



TESIS DOCTORAL

VACUNAS MULTIANTÍGENICAS FRENTE A LA GARRAPATA *ORNITHODOROS ERRATICUS*, VECTOR DE LA PESTE PORCINA AFRICANA.

D. ANGEL CARNERO MORÁN

2025

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del Proyecto de Investigación RTI2018-098297-B-100.

**LOS DOCTORES D. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ Y DÑA. ANA OLEAGA PÉREZ,
INVESTIGADORES CIENTÍFICOS DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA (IRNASA, CSIC),**

CERTIFICAN,

Que la Tesis Doctoral titulada “**Vacunas multiantígenicas frente a la garrapata *Ornithodoros erraticus*, vector de la Peste Porcina Africana**”, presentada por D. Ángel CARNERO MORAN, ha sido desarrollada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca bajo nuestra dirección y tutela, y cumple las condiciones para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman y sellan el correspondiente certificado en Salamanca a 28 de marzo de 2025

Fdo.: Dr. Ricardo PÉREZ SÁNCHEZ

Fdo.: Dra. Ana OLEAGA PÉREZ



El Dr. RAÚL MANZANO ROMÁN, Profesor Permanente Laboral en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA,

Que D. ÁNGEL CARNERO MORÁN, ha realizado el trabajo titulado: **“Vacunas multiantigénicas frente a la garrapata *Ornithodoros erraticus*, vector de la Peste Porcina Africana”**, bajo la dirección de los Drs. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ y ANA OLEAGA PÉREZ, y estima como tutor que el mencionado trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste, a los efectos legales, firma y sella el correspondiente certificado en Salamanca a 28 de marzo de 2025.

Fdo. Raúl Manzano Román

AGRADECIMIENTOS

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

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores Ricardo Pérez Sánchez y Ana Oleaga Pérez, sin los cuales nada de esto habría sido posible. Por haberme aceptado y acogerme en su grupo de investigación. Gracias por su paciencia y su empeño al enseñarme y por haberme llevado con esmero durante esta etapa de mi vida que ha sido el doctorado.

También quiero agradecer a las técnicas de laboratorio María y Rocío por ayudarme con el trabajo de laboratorio y haber pasado tantas horas conmigo enseñándome. Tampoco habría sido posible esta tesis sin ellas.

Del mismo modo quiero agradecer a la Dra. Mar Siles, su interés y colaboración en todo lo que he podido necesitar. Y en general a todos los compañeros dentro de este centro, gracias por tan buenos momentos. Empezasteis siendo compañeros de café y os habéis convertido en amigos. Habéis hecho mi estancia aquí muy feliz durante estos casi 5 años.

Y por último a mi familia, por estar allí apoyándome siempre que lo he necesitado, por su amor, comprensión y cariño...

Gracias a todos

LISTADO DE ABREVIATURAS

α 2M: Macroglobulina alfa-2.

ABC: Bicarbonato de amonio.

ACN: Acetonitrilo.

ADAMs: Desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospodin.

Ag5: Antígeno A5.

ANOVA: Análisis de la varianza de una vía.

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BUSCO: Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs.

CAP: CRISP (cysteine-rich secretory proteins), antigen 5 (Ag5), and pathogenesis-related (PR-1).

cDNA: DNA complementario.

CP: Hemolipoglicoproteína transportadora.

CRISPs: Proteínas secretoras ricas en histidina.

DDA: modo de adquisición dependiente de datos.

DIA: modo de adquisición independiente de datos.

DO: Densidad óptica.

d.p.i: Días post-inmunización.

DTT: Ditioneitol.

EC: Códigos enzimáticos.

FA: Ácido fórmico.

FC: Fold change.

FDR: False Discovery Rate.

FXa: Factor X activado.

GO: “Gene Ontology”.

GPI: Glicosil fosfatidil inositol.

IGBP: Proteínas de unión a las globulinas.

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

KEGG: Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes.

LB: Medio Luria-Bertani.

LC: Cromatografía líquida.

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

LTB4: Leucotrieno B4.

mA: Miliamperios.

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

MeV: MultiExperiment Viewer

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad9.

mRNA poliA+: RNA mensajero poliadenilado.

mRNA-LNP: mRNA encapsulado en nanopartículas lipídicas.

miRNAs: micro RNAs.

MW: Peso molecular.

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: Nanómetros.

OPD: Orto-fenilendiamina.

ORF: secuencias con marcos con lectura abierta.

PAPS: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pfam: "Protein families database".

PIT: Proteoma informado por el transcriptoma.

PLA2: Fosfolipasa A2.

PMF: Peptide mass fingerprint.

PPA: Peste porcina africana.

PPIs: Interacciones proteína-proteína.

PR1: Proteína 1.

RIN: RNA integrity number.

RNAi: RNA interferente.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RPKM: Read per kilobase per million reads.

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

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

SGE: Extracto proteico de glándulas salivales.

SWATH-MS: Adquisición en ventanas secuenciales de todos los espectros de masas de los fragmentos iónicos teóricos.

TBE: Tris-Borato-EDTA.

TBRF: Fiebre recurrente humana transmitida por garrapatas.

TCA: Ácido tricloroacético.

TFA: Ácido trifluoroacético.

Thyr-1: Tiroglobulina tipo 1.

TIL: Inhibidores de la tripsina.

TM: Dominio transmembrana.

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

TSA: "Transcriptome Shotgun Assembly".

TSAP: "Thermosensitive Alkaline Phosphatase".

TXA2: Tromboxano A2.

Vgs: Vitelogeninas.

WEGO: Web Gene Ontology Annotation Plot.

INTRODUCCIÓN.	1
1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS GARRAPATAS.....	3
1.1. Ciclos biológicos, alimentación y reproducción.....	3
1.2. Fijación y toma de sangre.....	4
1.3. Glándulas salivales.....	4
1.4. Saliva: funciones, composición y aplicaciones.....	6
2. IMPORTANCIA SANITARIA DE LOS ARGÁSIDOS DEL GÉNERO <i>ORNITHODOROS</i>	7
3. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA: MÉTODOS DE LOCALIZACIÓN DE POBLACIONES DEL GÉNERO <i>ORNITHODOROS</i>	10
3.1. Métodos directos.....	10
3.2. Métodos indirectos.....	10
4. MÉTODOS DE CONTROL DE <i>ORNITHODOROS</i>	14
4.1. Control biológico.....	15
4.2. Control inmunológico con vacunas anti-garrapata: estado actual.....	16
4.3. Vacunas anti-garrapata: criterios y estrategias para la identificación y verificación de nuevos antígenos protectores.....	18
4.4. Vacunas anti-garrapata: vacunómica aplicada al desarrollo de vacunas frente a argásidos.....	21
4.5. Vacunas multiantigénicas como vía para aumentar la eficacia y el rango de protección.....	23
4.6. Nuevas plataformas vacunales anti-garrapata: vacunas mRNA-LNP.....	24
5. DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A ARGÁSIDOS DEL GÉNERO <i>ORNITHODOROS</i>	25
5.1. Ensayos con antígenos ocultos del intestino y otros órganos internos.....	26
5.2. Ensayos con antígenos salivales.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. HOSPEDADORES.....	49
2. PARÁSITOS.....	49
3. MATERIAL PARASITARIO.....	49
3.1. Glándulas salivales.....	49
3.2. Saliva.....	49
3.3. Intestino medio.....	50
4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS E INMUNOENZIMÁTICAS.....	50
4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
4.2. Tinción de los geles.....	51
4.3. Western blot.....	51
OBJETIVO 1. OBTENCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE HEMBRAS DE <i>O. ERRATICUS</i> Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A LO LARGO DEL CICLO TROFOGÓNICO	52
1.1. Extracción de RNA, construcción de genotecas y secuenciación.....	52
1.2. Pre-procesamiento y ensamblaje <i>de novo</i> del transcriptoma.....	52
1.3. Anotación y caracterización del transcriptoma.....	53

1.4. Análisis de expresión diferencial a lo largo del ciclo trofogónico.....	54
1.5. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas y de términos GO.....	55
1.6. Disponibilidad de datos.....	55
OBJETIVO 2. OBTENCIÓN DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE HEMBRAS Y MACHOS DE <i>O. erraticus</i> Y ANÁLISIS DIFERENCIAL ENTRE SEXOS: CUALITATIVO, CUANTITATIVO Y FUNCIONAL.....	56
2.1. Obtención de muestras de saliva de hembras y machos de <i>O. erraticus</i>	56
2.2. Digestión proteica y preparación de las muestras.....	56
2.3. LC-MS/MS.....	57
2.4. SWATH-MS.....	58
2.5. Identificación y cuantificación de las proteínas.	58
2.6. Anotación funcional y clasificación de las proteínas identificadas.....	59
2.7. Expresión diferencial y análisis estadístico.	59
OBJETIVO 3. SELECCIÓN Y ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE ANTÍGENOS SALIVALES POTENCIALMENTE PROTECTORES Y PRODUCCIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LOS CANDIDATOS SELECCIONADOS.....	61
3.A. SELECCIÓN Y ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>.....	61
3.1. Selección de genes/proteínas sobreexpresados a los 7 días tras la alimentación.....	61
3.2. Selección de proteínas secretadas solubles.....	61
3.3. Selección de proteínas antigénicas.....	62
3.4. Inspección/selección manual.....	62
3.5. Análisis topológico y filogenético de los candidatos seleccionados.....	62
3.6. Predicción de estructura secundaria, modelado tridimensional y predicción de epítomos B y T.....	63
3.B. PRODUCCIÓN DE CANDIDATOS EN FORMA RECOMBINANTE.....	64
3.7. Verificación experimental de las secuencias obtenidas por RNA-seq	64
3.7.1. Amplificación de los cDNA completos.....	64
3.7.2. Purificación de los productos de PCR.....	65
3.7.3. Clonaje y secuenciación.....	66
3.8. Producción recombinante de los candidatos seleccionados.....	67
3.8.1. Amplificación de las formas truncadas (sin péptido señal).....	68
3.8.2. Clonaje en el vector pQE-30.....	68
3.8.3. Transformación de células competentes <i>Escherichia coli</i> M15.....	71
3.8.4. Expresión de las proteínas recombinantes truncadas.....	71
3.8.5. Purificación de las proteínas recombinantes.....	71
OBJETIVO 4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PROTECTORA INDIVIDUAL Y CONJUNTA DE LOS CANDIDATOS SALIVALES EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES. FORMULACIÓN DE VACUNAS MULTIANTIGÉNICAS CON ANTÍGENOS SALIVALES E INTESTINALES Y EVALUACIÓN DE SU EFICACIA PROTECTORA.....	73
4.1. Primer ensayo: vacunación individual con los antígenos recombinantes.....	73

4.1.1. Inmunización.....	73
4.1.2. Análisis de la respuesta humoral. ELISA y Western Blot.....	74
4.1.3. Infestaciones.....	75
4.1.4. Parámetros analizados para determinar la acción de la respuesta inmunitaria.....	75
4.1.5. Análisis estadístico.....	76
4.2. Segundo ensayo: vacunación con los 4 antígenos salivales formulados conjuntamente.....	76
4.2.1. Inmunización.....	76
4.2.2. Infestaciones, acción de la respuesta inmunitaria y análisis estadístico.....	77
4.3. Tercer ensayo: vacunaciones con una formulación multiantigénica combinando antígenos protectores salivales e intestinales de <i>O. erraticus</i>	77
4.3.1. Inmunización.....	77
4.3.2. Infestaciones, acción de la respuesta inmunitaria y análisis estadístico.....	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
OBJETIVO 1. TRANSCRIPTOMA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE HEMBRAS DE ORNITHODOROS ERRATICUS.....	83
1.1. Secuenciación y ensamblaje <i>de novo</i> del transcriptoma de las glándulas salivales de hembras de <i>O. erraticus</i>	83
1.2. Anotación y clasificación funcional según los términos GO, familias de dominios proteicos y rutas biológicas.....	84
1.3. Genes diferencialmente expresados en las glándulas salivales a lo largo de su ciclo trofogónico.....	88
1.4. Significado biológico de los genes diferencialmente expresados. Análisis de enriquecimiento.....	90
1.5. Principales grupos y familias de proteínas sobreexpresados después de la alimentación.....	93
1.6. Análisis de los grupos de proteínas más abundantemente sobreexpresadas a los 7 d.p.a.....	95
1.6.1. Lipocalinas.....	95
1.6.2. 5'-Nucleotidasas/apirinas.....	97
1.6.3. Proteasas.....	97
1.6.4. Inhibidores de proteasas.....	101
1.6.5. Fosfolipasa A2 (PLA2).....	103
1.6.6. Proteínas unidoras al grupo hemo.....	104
1.6.7. Proteínas “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless”.....	105
OBJETIVO 2. PROTEOMA DE LA SALIVA DE MACHOS Y HEMBRAS DE ORNITHODOROS ERRATICUS.....	107
2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la saliva de hembras y machos de <i>O. erraticus</i>	107

