-sucking arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 25(1), pp.117–119.
- Wikel, S.K., 1988. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: Utilization of novel antigens. *Veterinary Parasitology*, 29(2–3), pp.235–264.
- Wikel, S.K., 1996. MINIREVIEW Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, 84, pp.304–309.
- Wikel, S.K. & Allen, J.R., 1976. Acquired resistance to ticks I. PASSIVE TRANSFER OF RESISTANCE. *Immunology*, 30(30), p.311.
- Wikel, S.K. & Bergman, D., 1997. *Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities*,
- Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129 Suppl, pp.S367–S387.
- Willadsen, P., 2008. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends in Parasitology*, 24(4), pp.164–167.
- Willadsen, P. et al., 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110 Suppl(April 2009), pp.S43–S50.
- Willadsen, P., 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, 71(2–3), pp.209–222.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), pp.161–168. Available at: doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.050.
- Williams, B.R., 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, 18(45), pp.6112–6120.
- Yi, R. et al., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, 17(24), pp.3011–3016.
- Zhang, H. et al., 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO Journal*, 21(21), pp.5875–5885.