2.2. Proteínas identificadas por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en modo de adquisición dependiente de datos (DDA).....	108
2.3. Proteínas detectadas mediante SWATH-MS.....	109
2.4. Anotación funcional y clasificación de las proteínas identificadas en la saliva de <i>O. erraticus</i>	111
2.5. Cuantificación de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos por el método SWATH-MS.....	113
2.5.1. Proteínas de unión al grupo hemo.....	116
2.5.2. Inhibidores de proteasas.....	116
2.5.3. Proteasas.....	117
2.5.4. Lipocalinas.....	118
2.5.5. Proteínas relacionadas con la respuesta inmune.....	119
2.5.6. Metabolismo de carbohidratos.....	120
2.6. Proteínas diferencialmente expresadas en la saliva de machos y hembras.....	121
OBJETIVO 3. SELECCIÓN Y ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE ANTÍGENOS SALIVALES POTENCIALMENTE PROTECTORES Y PRODUCCIÓN COMO PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	129
3.1. Selección de proteínas salivales, sobreexpresadas y antigénicas.....	129
3.2. Características, filogenia, y predicción de epítomos B y T para cada proteína.....	129
3.2.1. Proteína salival “acid tail” (OeATSP).....	129
3.2.2. Proteína de deficiencia múltiple de factores de coagulación (OeMCFD).....	132
3.2.3. Cu/Zn-Superóxido dismutasa (OeSOD).....	136
3.2.4. Sulfotransfera (OeSULT-like).....	141
3.3. Producción de los candidatos como proteínas recombinantes.....	147
OBJETIVO 4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PROTECTORA INDIVIDUAL Y CONJUNTA DE LOS CANDIDATOS SALIVALES EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.....	149
4.1. Ensayo 1. Inmunización con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y rtOeSULT-like y evaluación de la respuesta protectora frente a <i>O. moubata</i> y a <i>O. erraticus</i>	149
4.1.1. Respuesta inmune humoral.....	149
4.1.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.....	155
4.2. Ensayo 2. Vacuna multiantigénica con antígenos salivales.....	158
4.2.1. Respuesta inmune humoral.....	158
4.2.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.....	159
4.3. Ensayo 3. Vacuna multiantigénica con antígenos salivales e intestinales.....	161
4.3.1. Respuesta inmune humoral.....	161
4.3.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.....	162
CONCLUSIONES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	169

Tabla 1.1. Ensayos de vacunación frente a argásidos utilizando antígenos ocultos.	32
Tabla 1.2. Ensayos de vacunación frente a argásidos utilizando antígenos salivales.	38
Tabla 2.1. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos.	65
Tabla 2.2. Oligonucleótidos y condiciones térmicas empleados en la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos.	65
Tabla 2.3. Mezcla de reacción para la digestión con EcoRI.	66
Tabla 2.4. Cebadores* y condiciones de PCR** utilizados para la amplificación de los fragmentos de cDNA que codifican las secuencias maduras de los candidatos.	68
Tabla 2.5. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para la digestión de los amplicones tOeATSP, tOeMCFD y tOeSULT-like con la enzima BamHI y para la digestión del amplicón tOeSOD con KpnI.	69
Tabla 2.6. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para la digestión y defosforilación simultáneas del vector pQE-30 con BamHI/TSAP o con KpnI/TSAP.	70
Tabla 2.7. Mezclas de reacción para las ligaciones de los insertos y el vector pQE-30.	70
Tabla 2.8. Protocolo de vacunación de conejos con cada proteína recombinante.	73
Tabla 2.9. Protocolo de vacunación de conejos con los 4 antígenos salivales formulados conjuntamente en una vacuna multiantigénica.	76
Tabla 2.10. Protocolo de vacunación de conejos con antígenos protectores salivales (azul) e intestinales (rojo) formulados conjuntamente en una vacuna multiantigénica.	78
Tabla 3.1. Datos estadísticos del ensamblaje y anotación de los transcriptomas de glándulas salivales de hembras de <i>O. erraticus</i> tomadas antes de la alimentación (día 0) y a los 7 y 14 días post-alimentación, así como del transcriptoma consenso (merged).	84
Tabla 3.2. Rutas metabólicas enriquecidas significativamente en las glándulas salivales de <i>O. erraticus</i> en cada una de las tres comparaciones.	93
Tabla 3.3. Lipocalinas y 5'-nucleotidasas/apirinasas sobreexpresadas a los 7 d.p.a. (7 vs 0).	96
Tabla 3.4. Proteasas sobreexpresadas diferencialmente a los 7 d.p.a. (7 vs 0).	98
Tabla 3.5. Inhibidores de proteasas sobreexpresados diferencialmente a los 7 d.p.a. (7 vs 0)..	102

Tabla 3.6. Fosfolipasas A2, proteínas unidoras de grupo hemo, y proteínas “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless” sobreexpresadas diferencialmente a los 7 d.p.a. (7 vs 0).	104
Tabla 3.7. Número de proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de <i>O. erraticus</i> por LC-MS/MS y SWATH-MS clasificadas en 24 grupos/familias funcionales diferentes.....	113
Tabla 3.8. Proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0,05$) en la saliva de machos y hembras.	121
Tabla 3.9. Efecto de la vacunación con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like en <i>O. erraticus</i>	156
Tabla 3.10. Efecto de la vacunación con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like en <i>O. moubata</i>	157
Tabla 3.11. Eficacia protectora del cocktail vacunal (rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like) en <i>O. erraticus</i> y <i>O. moubata</i>	160
Tabla 3.12. Eficacia protectora del cocktail vacunal (rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2) en <i>O. erraticus</i> y <i>O. moubata</i>	162

Figura 1.1. A. Garrapata fijada a la piel del hospedador alimentándose. B. Modelo de glándula salival y de los acinos de tipo I (agranulares) y de tipo II, III y IV (granulares).....	5
Figura 1.2. Test serológico para el diagnóstico de los parasitismos por <i>Ornithodoros moubata</i> utilizado en la localización de las poblaciones de esta garrapata en varios países de África.....	14
Figura 1.3. Hipótesis de la vacunación de hospedadores frente a las garrapatas.....	16
Figura 1.4. Principales procesos fisiológicos resultantes de la adaptación a la hematofagia de las garrapatas.....	19
Figura 1.5. Vacunómica aplicada al desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por garrapatas y de la transmisión de patógenos.....	21
Figura 2.1. Esquema del flujo de trabajo seguido en el estudio desarrollado en el objetivo 2...60	
Figura 2.2. Mapa del vector pSC-A, utilizado para el clonaje directo y secuenciación de los productos de PCR (Agilent Technologies).....	66
Figura 2.3. Mapa de los vectores de expresión de la serie pQE-30 (Qiagen).	67
Figura 2.4. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 1. C , grupo control. G1-G4 , grupos 1 al 4.	74
Figura 2.5. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 2. C , grupo control; V , grupo vacunado con la formulación multiantigénica salival.	77
Figura 2.6. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 3. C , grupo control; V , grupo vacunado con la formulación multiantigénica salival-intestinal.	78
Figura 3.1. Distribución de la ontología génica (GO) del transcriptoma de las glándulas salivales de <i>O. erraticus</i>	85
Figura 3.2. Dominios Pfam identificados en el transcriptoma anotado. Se representan los 30 dominios más frecuentes.	86
Figura 3.3. Rutas biológicas identificadas en el sialotranscriptoma de <i>O. erraticus</i> . Se representan las 30 rutas más abundantes.	87
Figura 3.4. Expresión diferencial del sialotranscriptoma de <i>O. erraticus</i>	89

Figura 3.5. Análisis de enriquecimiento de términos GO del sialotranscriptoma de <i>O. erraticus</i> sobreexpresado tras su alimentación.	91
Figura 3.6. Número de transcritos sobreexpresados y anotados (barras verdes) y nivel de expresión en RPKM (barras rojas) para cada familia/grupo de proteínas en las comparaciones: (a) 7 d.p.a. frente a no alimentadas (7 vs 0) y (b) 14 d.p.a. frente a no alimentadas (14 vs 0).	94
Figura 3.7. A. Gel de acrilamida en gradiente 5-20% de las muestras de saliva (4 µg/pocillo) de hembras (F1, F2, F3) y machos (M1, M2, M3) de <i>O. erraticus</i> teñido con nitrato de plata. B. Gel de acrilamida en gradiente 5-20% teñido con Coomassie Blue.	107
Figura 3.8. Diagramas de Venn que muestran el número de proteínas salivales de hembras y machos detectadas por DDA LC-MS/MS (a) y por DDA y SWATH-MS (b).	109
Figura 3.9. Distribución de ontología génica (GO) del proteoma salival de <i>O. erraticus</i>	112
Figura 3.10. Niveles de expresión de las proteínas identificadas, clasificadas por grupos y familias funcionales.	115
Figura 3.11. Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente ($P < 0,05$) en la saliva de hembras y machos.	126
Figura 3.12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la OeATSP y las de los 11 ortólogos de garrapatas.	130
Figura 3.13. Relación filogenética de OeATSP y sus ortólogos en garrapatas.	131
Figura 3.14. Predicción de epítomos B lineales en la proteína OeATSP.	131
Figura 3.15. Predicción de epítomos T en la proteína OeATSP.	132
Figura 3.16. Modelo 3D de OeATSP.	132
Figura 3.17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de OeMCFD2 y sus 10 principales ortólogos.	133

Figura 3.18. Análisis filogenético de OeMCFD2 y sus ortólogos en garrapatas.	134
Figura 3.19. Predicciones de epítomos B lineales en la secuencia de OeMCFD2.	135
Figura 3.20. Predicción de epítomos de células T en la secuencia de OeMCFD2.	135
Figura 3.21. Modelos tridimensionales de OeMCFD2.	136
Figura 3.22. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de OeSOD y sus 18 principales ortólogos.....	138
Figura 3.23. Análisis filogenético de OeSOD y sus ortólogos en garrapatas.	139
Figura 3.24. Predicciones de epítomos B lineales en la secuencia de OeSOD.	139
Figura 3.25. Predicción de epítomos de células T en la secuencia de OeSOD.	140
Figura 3.26. Modelo tridimensional dimérico conservado de OeSOD	140
Figura 3.27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de OeSULT-like y de las secuencias ortólogas de garrapatas.	143
Figura 3.28. Análisis filogenético de OeSULT-like y sus 13 ortólogos en garrapatas.....	144
Figura 3.29. Modelos 3D de OeSULT-like y de la sulfotransferasa EEC08826 de <i>I. scapularis</i>	144
Figura 3.30. Modelos 3D de la sulfotransferasa EEC08826 de <i>I. scapularis</i> y de la sulfotransferasa citosólica AGAP001425-PA de <i>Anopheles gambiae</i>	145
Figura 3.31. Predicción de epítomos B lineales en la secuencia de OeSULT-like.	145
Figura 3.32. Predicciones de epítomos de células T en la secuencia de OeSULT-like.	146
Figura 3.33. Modelo de superficie 3D de OeSULT-like.	146

Figura 3.34. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes rtOeATSP (a), rtOeMCFD2 (b), rtOeSOD (c) y rtOeSULT-like (d).....	147
Figura 3.35. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD y rtOeSULT-like.....	150
Figura 3.36. a, c Geles SDS-PAGE 12% teñidos con azul Coomassie de muestras de saliva de hembras de <i>O. erraticus</i> (a) y de <i>O. moubata</i> (c). b, d Western blots: antígenos revelados en la saliva de <i>O. erraticus</i> (b) y <i>O. moubata</i> (d) por los sueros de los conejos vacunados con los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y OeSULT-like.....	151
Figura 3.37. Niveles de anticuerpos (IgG) en los sueros de los conejos vacunados con los antígenos recombinantes OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like frente a extractos de proteínas del intestino medio de hembras de <i>O. erraticus</i> (a) y <i>O. moubata</i> (b)	152
Figura. 3.38. a, c SDS-PAGE 12% teñidos con azul Coomassie que muestran los extractos de proteína del tubo digestivo de hembras de <i>O. erraticus</i> (a) y <i>O. moubata</i> (c) antes de la alimentación (unfed) y a las 48 horas de la alimentación (fed). b, d Western blots: antígenos revelados por los sueros de los conejos vacunados con los 4 antígenos recombinantes salivales en los extractos de intestino de <i>O. erraticus</i> (b) y <i>O. moubata</i> (d).	154
Figura 3.39. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con el coctel antigénico que contiene los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD y rtOeSULT-like.....	158
Figura 3.40. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con el coctel antigénico formado por los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2.	161

El material suplementario recogido en la presente Tesis Doctoral está disponible a través del acceso online de los correspondientes artículos.

Pérez-Sánchez R, Carnero-Morán Á, Soriano B, Llorens C, Oleaga A. RNA-seq analysis and gene expression dynamics in the salivary glands of the argasid tick *Ornithodoros erraticus* along the trophogonic cycle. *Parasit Vectors*. 2021 Mar 20;14(1):170. doi: 10.1186/s13071-021-04671-z. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-04671-z>

Tabla suplementaria 3.1

Tabla suplementaria 3.2

Tabla suplementaria 3.3

Tabla suplementaria 3.4

Tabla suplementaria 3.5

Tabla suplementaria 3.6

Tabla suplementaria 3.7

Pérez-Sánchez R, Carnero-Morán A, Luz Valero M, Oleaga A. A proteomics informed by transcriptomics insight into the proteome of *Ornithodoros erraticus* adult tick saliva. *Parasit Vectors*. 2022 Jan 3;15(1):1. doi: 10.1186/s13071-021-05118-1.

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-05118-1>

Archivo de Datos suplementario 3.1

Archivo de Datos suplementario 3.2

Archivo de Datos suplementario 3.3

Figura suplementaria 3.1

Tabla suplementaria 3.8

Tabla suplementaria 3.9

Tabla suplementaria 3.10

Carnero-Morán Á, Oleaga A, Cano-Argüelles AL, Pérez-Sánchez R. Function-guided selection of salivary antigens from *Ornithodoros erraticus* argasid ticks and assessment of their protective efficacy in rabbits. *Ticks Tick Borne Dis*. 2023 Nov;14(6):102218. doi:10.1016/j.ttbdis.2023.102218.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X23000997>

Tabla suplementaria 3.11

Introducción

1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS GARRAPATAS.

Las garrapatas son artrópodos hematófagos, ectoparásitos temporales de vertebrados terrestres, incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos.

Las garrapatas son ácaros que pertenecen al Orden Parasitiformes y Suborden Ixodida. Se conocen alrededor de 907 especies que se clasifican principalmente en 2 grandes familias, Ixodidae y Argasidae. Estas familias presentan entre sí notables diferencias morfológicas y biológicas. Existe una tercera familia, Nuttalliellidae, cuya única especie, *Nuttalliella namaqua*, posee simultáneamente características de las otras dos familias, por lo que es considerada un ancestro común (Barker y Murrell, 2008; Latif et al., 2012; Mans et al., 2016, 2019).

1.1. Ciclos biológicos, alimentación y reproducción.

En su ciclo de vida, las garrapatas pasan por las etapas de huevo, larva, ninfa y adulto de uno u otro sexo. Las especies de ixódidos desarrollan un único estado ninfal, mientras que los argásidos desarrollan entre 2 y 8 estados ninfales consecutivos, dependiendo de la especie. Salvo excepciones, las larvas y las ninfas deben alimentarse de sangre para mudar a la fase evolutiva siguiente y los adultos deben alimentarse de sangre para reproducirse.

Los ixódidos, también conocidos como garrapatas duras, son generalmente exófilos, ya que pasan la mayor parte de su vida en el suelo o sobre la vegetación, viviendo de forma libre hasta encontrar un hospedador adecuado sobre el que alimentarse. Los ixódidos son garrapatas de alimentación lenta: tras acceder al hospedador, los inmaduros y las hembras se alimentan durante varios días e ingieren gran cantidad de sangre, que en las hembras alcanza hasta 100 veces su peso en ayunas. Por su parte, los machos ixódidos ingieren cantidades de sangre mucho menores, equivalentes a unas 2 veces su peso. Esta cantidad es suficiente para promover la maduración de su esperma y posibilitar el apareamiento y la fecundación de las hembras, la cual se produce sobre el hospedador y ayuda a que las hembras completen la toma de sangre. Una excepción son los machos del grupo Prostriata, que incluye exclusivamente al género *Ixodes* sp., los cuales no necesitan alimentarse para aparearse y fecundar a las hembras. Tras completar la alimentación, los ixódidos se desprenden del hospedador y vuelven al suelo, donde realizan la muda, si son inmaduros, o la oviposición en el caso de las hembras. Las hembras de los ixódidos realizan un único ciclo trofogónico, es decir, se alimentan sólo una vez y mueren tras depositar varios miles de huevos (Apanaskevich y Olivier, 2014; Randolph, 2014).

Los argásidos, o garrapatas blandas, suelen ser organismos endófilos o nidícolas. En su entorno natural, se resguardan dentro de madrigueras o nidos de sus hospedadores, mientras que en ambientes antrópicos colonizan viviendas humanas y establos de animales domésticos. Estos refugios les proporcionan protección frente a condiciones ambientales adversas y les aseguran un acceso constante a sus hospedadores. En líneas generales, los adultos de ambos sexos y los inmaduros se alimentan de forma similar. Su alimentación es rápida, tardan menos de una hora, e ingieren cantidades de sangre de unas 10 veces su peso. Una vez alimentados se desprenden del hospedador y vuelven al interior de sus refugios, donde mudan y se reproducen. Los argásidos adultos pueden repetir el ciclo trofogónico hasta 10 veces, poniendo entre 100 y 200 huevos en cada ciclo. Además, los argásidos adultos son muy resistentes al ayuno, pudiendo

sobrevivir durante años sin alimentarse (Oleaga-Pérez et al., 1990; Apanaskevich y Olivier, 2014; Gray et al., 2014).

1.2. Fijación y toma de sangre.

Para alimentarse, las garrapatas perforan la piel del hospedador utilizando el extremo distal dentado de sus quelíceros, al mismo tiempo que introducen el hipostoma, el cual les sirve como estructura de anclaje. En los argásidos e ixódidos Prostriata (*Ixodes* sp.) el hipostoma y los quelíceros quedan en contacto directo con los tejidos del hospedador, mientras que en los ixódidos Metastriata sus glándulas salivales segregan el cemento, un líquido blanquecino constituido mayoritariamente por lipoproteínas, que se endurece alrededor de las piezas bucales formando un tubo cónico que actúa como elemento adicional de anclaje y aísla las piezas bucales de los tejidos del hospedador (Figura 1.1.A).

Las garrapatas son artrópodos telmófagos. Durante la perforación de la piel, los quelíceros y el hipostoma desgarran los capilares de la dermis provocando una hemorragia y formando un pequeño absceso o cavidad de alimentación en el extremo de los apéndices bucales, la denominada lesión de alimentación, desde la cual las garrapatas succionan la sangre y los exudados tisulares que fluyen hacia dicha cavidad (Encinas-Grandes et al., 1999; Sonenshine y Anderson, 2014).

Para ingerir la cantidad de sangre que necesitan, las garrapatas deben neutralizar las respuestas defensivas del hospedador. Para ello, secretan una saliva de composición compleja, rica en moléculas farmacológicamente activas, que es inoculada durante el proceso de alimentación. Estas moléculas, junto con la propia respuesta defensiva del hospedador, participan en la formación de la lesión de alimentación. Las garrapatas inoculan la saliva y succionan la sangre a través del mismo canal, de manera que realizan ambas funciones alternativamente durante todo el tiempo que tardan en completar la toma de sangre (Francischetti et al., 2009; Sonenshine y Anderson, 2014).

1.3. Glándulas salivales.

Las glándulas salivales son órganos multifuncionales altamente especializados en las garrapatas que producen la saliva. Estas glándulas no solo se encargan de la síntesis y secreción tanto del cemento como de la saliva, sino que también desempeñan un papel fundamental en la regulación del equilibrio hídrico y salino (osmorregulación). Para ello, las glándulas salivales absorben humedad ambiental cuando la garrapata está en periodo de vida libre, sin contacto con el hospedador, y eliminan el exceso de agua e iones resultantes de la concentración de la sangre durante el proceso de alimentación, incorporándolos a la saliva y reinoculándolos al hospedador (Alarcón-Chaidez, 2014).

Las glándulas salivales se encuentran a ambos lados de la parte anterior del cuerpo y presentan una estructura de tipo acinar o racemoso. Cada una posee un conducto salival ampliamente ramificado, en torno al cual se agrupan las células secretoras que forman los acinos. Existen cuatro tipos de acinos, cada uno de los cuales está constituido por varios tipos celulares distintos, segrega componentes distintos y realiza funciones diferentes (Figura 1.1.B).

Los acinos tipo I son agranulares, ya que sus células no poseen gránulos de secreción. Su función es generar una saliva con alto contenido de sales higroscópicas, la cual se dispersa sobre las piezas bucales cuando la garrapata no está en el hospedador. Estas sales captan la humedad del ambiente y luego son ingeridas, permitiendo así a la garrapata obtener el agua que necesita.

Los acinos tipo II, III y IV son granulares, ya que contienen células secretoras con numerosos gránulos que liberan su contenido en la saliva durante la alimentación. En los ixódidos, algunos componentes salivales ya están sintetizados y almacenados en estos gránulos, mientras que otros se producen de novo durante la ingesta. En los argásidos, debido a su alimentación hematófaga rápida, los compuestos salivales deben estar previamente sintetizados, almacenados y listos para su secreción antes del contacto con el hospedador. En cuanto a sus funciones, los acinos tipo II producen moléculas salivales con actividad farmacológica, por lo que se encuentran tanto en ixódidos como en argásidos. Los acinos de tipo III son los encargados de segregar el cemento y, por tanto, sólo los poseen los ixódidos. Los de tipo IV sólo están presentes en los machos de los ixódidos y su función es segregar una saliva lubricante, rica en glicoproteínas, que no participa en la alimentación, sino que sirve para facilitar la transferencia del espermátforo a la hembra durante la cópula (Alarcón-Chaidez, 2014).

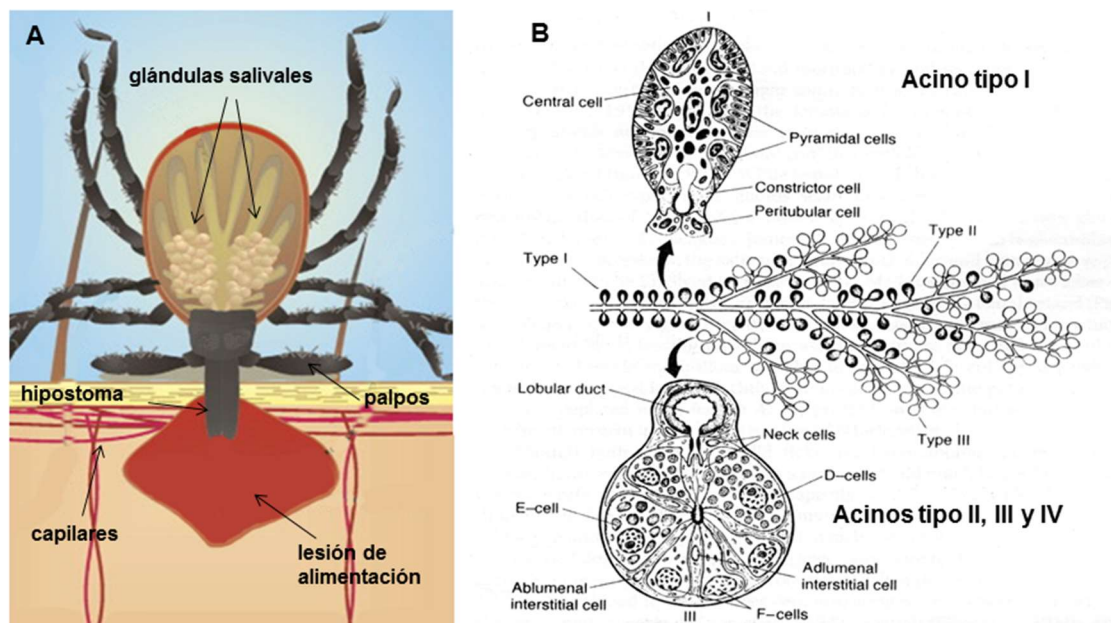


Figura 1.1. A. Garrapata fijada a la piel del hospedador alimentándose. B. Modelo de glándula salival y de los acinos de tipo I (agranulares) y de tipo II, III y IV (granulares) (Bowman et al., 2008).

1.4. Saliva: funciones, composición y aplicaciones.

La fijación de las garrapatas a la piel del hospedador provoca una lesión vascular que activa las respuestas defensivas del organismo. Estas incluyen la respuesta hemostática, la inflamatoria, así como la inmunidad innata y adaptativa.

La respuesta hemostática tiene como función principal detener la hemorragia y abarca procesos interrelacionados como la vasoconstricción, la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis. Por su parte, la respuesta inflamatoria busca reparar el tejido dañado y actúa como primera barrera frente a microorganismos que puedan penetrar a través de la lesión. En esta respuesta participan diversos mecanismos celulares y moleculares del sistema inmune innato, como la producción de bradicinina, las anafilotoxinas generadas por la activación de la vía alternativa del complemento, la liberación de histamina por los mastocitos y el reclutamiento de fagocitos polimorfonucleares (neutrófilos). Por su parte, la respuesta inmunitaria adaptativa requiere la activación de los linfocitos T y B y la producción de anticuerpos específicos frente a los inmunógenos salivales, por lo que es el mecanismo defensivo que tarda más tiempo en activarse, de modo que en un primer contacto no afectaría a la garrapata que la dispara, pero puede afectar a otros ejemplares de garrapata en contactos posteriores (Wikel, 2014; Kitsou et al., 2021; Narasimhan et al., 2021; van Osterwijk and Wikel, 2021).

Para poder completar la toma de sangre, las garrapatas deben neutralizar necesariamente las respuestas defensivas anteriores y para ello, a lo largo de la coevolución con sus hospedadores, han desarrollado una saliva de composición compleja, multifuncional, redundante y altamente adaptable, que refleja la complejidad y redundancia de las defensas del hospedador y la diversidad de hospedadores sobre los que pueden alimentarse (Nuttall, 2019, 2023).

Dicha saliva contiene proteínas y componentes no proteicos, como derivados lipídicos y RNAs no codificantes (miRNAs), que ejercen (i) funciones anti-hemostáticas, que permiten a la garrapata mantener la hemorragia, (ii) funciones anti-inflamatorias, que, entre otras acciones, evitan el prurito y el dolor de la picadura permitiendo al parásito pasar desapercibido, y (iii) funciones inmunomoduladoras, que evitan la neutralización de las moléculas bioactivas de la saliva y permiten a las garrapatas alimentarse sobre hospedadores sensibilizados en contactos previos. (Kazimirová y Stibrániová, 2013; Francischetti et al., 2009; Simo et al., 2017; Nuttall, 2019; Bensaoud et al., 2021; Kitsou et al., 2021).

Además, en los ixódidos, cuya alimentación se prolonga varios días y sintetizan parte de los componentes de la saliva durante el proceso de alimentación, la expresión de los genes salivales va cambiando a lo largo de dicho proceso, lo que genera cambios consecutivos en la composición de su transcriptoma salival y del proteoma de su saliva. Este proceso se conoce como “sialome and saliva switching” y se considera un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador y de adaptación a diferentes especies de hospedadores, lo que añade un nivel adicional de complejidad a la inmunobiología de la interacción garrapata-hospedador (de Castro et al., 2017; Kim et al., 2020; Ribeiro y Mans, 2020). En argásidos no se ha observado

un fenómeno similar. Esto es lógico considerando que la rapidez de su alimentación hace innecesario el cambio en la composición de la saliva como mecanismo de evasión durante el proceso de alimentación.

Todas estas moléculas presentes en la saliva alteran de forma significativa la fisiología del hospedador en el sitio de alimentación, favoreciendo tanto la ingesta de sangre por parte de las garrapatas como la transmisión de los agentes patógenos. Este fenómeno, observado en garrapatas y otros vectores hematófagos, se conoce como “Transmisión asistida por la saliva” (Nuttall, 2019, 2023).

Por sus múltiples funciones biológicas, las moléculas salivales de las garrapatas han generado gran interés debido a su posible aplicación práctica en diversos ámbitos vinculados a la salud humana y veterinaria.

Primero, por su posible utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de trastornos vasculares, inflamatorios o autoinmunes (Chmelař et al., 2019; Aounallah et al., 2020). Segundo, como dianas antigénicas para el desarrollo de vacunas anti-garrapata y vacunas bloqueantes de la transmisión de patógenos (Costa et al., 2021; Olajiga et al., 2021; van Osterwijk and Wikel, 2021; Abbas et al., 2023). Y tercero, como marcadores biológicos del riesgo de exposición a vectores, es decir, como antígenos para el serodiagnóstico de los parasitismos por garrapatas, de aplicación en estudios epidemiológicos para localizar poblaciones de estos parásitos o para medir el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por garrapatas al que están expuestas las poblaciones de hospedadores (Nebreda Mayoral et al., 2004; Alarcón-Chaidez et al., 2006; Vu Hai et al., 2013a, 2013b, 2014; Mihaljica et al., 2021).

2. IMPORTANCIA SANITARIA DE LOS ARGÁSIDOS DEL GÉNERO *ORNITHODOROS*.

Las garrapatas son vectores hematófagos de enorme importancia médica y veterinaria por los daños directos que producen sus parasitismos, incluyendo anemia, parálisis, toxicosis, irritación, alergias y destrucción tisular. Pero, sobre todo, son importantes porque transmiten numerosos y variados patógenos, incluyendo virus, bacterias, protozoos y helmintos, que causan enfermedades severas al ganado, a los animales de compañía y a las personas (Estrada-Peña y Mans, 2014; Schorderet-Weber et al., 2017; Rashid et al., 2019).

Entre los argásidos, varias especies del género *Ornithodoros* destacan por ser reservorios y vectores de los patógenos causantes de la Fiebre recurrente humana y la Peste porcina africana.

La fiebre recurrente humana transmitida por garrapatas, conocida como Tick-Borne Relapsing Fever (TBRF), se manifiesta con episodios febriles recurrentes y síntomas inespecíficos como cefalea, mialgia, artralgia, escalofríos y dolor abdominal. Dependiendo de la región geográfica, la TBRF es causada por distintas especies de espiroquetas del género *Borrelia*, transmitidas por diversas especies del género *Ornithodoros*. En el este y sur de África, la enfermedad es provocada por *Borrelia duttoni*, cuyo vector es *Ornithodoros moubata*. En

algunos países de esta área, como Tanzania o Ruanda, la TBRF es hiperendémica, alcanzando incidencias anuales de hasta 384/1.000 en niños menores de 1 año, con tasas de mortalidad perinatal de hasta un 43,6% y de hasta un 16% en mujeres embarazadas (Cutler et al., 2009; Cutler, 2010; Trape et al., 2013). En Eurasia y América esta enfermedad es más esporádica y afecta a las personas que penetran en hábitats infestados por los ornithodoros como cuevas, edificios en ruinas o refugios de animales. En la cuenca Mediterránea y Oriente Medio, la TBRF es producida esencialmente por las especies *Borrelia hispanica* y *Borrelia crocidurae*, las cuales son transmitidas por garrapatas del complejo *Ornithodoros erraticus* (Rebaudet and Parola, 2006; Cutler et al. 2009; Cutler, 2010; Diatta et al., 2012; Trape et al., 2013; Talagrand-Reboul et al., 2018).

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad viral aguda, hemorrágica y febril, con una mortalidad que puede alcanzar el 100%, lo que afecta gravemente la producción porcina y causa importantes pérdidas económicas en los países afectados. Su origen se encuentra en África, desde donde se propagó a Europa a mediados del siglo XX y posteriormente a Sudamérica y el Caribe. En Europa (excepto en Cerdeña) y en América, la enfermedad fue erradicada hacia finales del siglo pasado. En 2007, la enfermedad saltó de África al Cáucaso desde donde rápida e incontroladamente se extendió a la Federación Rusa, la Unión Europea (2014), China (2018), el Sudeste asiático, Oceanía (2020), la República Dominicana y Haití (2021) (Baños et al., 2022; Li et al., 2022). Hoy en día, la PPA se considera una pandemia presente en 4 continentes y más de 50 países, donde representa una gran amenaza tanto para la industria porcina mundial como para la vida silvestre (Sánchez-Vizcaíno et al., 2021). De hecho, la PPA es actualmente la amenaza más importante para la industria porcina en la Unión Europea (Jurado et al., 2018; Baños et al., 2022). Aun no existe tratamiento ni vacuna frente a la PPA, lo cual limita las posibilidades de control de la enfermedad y hace más necesario, si cabe, el control de sus vectores, que en África y Eurasia son, principalmente, *O. moubata* y *O. erraticus* (Jori et al., 2013, 2023; Lv et al., 2022).

Ornithodoros moubata está ampliamente distribuido en los países del este, centro y sur de África (Jori et al., 2013, 2023; Quembo et al., 2016). En estas regiones, habita tanto en entornos naturales, asociado a facóqueros y otros animales que viven en madrigueras, como en entornos humanos, donde coloniza viviendas y establos, teniendo como principales hospedadores a las personas y a los cerdos domésticos. En ciertos distritos de Tanzania, entre el 60% y el 80% de los hogares están colonizados por *O. moubata* (Cutler, 2010).

Ornithodoros erraticus se distribuye por la Cuenca Mediterránea. En el norte de África vive asociado a micromamíferos habitantes de madrigueras, mientras que en los países del sur de Europa vive asociado a los cerdos domésticos en explotaciones porcinas en extensivo, en las cuales se refugia en agujeros del interior y de las inmediaciones de las zahúrdas (Oleaga-Pérez et al., 1990; Manzano-Román et al., 2007; Trape et al., 2013; Boinas et al., 2014). A lo largo de su ciclo biológico, *O. erraticus* pasa por las fases de huevo, larva, varias fases ninfales y adulto. Dependiendo de las condiciones ambientales, esta especie desarrolla hasta 5 fases ninfales consecutivas (N1-N5) y todas ellas necesitan alimentarse para mudar a la fase siguiente. Los machos pueden emerger a partir de las N3, N4 y N5, mientras que las hembras emergen a partir de las N4 y N5. Salvo el huevo, todas las fases evolutivas de *O. erraticus* son organismos hematófagos de alimentación rápida. El tiempo que tardan en alimentarse aumenta en función

de su tamaño, desde apenas 10 minutos en el caso de las larvas y las N1 hasta los 20-30 minutos en el caso de las N5 y los adultos, los cuales ingieren unas 5 a 10 veces su peso en sangre. Los adultos de ambos sexos se alimentan de forma similar pero independiente, es decir, no hay evidencias de coalimentación ni de que los machos ayuden a las hembras a completar la toma de sangre, como sí ocurre en ixódidos. El apareamiento y la fecundación se producen después de la alimentación, fuera del hospedador, y las hembras fecundadas depositan unos 100-120 huevos, pudiendo repetir el ciclo trofogónico hasta 10 veces. Este ciclo biológico puede completarse en tan solo 5-6 meses en condiciones óptimas, pero tarda entre 2 y 5 años en condiciones naturales en el campo. Los adultos de *O. erraticus* muestran gran resistencia al ayuno, pudiendo sobrevivir al menos 5 años sin alimentarse, lo cual aumenta la capacidad de esta especie como reservorio de patógenos (Oleaga-Pérez et al., 1990; Boinas et al., 2014).

Además, *O. erraticus* es la especie tipo del “complejo *O. erraticus*” que incluye, entre otras especies, a *O. alactagalis*, *O. asperus*, *O. pavlovskyi*, *O. tartakovskyi*, *O. tholozani* y *O. lahorensis* (Estrada-Peña et al., 2017). Estas especies se distribuyen por Oriente Medio, el Cáucaso, la Federación Rusa y el Lejano Oriente, donde transmiten especies locales de *Borrelia* sp. causantes de TBRF (Masoumi et al., 2009; Chen et al., 2010). Esta distribución coincide en buena medida con las zonas donde la PPA se ha extendido incontroladamente en los últimos años, por lo que se teme que dichas especies puedan ser vectores competentes para la PPA, aunque esto aún no se ha demostrado experimentalmente. De ser así, podrían desempeñar un papel importante en la transmisión y persistencia a largo plazo de la PPA, dificultando su control en esa amplia región (EFSA panel, 2015; Jurado et al., 2018; Li et al., 2022).

En resumen, la presencia de *O. moubata* y *O. erraticus* en el entorno humano favorece la persistencia de la TBRF y la PPA en las áreas endémicas (principalmente en África), lo que complica considerablemente la erradicación de estas enfermedades. También puede contribuir a la propagación y persistencia de la PPA en territorios recientemente infectados, y empeora la constante amenaza de reintroducción de la PPA en países de los que ya ha sido erradicada, como España y Portugal (Boinas et al., 2014; Arias et al., 2018; Jurado et al., 2018). No en vano, la “Agenda Estratégica de Investigación en Sanidad Animal” presentada por la Plataforma Tecnológica Española “Vet+i” (www.vetmasi.es) en 2018, señalaba que “la vigilancia de las poblaciones de *O. erraticus* es una necesidad prioritaria para dar respuesta al riesgo de PPA”.

Por tanto, la vigilancia epidemiológica de las poblaciones de *Ornithodoros* seguida por su eliminación, al menos del medio antrópico, contribuirá decisivamente a la prevención y control de la PPA y la TBRF.

Este objetivo, la eliminación de los ornithodoros del medio antrópico, es teóricamente factible, pero para alcanzarlo es necesario disponer de métodos eficaces para: (i) localizar con precisión las poblaciones de *Ornithodoros* y (ii) eliminar las garrapatas de dichos lugares.

3. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA: MÉTODOS DE LOCALIZACIÓN DE POBLACIONES DEL GÉNERO *ORNITHODOROS*.

Los métodos de localización y vigilancia de poblaciones de garrapatas pueden clasificarse en directos e indirectos.

3.1. Métodos directos.

Los métodos directos se basan en la captura e identificación de las garrapatas en su hábitat natural (suelo, vegetación) o sobre sus hospedadores. Estos métodos son efectivos para localizar poblaciones de ixódidos, pero no resultan adecuados para encontrar *Ornithodoros*. Debido a la naturaleza endófila/nidícola de estos argásidos y a la brevedad de sus contactos con el hospedador, que generalmente ocurren de noche, es poco probable encontrar ejemplares de *Ornithodoros* en el entorno exterior o en los hospedadores.

En consecuencia, la búsqueda directa de los ornithodoros pasa por el examen minucioso de todos sus posibles refugios en el área estudiada, como grietas, agujeros y madrigueras de micromamíferos del interior y alrededores de las zahurdas y las viviendas humanas. Este examen consiste en la obtención de muestras de tierra del interior de dichos refugios y su escrutinio bajo un foco de luz potente para detectar los parásitos, lo que convierte a la búsqueda directa en una tarea larga y laboriosa, viable sólo en estudios a pequeña escala en áreas reducidas y focos muy concretos (Oleaga-Pérez et al., 1990; Jori et al., 2013; Gray et al., 2014; Boinas et al., 2014).

En estudios a gran escala, este tipo de examen directo resulta inviable, ya que implicaría una exploración exhaustiva de los innumerables lugares donde estos argásidos pueden estar refugiados, antes de poder considerar que un área está libre del parásito. Estas limitaciones de los métodos directos hacen más conveniente la utilización de métodos alternativos de tipo indirecto.

3.2. Métodos indirectos.

Los métodos indirectos se basan en la detección de pruebas de la presencia actual o previa del parásito.

Un ejemplo de métodos indirectos son **los métodos serológicos**, que se basan en la detección de anticuerpos anti-garrapata en los hospedadores que viven en el área estudiada. Estos métodos ofrecen una alternativa rápida y eficaz a la búsqueda directa (Pérez-Sánchez et al., 2010).

Es un hecho probado que las proteínas de la saliva de las garrapatas inducen en sus hospedadores respuestas humorales detectables, por lo que la presencia en el suero de anticuerpos frente a antígenos salivales de garrapata representa un marcador biológico de exposición a estos vectores (Francischetti et al., 2009). Estos anticuerpos pueden ser útiles para: (i) diagnosticar y confirmar reacciones alérgicas causadas por garrapatas; (ii) evaluar el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por garrapatas; y (iii) como herramienta para la localización y el monitoreo epidemiológico de las poblaciones de vectores.

Pese al interés de estos posibles usos, los métodos de diagnóstico serológico del parasitismo por garrapatas, tanto ixódidos como argásidos, aún están poco desarrollados y se resumen en unos pocos artículos que comentamos a continuación.

Diagnóstico serológico del parasitismo por ixódidos.

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

Más adelante, se intentó vincular la presencia y los niveles de IgGs anti-garrapata con las tasas de infección por patógenos transmitidos por garrapatas, específicamente *Borrelia burgdorferi*, agente causante de la enfermedad de Lyme. Schwartz et al. (1991, 1993, 1996) y Lane et al. (1999) buscaron anticuerpos IgG contra *I. scapularis* o *Ixodes pacificus* en el suero de personas picadas por estas especies, utilizando ELISA como método y extractos de glándulas salivales (SGE) de las garrapatas como antígenos. Estos estudios demostraron que este método era útil para diagnosticar infestaciones por garrapatas y que existía una clara correlación entre la seropositividad frente a ambas especies y la infección por *B. burgdorferi*. Los autores concluyeron que el nivel de anticuerpos séricos contra los antígenos salivales de garrapatas es un buen indicador de la densidad de los vectores, lo que permite estimar indirectamente el riesgo de que las personas contraigan enfermedades transmitidas por estos hematófagos. No obstante, estos autores comprobaron que la serología con SGE no era completamente específica, ya que se observaba reactividad cruzada entre distintas especies, en concreto entre *I. scapularis* y *Dermacentor variabilis* (Schwartz et al., 1993) y entre *I. pacificus* y *Dermacentor occidentalis* (Lane et al., 1999).

En España, Fernández-Soto (2003) y Nebreda Mayoral et al. (2004) también observaron reactividad cruzada entre las especies de ixódidos tras analizar varios cientos de sueros de personas picadas por garrapatas en la comunidad autónoma de Castilla y León utilizando el SGE de cinco especies de ixódidos frecuentes en dicha comunidad. Estos autores concluyeron que la serología es una herramienta útil para determinar si una persona ha sido picada por una garrapata, aunque la intensa reactividad cruzada entre especies impide identificar la especie implicada en cada caso.

Todos los autores citados están de acuerdo en que, para mejorar la especificidad y sensibilidad de la serología, se debería utilizar, en lugar del SGE, una o varias de sus proteínas inmunodominantes obtenidas de forma recombinante.

Con este objetivo, Sanders et al. (1998, 1999) y Alarcon-Chaidez et al. (2006) desarrollaron formas recombinantes de calreticulina de *Amblyomma americanum* e *I. scapularis* respectivamente, que permiten detectar específicamente anticuerpos anti-calreticulina en personas picadas por estas garrapatas, por lo que propusieron a esta proteína como biomarcador para medir la exposición a garrapatas.

Posteriormente, Vu Hai et al. (2013a, 2013b, 2014) analizaron el valor de varias proteínas salivales de *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* como biomarcadores de exposición a garrapatas, confirmando además la utilidad de la calreticulina de *I. ricinus*. Más recientemente, Mihaljica et al. (2021) han demostrado la utilidad diagnóstica de la proteína salival AV422 y la han añadido a esta lista de candidatos a biomarcadores.

En definitiva, los estudios anteriores indican: (i) que estas proteínas salivales son muy prometedoras como biomarcadores para el desarrollo de herramientas serológicas, las cuales pueden permitir una evaluación estandarizada y cuantificable del historial de picaduras de garrapata, y (ii) que la confirmación de las picaduras de garrapata puede utilizarse en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos de las enfermedades transmitidas por garrapatas.

Diagnóstico serológico del parasitismo por argásidos.

Los estudios publicados sobre el diagnóstico serológico de los parasitismos por argásidos fueron llevados a cabo principalmente por nuestro grupo de investigación. El objetivo de estos trabajos fue desarrollar herramientas fiables para poder localizar a las poblaciones de *Ornithodoros*, específicamente *O. erraticus* en Europa y *O. moubata* en África, como veremos a continuación.

Los primeros estudios para desarrollar herramientas para el serodiagnóstico de *O. erraticus* comenzaron en los años 90 del siglo pasado, en el marco de la campaña para la erradicación de la PPA de la Península Ibérica.

Nuestro equipo desarrolló un primer test de ELISA para el diagnóstico serológico de *O. erraticus* utilizando como antígeno un extracto soluble de las glándulas salivales (SGE) del parásito. El test permitía detectar anticuerpos anti-garrapata desde las 2 semanas tras un contacto primario hasta al menos 3 meses después de contactos secundarios en cerdos picados por tan sólo 10 ejemplares (Canals et al., 1990; Pérez-Sánchez et al., 1992). En las pruebas de campo este test mostró cierto grado de inespecificidad por epítomos glicosilados, la cual pudo eliminarse mediante la desglicosilación del SGE con metaperiodato sódico (Oleaga-Pérez et al., 1994). El nuevo test mejorado se utilizó entonces para el análisis de 19.000 sueros porcinos procedentes de 3.478 granjas localizadas en 234 municipios de la provincia de Salamanca. Este análisis permitió la identificación de las granjas infestadas por el parásito en esa provincia y el establecimiento de una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *O. erraticus* y la persistencia de la PPA en dichas granjas (Pérez-Sánchez et al., 1994). Este conocimiento facilitó la adopción de medidas específicas de control para evitar el contacto entre los cerdos y las garrapatas en las granjas infestadas, contribuyendo a la erradicación de la PPA de España, que se consiguió en el año 1996.

Tras la reintroducción de la PPA en la Unión Europea en 2014, este test se volvió a utilizar en campañas de serovigilancia en Europa, en concreto en varios estados federales de Alemania (Renania-Palatinado, Renania-Westfalia, Mecklenburgo-Pomerania y Brandenburgo) y en la isla de Cerdeña (Italia) para evaluar si *O. erraticus* estaba implicado en la transmisión de PPA a cerdos domésticos y a jabalíes. El análisis de cientos de sueros tomados a estos animales en zonas representativas de las áreas afectadas no detectó anticuerpos anti-*O. erraticus* en cerdos

ni jabalíes, lo que indica que esta garrapata no está presente y no participa en el ciclo epizootológico de la PPA en las regiones analizadas, a diferencia de lo que se observó en España y Portugal el siglo pasado (Mur et al., 2017; Pietschmann et al., 2016).

Partiendo de la experiencia adquirida con *O. erraticus*, nuestro equipo desarrolló un test similar basado en el SGE de *O. moubata* para la detección de poblaciones de esta garrapata en África (Baranda et al., 1997, 2000). El test se aplicó por primera vez en estudios de campo en Madagascar en una zona endémica de PPA, durante el periodo 2006-2007, mostrando una buena sensibilidad, pero también cierto grado de inespecificidad ya que en algunas granjas donde se detectaron cerdos seropositivos no se encontraron ejemplares de *O. moubata* (Ravaomanana et al., 2011).

Estos estudios demostraron que el SGE era un antígeno válido y sensible para detectar por serología a los cerdos picados por *O. erraticus* y *O. moubata*. Sin embargo, presentaba ciertos inconvenientes, como su obtención laboriosa y difícil de estandarizar, además de su composición compleja y poco conocida, lo que podría generar dudas sobre su especificidad. Dichos inconvenientes estimularon la sustitución del SGE por antígenos salivales individuales, de sensibilidad y especificidad probadas, producidos en forma recombinante.

Con ese objetivo, en trabajos posteriores se purificaron los 4 antígenos más inmunodominantes del SGE de ambos argásidos y se evaluó individualmente su eficacia diagnóstica, identificando al más sensible y específico de cada especie, concretamente el antígeno Oe260 de *O. erraticus* (Baranda et al., 2000) y la lipocalina TSGP1 de *O. moubata* (Oleaga et al., 2007).

Los estudios con la proteína Oe260 de *O. erraticus* no han continuado, de modo que aún se desconoce su identidad y secuencia. Por este motivo las últimas encuestas serológicas con esta especie se han llevado a cabo con el SGE (Mur et al., 2017; Pietschmann et al., 2016).

Por el contrario, el clonaje y la caracterización antigénica y molecular de la lipocalina TSGP1 de *O. moubata* si se han completado, permitiendo el desarrollo de un nuevo test de diagnóstico serológico para *O. moubata* basado en una forma recombinante de TSGP1 que, en condiciones de laboratorio, detecta los animales parasitados por *O. moubata* con un 100% de sensibilidad y 99% de especificidad (Díaz-Martín et al., 2011).

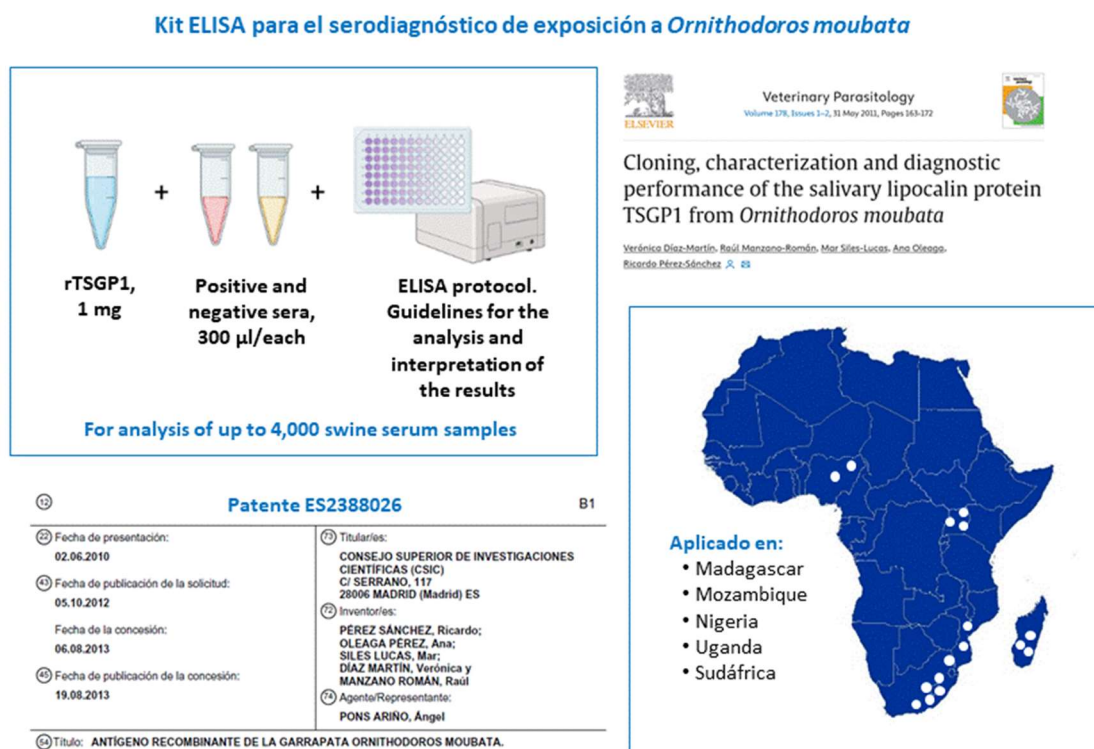


Figura 1.2. Test serológico para el diagnóstico de los parasitismos por *Ornithodoros moubata* utilizado en la localización de las poblaciones de esta garrapata en varios países de África.

Esta recombinante ha sido patentada y desde entonces se ha empleado en estudios de campo en varios países africanos (Madagascar, Mozambique, Nigeria, Uganda y Sudáfrica) demostrando su utilidad en la delimitación de focos infestados por *O. moubata* (poblados, granjas, corrales o cercados), en los cuales puede practicarse una búsqueda directa del parásito para confirmar los resultados de la serología si fuese necesario (Figura 1.2.) (Jori et al., 2013; Quembo et al., 2016; Luka et al., 2017; Jori et al., 2023).

4. MÉTODOS DE CONTROL DE ORNITHODOROS.

El control de los parasitismos por garrapatas es un problema complejo que aún no se ha resuelto debido a que ninguno de los métodos de control anti-garrapata utilizados hasta ahora son completamente eficaces (Manzano-Román et al., 2012a; de la Fuente y Contreras, 2015).

El control de las poblaciones de garrapatas se basa esencialmente en el empleo de acaricidas químicos. Pero el sobreuso de estos productos ha generado problemas que incluyen la contaminación ambiental y de los productos de origen animal, así como el rápido desarrollo de resistencias frente a ellos, lo cual limita su utilidad y vida media en el mercado (Guerrero et al., 2012; de la Fuente y Contreras, 2015; Obaid et al., 2022). Además, en relación con los ornithodoros, a estos inconvenientes hay que añadir el qué la aplicación de acaricidas en las viviendas humanas y las dependencias de los animales resulta ineficaz por el simple hecho de

que los acaricidas no alcanzan a los parásitos en el interior de sus refugios (Díaz-Martín et al., 2015a).

Dichos inconvenientes, junto con el elevado coste del desarrollo y comercialización de nuevos acaricidas, han estimulado la búsqueda de métodos alternativos para el control de garrapatas, entre los que destacan las **vacunas anti-garrapata** y los métodos de **control biológico** con agentes como parasitoides, predadores y organismos entomopatógenos como hongos, bacterias y nematodos (Ginsberg, 2014).

4.1. Control biológico

De los agentes biológicos antes citados, los más estudiados y prometedores frente a garrapatas son los hongos entomopatógenos (Samish et al., 2008). Estos agentes, especialmente las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, han mostrado ser eficaces contra las garrapatas, tanto en estudios de laboratorio como en investigaciones de campo.

La gran mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con especies de ixódidos y han sido revisados y actualizados por Fernandes y Bittencourt, (2008), Polar et al. (2008), Ment et al. (2013), Ginsberg (2014), Alonso-Díaz y Fernández-Salas (2021) y Cafarchia et al. (2022).

Por el contrario, los estudios dirigidos al control de argásidos utilizando hongos entomopatógenos son más escasos e incluyen a cinco especies de esta familia, en concreto las siguientes:

Argas persicus es la garrapata de la gallina y puede ser un problema en las explotaciones aviares. Sewify y Habib (2001) y Habib y Sewify (2002) analizaron por primera vez el efecto acaricida de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en esta especie. Para ello pulverizaron gallineros densamente infestados por este argásido con suspensiones de esporas y observaron que la población parasitaria desaparecía en 3 semanas. Más tarde, Pourseyed et al. (2010) consiguió un 100% de mortalidad entre las larvas y hembras de *A. persicus* tratadas con *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio. Y más recientemente, también en condiciones de laboratorio, Marzouk et al. (2020) y Ali (2022) demostraron una alta patogenicidad de *B. bassiana* para las hembras y los huevos de esta especie.

En estudios similares, Tavassoli et al. (2011, 2012) analizaron el efecto acaricida de varios aislados de *M. anisopliae* y *B. bassiana* frente a la garrapata de la paloma, *Argas reflexus*, y frente a *Ornithodoros lahorensis*, observando altas mortalidades en adultos y cercanas al 100% en larvas de ambas especies en condiciones de laboratorio.

Por último, nuestro equipo analizó el efecto acaricida de varios aislados de *B. bassiana* y *Tolypocladium cylindrosporum* sobre adultos de *O. erraticus* y *O. moubata*, observando mortalidades del 70% y 40% en *O. erraticus* y en *O. moubata*, respectivamente (Zabalgogezcoa et al., 2008; Herrero et al., 2011).

En consecuencia, todos estos resultados sugieren la viabilidad de utilizar cepas de hongos entomopatógenos como agentes eficaces para el control biológico de los argásidos

4.2. Control inmunológico con vacunas anti-garrapata: estado actual.

El control inmunológico mediante vacunas anti-garrapata ha emergido como una alternativa eficiente, sostenible y respetuosa con el medio natural, lo que la hace más prometedora que el control biológico a la hora de reemplazar o complementar el uso de acaricidas químicos (Valle and Guerrero, 2018; Ndawula and Tabor, 2020; van Oosterwijk and Wikel, 2021).

El objetivo de las vacunas anti-garrapata es inducir en los hospedadores una respuesta inmunitaria humoral frente a determinadas proteínas antigénicas de la garrapata, de manera que cuando la garrapata se alimente sobre un hospedador vacunado, los efectores inmunes ingeridos con la sangre, fundamentalmente los anticuerpos y el sistema del complemento, neutralicen la función de las proteínas diana y produzcan daños significativos a la garrapata. Daños que pueden ir desde el bloqueo de la alimentación y de la reproducción hasta la muerte del parásito, consiguiendo de esta manera reducir el tamaño de sus poblaciones (Figura 1.3.).

Por tanto, en el desarrollo de vacunas anti-garrapata eficaces, el primer paso, y el más importante, es la identificación de antígenos diana capaces de inducir respuestas inmunitarias protectoras.

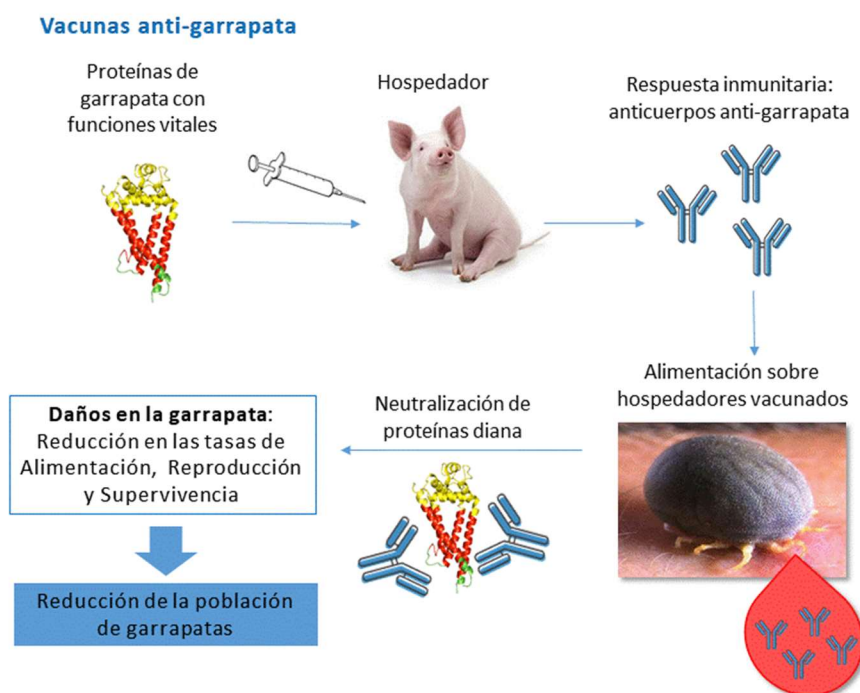


Figura 1.3. Hipótesis de la vacunación de hospedadores frente a las garrapatas.

Las dos primeras vacunas anti-garrapata, y las únicas existentes hasta la fecha, se desarrollaron y comercializaron durante los años 90 del pasado siglo: TickGARD® en Australia y GAVAC® en Latinoamérica. Ambas están dirigidas frente al ixódido *Rhipicephalus microplus* y se basan en los antígenos Bm86 y Bm95, que son glicoproteínas expresadas en la superficie luminal de los enterocitos del intestino medio, no expuestas al sistema inmunitario del hospedador durante los contactos naturales y, por tanto, consideradas como antígenos ocultos. Los anticuerpos anti-Bm86/Bm95 actúan uniéndose a las células digestivas e interactuando con el complemento del hospedador, de modo que inhiben la endocitosis de la sangre ingerida y dañan el intestino, lo que provoca la muerte de las garrapatas y la inhibición de la oviposición. Aunque con eficacia variable, la aplicación de estas vacunas ha demostrado que la inmunización de los hospedadores es un método sostenible para controlar las poblaciones de garrapatas. Su implementación en programas de control integrado ayuda a reducir el uso de acaricidas, lo que a su vez disminuye los costos de tratamiento y la probabilidad de aparición de resistencias, prolongando la vida útil de los acaricidas químicos en el mercado (Guerrero et al., 2012; de la Fuente et al., 2016; Bishop et al., 2023).

Desde la comercialización de estas dos vacunas se ha llevado a cabo un enorme esfuerzo investigador para aumentar la disponibilidad y eficacia de nuevas vacunas anti-garrapata, pero esta tarea está siendo más lenta y difícil de lo esperado y, de hecho, en los últimos 30 años no se han comercializado nuevas vacunas anti-garrapata.

La principal causa de ese retraso ha sido la dificultad para la identificación de antígenos protectores más eficaces. Como resultado, el repertorio de candidatos vacunales disponible es bastante reducido, como señalan las revisiones que lo actualizan periódicamente, de las que citamos las más recientes (Guerrero et al., 2012; de la Fuente et al., 2016; Lew-Tabor y Rodríguez Valle, 2016; Valle y Guerrero, 2018; Abbas et al., 2023; Parizi et al.; 2023).

La mayoría de estos antígenos protectores han sido identificados en especies de ixódidos y en mucha menor medida en especies de argásidos. En esta familia de garrapatas, los escasos candidatos vacunales identificados han sido específicamente revisados por Díaz-Martín et al. (2015b) y Obolo-Mvoulouga (2017).

Por su interés para nuestro estudio, el listado actual de candidatos vacunales de argásidos se comenta detalladamente en el apartado 5 de esta introducción, incluyendo los identificados más recientemente por Obolo-Mvoulouga et al. (2018) y Pérez-Sánchez et al. (2019a, 2019b).

En suma, cabe señalar que, pese a los esfuerzos realizados, se requiere más investigación para desarrollar nuevas vacunas anti-garrapata más eficaces. Y con ese objetivo, el primer reto al que nos enfrentamos sigue siendo la identificación de nuevos antígenos protectores más eficaces que amplíen el repertorio actual de candidatos vacunales (Abbas et al., 2023).

4.3. Vacunas anti-garrapata: criterios y estrategias para la identificación y verificación de nuevos antígenos protectores

Existe un amplio consenso en cuanto a las características que debe reunir un candidato antígeno para ser incorporado en una vacuna anti-garrapata como antígeno protector (Parizi et al., 2012).

Estas características, revisadas y analizadas por Díaz-Martín et al. (2015b) y Obolo-Mvoulouga (2017), son las siguientes: (1) ser accesible a los efectores inmunes ingeridos con la sangre del hospedador, básicamente los anticuerpos y el complemento; de acuerdo con esto, las proteínas secretadas en la saliva y las proteínas de la membrana luminal de los enterocitos serían los candidatos más adecuados, ya que constituyen la primera línea de interacción molecular en la interfase garrapata-hospedador (Nuttall et al., 2006; Maruyama et al., 2017; Antunes et al., 2018); (2) ejercer una función vital para la garrapata, de modo que la interacción antígeno-anticuerpo anule la función del antígeno diana y produzca la muerte del parásito o la inhibición de su desarrollo y reproducción; (3) estar codificado por un gen único, o con un bajo número de copias, y que no pertenezca a una familia multigénica para evitar que la pérdida de función inducida por la vacuna sea compensada por otros miembros de la familia con funciones redundantes; (4) compartir epítomos conservados entre diferentes especies de garrapatas, lo que permitiría desarrollar vacunas para el control conjunto de varias especies relacionadas y (5), que reduzca las tasas de infección y transmisión de patógenos.

Estos criterios siguen estando vigentes actualmente y pueden ser integrados fácilmente en las estrategias experimentales utilizadas por la vacunología moderna para la búsqueda de candidatos vacunales de garrapata.

No hace mucho, en su revisión sobre vacunas anti-garrapata, Willadsen (2008) analizó los tres tipos de estrategias experimentales utilizadas hasta entonces para identificar antígenos protectores en las garrapatas: (1) la inmunológica, basada en el estudio de antígenos que provocan una respuesta inmune; (2) la funcional, basada en la identificación de proteínas de la garrapata importantes para la fisiología y la supervivencia del parásito; y (3) el fraccionamiento bioquímico, basado en la vacunación con fracciones de extractos proteicos de composición progresivamente más simple y análisis del efecto sobre el parásito hasta aislar un antígeno protector individual.

En poco más de una década, el desarrollo y aplicación de las técnicas de análisis masivo (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, inmunómica) a las garrapatas junto con el desarrollo en paralelo de herramientas bioinformáticas más potentes y específicas para la integración y análisis de macrodatos, han permitido una rápida transición desde las estrategias tradicionales anteriores hacia las nuevas estrategias ómicas utilizadas hoy en la identificación de antígenos protectores de garrapata (Valle y Guerrero, 2018).

Entre estas nuevas estrategias, las más utilizadas incluyen: (1) una estrategia racional basada en el conocimiento de la biología de las garrapatas, (2) la genética reversa, basada en la modificación de la actividad de un gen diana para determinar las consecuencias fenotípicas, (3) la vacunómica y (4) una estrategia basada en el conocimiento de la evolución de las proteínas

de garrapata, con el objetivo de bloquear las interacciones proteína-proteína y las rutas metabólicas conservadas en garrapatas (de la Fuente et al., 2016; de la Fuente y Contreras, 2021, 2022). De ellas, la estrategia racional y la vacunómica, son las utilizadas en el presente trabajo.

La estrategia racional para el descubrimiento de antígenos protectores se basa en el conocimiento de las moléculas y procesos biológicos específicamente desarrollados por las garrapatas para adaptarse a su estricto estilo de vida hematófago (Figura 1.4.).

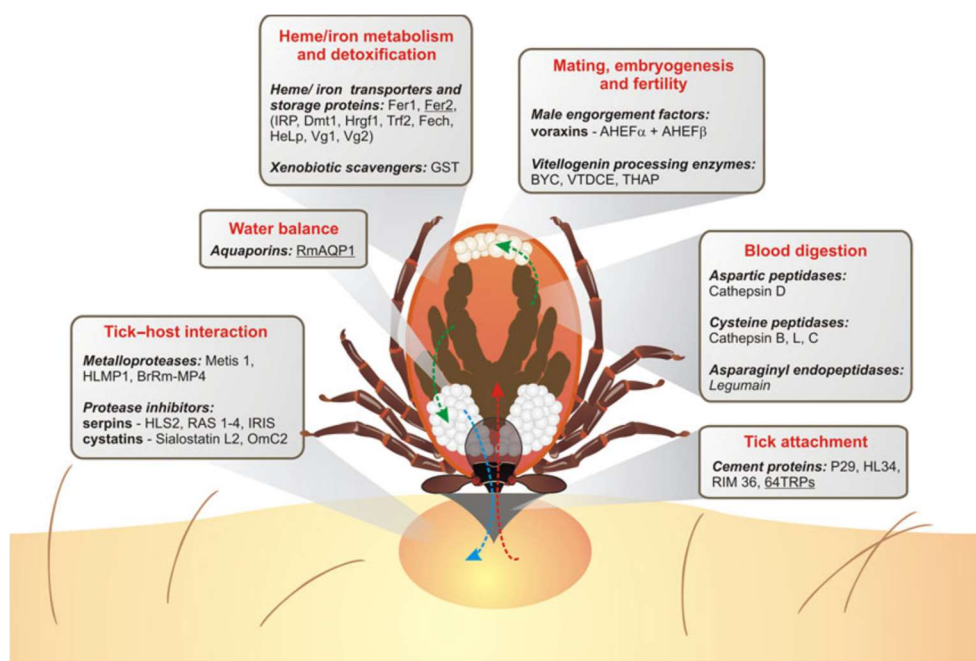


Figura 1.4. Principales procesos fisiológicos resultantes de la adaptación a la hematofagia de las garrapatas. Para cada uno de ellos se indican algunas de las moléculas implicadas que ya han sido ensayadas como candidatos vacunales, subrayando los más prometedores (de la Fuente et al., 2016).

Estos procesos biológicos son principalmente: (i) los relacionados con la fijación al hospedador y la ingestión de sangre, incluyendo la modulación de las respuestas defensivas del hospedador y el balance hídrico, los cuales son llevados a cabo esencialmente por proteínas expresadas en las **glándulas salivales**; (ii) los procesos relacionados con la digestión de la sangre, incluyendo el transporte y metabolismo de nutrientes, la gestión metabólica del grupo hemo y del hierro, la detoxificación y las respuestas al estrés oxidativo, que son llevados a cabo básicamente por moléculas expresadas en el **intestino medio**; y (iii) el apareamiento, embriogénesis y fertilidad, que dependen esencialmente de las células y moléculas del **ovario** (de la Fuente et al., 2016; Chmellar et al., 2016).

La aplicación de esta estrategia junto con los criterios (1) y (2) para la selección de candidatos vacunales, es decir, los de ser fácilmente accesibles a los efectores inmunes ingeridos con la sangre del hospedador y desempeñar una función vital para la garrapata, ha convertido a las glándulas salivales y al intestino medio de las garrapatas en los órganos de elección para la búsqueda de antígenos protectores.

Consecuentemente, los transcriptomas y proteomas de estos órganos están siendo estudiados en cada vez más especies de garrapatas para adquirir conocimientos sobre los genes y proteínas implicados en los procesos antes mencionados y para caracterizar dichos genes/proteínas como candidatos vacunales mediante la aplicación de estrategias vacunómicas (Chmelar et al., 2016).

Las estrategias vacunómicas son enfoques holísticos basados en la biología de sistemas, donde se analizan las interacciones entre hospedadores, garrapatas y patógenos. Se recopilan datos genómicos, transcriptómicos, proteómicos, inmunológicos y metabólicos, los cuales se integran y analizan *in silico* utilizando diversas herramientas bioinformáticas (Figura 1.5).

Este análisis permite realizar una selección teórica de candidatos vacunales en función de determinados criterios basados en hipótesis, como, por ejemplo, la localización subcelular, la expresión en membranas, inmunogenicidad, presencia de epítomos B y T o su posible función biológica (Lew-Tabor y Rodríguez-Valle, 2016; de la Fuente et al., 2016, 2018).

La lista de candidatos obtenida puede ser filtrada según criterios adicionales, como su expresión en diferentes especies, fases evolutivas y tejidos, o su expresión diferencial dependiendo del estado fisiológico de los ejemplares. En este punto, la obtención de los correspondientes proteomas y la integración de los datos proteómicos son de gran utilidad (Anderson et al., 2008; Chmelar et al., 2016).

El análisis *in silico* de las interacciones proteína-proteína (PPIs) de los candidatos también puede ayudar a identificar antígenos protectores implicados en la regulación de múltiples procesos biológicos a través de interacciones físicas con otras proteínas o que participen en procesos conservados entre vectores hematófagos. En garrapatas estos análisis son aún incipientes, pero pueden beneficiarse de las bases de datos de PPIs y de las herramientas bioinformáticas ya disponibles (Artigas-Jerónimo et al., 2020; Contreras et al., 2022).

Los candidatos proporcionados por el análisis *in silico* pueden someterse a determinados ensayos experimentales con el fin de seleccionar aquellos con el mayor potencial protector. Por ejemplo, el silenciamiento génico mediante RNA interferente (RNAi) o la alimentación *in vitro* con anticuerpos frente a esos antígenos (de la Fuente et al., 2010; Lew-Tabor et al., 2014).

Los candidatos seleccionados se producen en forma recombinante y se validan mediante ensayos de vacunación en animales, tanto en condiciones de laboratorio como de campo. El paso final consiste en caracterizar la función biológica del antígeno y el mecanismo inmunológico que genera el efecto protector.

Toda esta información puede ser usada posteriormente para diseñar vacunas multiantigénicas, basadas en el uso combinado de antígenos con diferentes funciones a fin de producir efectos protectores acumulativos o sinérgicos (Ndawula and Tabor, 2020; Parthasarathi et al., 2021).

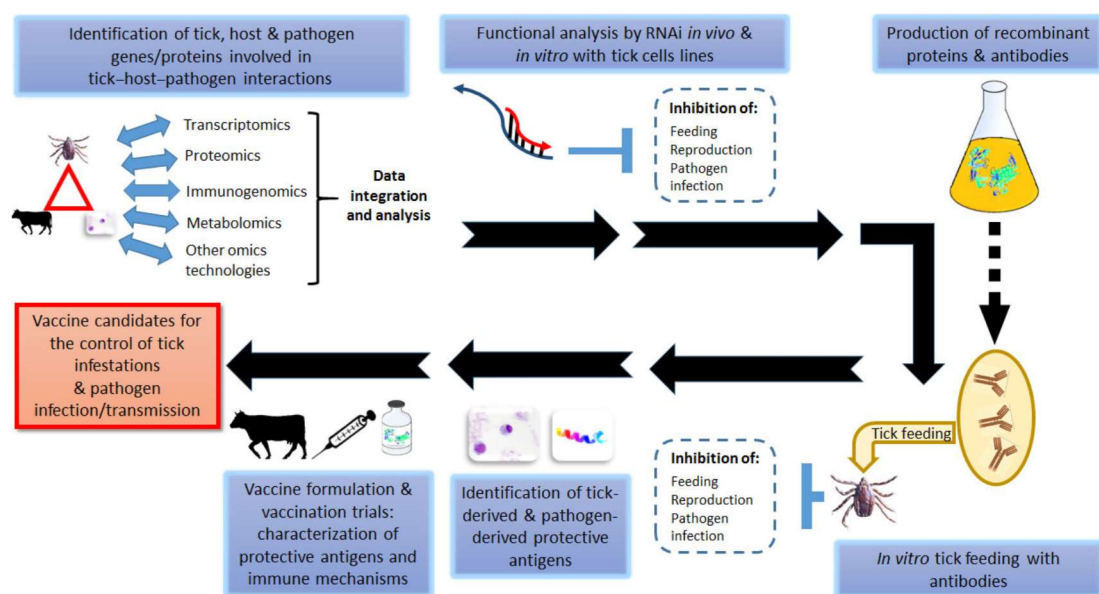


Figura 1.5. Vacunómica aplicada al desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por garrapatas y de la transmisión de patógenos. La figura presenta un enfoque holístico (biología de sistemas) basado en la integración y análisis de datos ómicos obtenidos a partir del examen de las interacciones hospedador-garrapata-patógeno (de la Fuente et al., 2016).

4.4. Vacunas anti-garrapata: vacunómica aplicada al desarrollo de vacunas frente a argásidos.

Debido al gran tamaño y la complejidad de los genomas de garrapatas (Nuss et al., 2016), la mayor parte de los estudios vacunómicos desarrollados con estos organismos han comenzado por obtener los transcriptomas y proteomas de los órganos de interés (principalmente las glándulas salivales y el intestino medio) y analizar en ellos la expresión diferencial de genes y proteínas en respuesta a distintos estímulos, como la ingestión y digestión de la sangre o la infección por patógenos (Chmelar et al., 2016; de la Fuente et al., 2018).

En relación con el intestino medio, ya se han caracterizado los transcriptomas y proteomas de varias especies de ixódidos relevantes para la salud humana y animal, como, por ejemplo, *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 2008), *Rhipicephalus microplus* (Rachinsky et al., 2008; Kongsuwan et al. 2010; Heekin et al. 2013; Popara et al., 2015), *Rhipicephalus bursa* (Antunes et al., 2018) e *Ixodes ricinus* (Schwarz et al., 2014; Kotsyfakis et al., 2015; Perner et al., 2016a; Medina et al., 2022). En argásidos este tipo de estudios han sido más escasos y sólo recientemente se han obtenido y caracterizado los transcriptomas y proteomas (mialomas) de *O. erraticus* y *O. moubata* (Oleaga et al., 2015, 2017a, 2017b, 2018) y el transcriptoma de *Ornithodoros mimon* (Landulfo et al., 2017).

Estos estudios han proporcionado gran cantidad de información inédita sobre los genes y las proteínas del intestino medio de los argásidos implicadas en la digestión de la sangre, el metabolismo de los nutrientes, los mecanismos de transporte intracelular y las respuestas defensivas, antioxidantes y detoxificantes desencadenadas por la ingestión de sangre. Además,

también han mostrado que el sistema hemoglobínico es muy similar en argásidos e ixódidos a pesar de las diferentes estrategias de alimentación utilizadas por ambas familias (Oleaga et al., 2018).

La exploración de los mialomas de *O. erraticus* y *O. moubata* mediante estrategias vacunómicas ha permitido seleccionar varios candidatos vacunales de cada una de estas especies y evaluar su eficacia protectora en pruebas de inmunización de animales. Algunos de ellos indujeron un nivel significativo de protección frente a las infestaciones por *Ornithodoros* sp. (Obolo-Mvoulouga et al., 2018; Pérez-Sánchez et al., 2019a, 2019b), por lo que se les ha considerado de utilidad para su inclusión en la formulación de vacunas anti-garrapata (ver más adelante, apartado 5).

En relación con las glándulas salivales, la mayoría de los transcriptomas y proteomas estudiados proceden de ixódidos y en menor medida de argásidos. De hecho, se han anotado y publicado los sialomas de al menos 26 especies de ixódidos frente a 6 especies de argásidos, concretamente *Ornithodoros coriaceus*, *Ornithodoros parkeri*, *Ornithodoros turicata*, *Ornithodoros rostratus*, *Argas monolakensis* y *Antricola delacruzi* (Francishetti et al., 2008a, 2008b; Mans et al., 2008a; Ribeiro et al., 2012; Araujo et al., 2019; Bourret et al., 2019). A estos hay que añadir el sialotranscriptoma y sialoproteoma de *O. moubata*, obtenidos por nuestro equipo de investigación en estudios similares a los que presentamos en esta Tesis doctoral (Oleaga et al., 2021a, 2021b).

El análisis comparado de estos sialomas de garrapata ha revelado la existencia de miles de secuencias codificantes de proteínas salivales y de grandes familias de proteínas multigénicas, muchas de las cuales están conservadas en ambas familias de garrapatas, lo que refleja la complejidad y redundancia funcional de los sialomas y de la saliva de las garrapatas, especialmente en los ixódidos (Nuttall, 2019; Mans, 2020). Recientemente, se ha creado una base de datos que compila y clasifica todas esas secuencias salivales de garrapatas (TickSialoFam), facilitando la anotación y análisis de los nuevos datos ómicos que se obtienen continua y crecientemente en otras especies de garrapatas (Ribeiro y Mans, 2020).

En este contexto, la obtención de los sialomas de otras especies de argásidos facilitará la búsqueda de antígenos protectores conservados permitiendo el desarrollo de vacunas para el control conjunto de varias especies relacionadas.

Con respecto a *O. erraticus*, ni su genoma ni su sialotranscriptoma están aún secuenciados. Sólo se han caracterizado parcialmente seis proteínas salivales que fueron identificadas en un estudio proteómico inicial del SGE basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Oleaga et al., 2007). En consecuencia, se desconoce la identidad de las proteínas salivales bioactivas secretadas por *O. erraticus* en la interfaz de alimentación de la garrapata, que son, previsiblemente, las encargadas de posibilitar la fijación de la garrapata al hospedador y la ingestión de la sangre.

Por tanto, la obtención del sialotranscriptoma de *O. erraticus* se considera una necesidad urgente. La disponibilidad de este transcriptoma permitirá elaborar un nuevo proteoma de la

saliva de *O. erraticus* (proteoma informado por el transcriptoma, PIT) mucho más completo que el anterior, lo que, a su vez, permitirá la identificación y caracterización de nuevos antígenos salivales potencialmente protectores.

4.5. Vacunas multiantigénicas como vía para aumentar la eficacia y el rango de protección.

Los antígenos protectores identificados hasta la fecha inducen una protección variable y parcial, pero no una protección completa, que idealmente consistiría en un 100% de letalidad o un bloqueo total de la reproducción de las garrapatas.

Existe una aceptación creciente de la hipótesis de que la combinación de antígenos parcialmente protectores en vacunas multiantigénicas podría ampliar el rango de protección y mejorar la eficacia de las vacunas contra las garrapatas (Ndawula y Tabor, 2020; Parthasarathi et al., 2021).

Las vacunas multiantigénicas formuladas combinando diferentes antígenos con adyuvantes se denominan vacunas cóctel y pueden tener varios objetivos, como: (i) mejorar la eficacia de la protección frente a una especie de garrapata en particular, (ii) aumentar el rango de protección del hospedador frente varias especies de garrapatas, (iii) inducir protección frente a varias fases evolutivas de la misma especie y (iv) bloquear la infección y transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas. Para alcanzar esos objetivos se pueden formular vacunas multiantigénicas combinando antígenos protectores de la misma garrapata y fase evolutiva, de diferentes fases evolutivas, de diferentes especies de garrapatas y de patógenos transmitidos por garrapatas.

De hecho, ya se han publicado varios estudios que confirman la mayor eficacia protectora de este tipo de formulaciones multiantigénicas en comparación con sus componentes individuales (revisados por Ndawula y Tabor, 2020; Parthasarathi et al., 2021).

Nuestro equipo de investigación también comparte esta hipótesis y recientemente ha observado un incremento significativo en la eficacia protectora de dos vacunas multiantigénicas anti-*Ornithodoros* formuladas combinando varios antígenos salivales de *O. moubata* en una de ellas (Díaz-Martín et al., 2015a) y varios antígenos intestinales de *O. erraticus* en la otra (Perez-Sánchez et al., 2019b). Los detalles de estas formulaciones se describen más adelante, en el apartado 5.

Lo que aún no se ha evaluado es la eficacia protectora de combinaciones de antígenos salivales e intestinales en una única formulación vacunal. Se asume que este tipo de combinación de varios antígenos protectores con funciones diferentes expresados en distintos órganos puede generar efectos protectores sinérgicos al bloquear un mayor número de procesos biológicos esenciales para la garrapata.

A la luz del creciente interés en las vacunas multiantigénicas frente a garrapatas, Ndawula y Tabor (2020) han examinado sus posibles limitaciones y proponen estrategias para mejorar su eficacia. Entre otras cuestiones, estos autores prestan especial atención a (i) cómo evitar la competencia antigénica, que puede disminuir o incluso suprimir la respuesta inmune a uno o

más de los antígenos administrados, y a (ii) cuál sería el sistema de expresión de antígenos protectores más apropiado. En este contexto, cabe señalar que los sistemas procariotas de expresión de proteínas han sido los más utilizados para producir candidatos vacunales de garrapata, pero pueden generar proteínas incorrectamente plegadas que carecen de epítomos conformacionales y de epítomos glicánicos, los cuales pueden ser importantes en la inducción de una respuesta humoral protectora (Fakruddin et al., 2012).

El desarrollo de vacunas multiantigénicas parece una buena forma de conseguir vacunas más eficaces, pero este proceso requiere abordar y optimizar cuidadosamente una serie de puntos, que incluyen, entre otros, los siguientes: (1) la selección racional de los antígenos diana, (2) el sistema de expresión de los antígenos y/o la plataforma de administración más adecuados, como por ejemplo, proteínas recombinantes formuladas con adyuvante o bien mRNA encapsulado en nanopartículas lipídicas (mRNA-LNP) y (3) el protocolo de vacunación, que debe tener en cuenta el sitio de inoculación, la vía de administración, la dosis de antígeno, el número de dosis, el intervalo entre dosis, etc..

4.6. Nuevas plataformas vacunales anti-garrapata: vacunas mRNA-LNP.

Aunque las vacunas basadas en proteínas recombinantes han sido el pilar de la vacunología durante el último siglo, la rápida evolución de esta ciencia en las últimas tres décadas ha puesto de relieve la posibilidad de utilizar vacunas basadas en DNA y mRNA para administrar al hospedador directamente las secuencias codificantes de los antígenos diana. Esto permite la generación de los antígenos *in vivo* por las células del propio hospedador y su inmediata presentación inmunológica, que induce respuestas mediadas por células B y T, que son críticas para obtener una inmunidad eficaz y duradera. Esta estrategia puede evitar el engorroso proceso de optimización/producción y formulación de proteínas recombinantes y acelerar el progreso en el desarrollo de vacunas anti-garrapata (Narashiman et al., 2021).

La pandemia de COVID19 demostró que las vacunas de mRNA son eficaces y seguras, impulsando enormemente su desarrollo. Numerosas publicaciones recientes revisan los principios, las bases técnicas y los avances más recientes de la terapia con mRNA, incluido el diseño y la síntesis de mRNAs, la tecnología para su preservación y administración y sus aplicaciones clínicas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades de base genética y cáncer (Linares-Fernández et al., 2020; Pardi et al., 2020; Chaudhary et al., 2021; Kon et al., 2022; Rouf et al., 2022).

En garrapatas, Matías et al. (2021) publicaron el primer estudio para desarrollar una vacuna mRNA-LNP. Vacunaron cobayas frente al vector de la enfermedad de Lyme, *Ixodes scapularis*, utilizando mRNA, DNA y proteína recombinante para inducir y comparar respuestas inmunitarias protectoras frente al anticoagulante salival Salp14. Demostraron que el mRNA funcionó mejor que las otras dos plataformas, induciendo niveles de anticuerpos anti-Salp14 más altos y respuestas celulares más fuertes en el sitio de la picadura. Este trabajo demostró la prueba de concepto de que una vacuna mRNA-LNP con secuencias codificantes de garrapata es adecuada para el desarrollo de vacunas anti-garrapata. En un trabajo posterior, el mismo equipo diseñó y aplicó a cobayas una vacuna mRNA multiantigénica con 19 secuencias de proteínas salivales de *I. scapularis* (19ISP) que indujo potentes respuestas humorales y celulares. Esta

respuesta bloqueó parcialmente la alimentación y produjo el desprendimiento prematuro de las garrapatas, reduciendo de este modo la transmisión del agente de la enfermedad de Lyme *Borrelia burgdorferi* (Sajid et al., 2021). Este trabajo demostró la viabilidad las formulaciones multiantigénicas de vacunas mRNA con antígenos salivales de las garrapatas y su potencial para prevenir las infestaciones por garrapatas y las enfermedades que estas transmiten.

Estas evidencias abren nuevas vías para el desarrollo de vacunas mRNA-LNP eficientes y comercialmente atractivas destinadas al control eficaz de las garrapatas y las enfermedades transmitidas por garrapatas.

5. DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A ARGÁSIDOS DEL GÉNERO ORNITHODOROS.

Las investigaciones orientadas al desarrollo de vacunas contra argásidos han sido considerablemente más limitadas que aquellas dirigidas a ixódidos, y se han centrado únicamente en unas pocas especies pertenecientes a los géneros *Ornithodoros* y *Argas*.

En relación con *Argas*, los tres únicos estudios publicados son el de Dusbábek et al. (1990) en *Argas polonicus* y los de Sayed et al. (2001, 2004) en *Argas persicus*. Por su parte, los estudios con *Ornithodoros* incluyen los de Chinzei y Minoura (1988) y Salat et al. (2010) con *O. moubata*, y los de Need y Butler (1991) con *Ornithodoros turicata* y *Ornithodoros talaje*. A éstos hay que añadir los llevados a cabo por nuestro equipo de investigación con *O. erraticus* y *O. moubata*, en los cuales se ha evaluado el valor vacunal tanto de antígenos salivales como de antígenos ocultos procedentes de diferentes órganos y tejidos, principalmente del intestino medio, por ser las glándulas salivales y el intestino medio los órganos más importantes que participan en la interfase garrapata-hospedador.

Todos estos estudios, revisados previamente por Díaz-Martín et al. (2015b) y Obolo-Mvoulouga (2017), se han recopilado y actualizado en las tablas 1.1. y 1.2, y se comentan a continuación.

El intestino medio, y el resto de órganos internos de las garrapatas, expresan proteínas antigénicas que estos parásitos nunca exponen al sistema inmune del hospedador cuando se alimentan de forma natural. Estas proteínas se consideran antígenos ocultos, y por definición no habrán sufrido la presión selectiva impuesta por la respuesta inmunitaria del hospedador, por lo que: (i) mantendrán una alta inmunogenicidad y previsiblemente inducirán fuertes repuestas humorales al ser administradas con adyuvantes; y (ii) es probable que estén conservadas en otros argásidos, e incluso en ixódidos, lo que permitiría utilizarlas en una vacuna de amplio espectro frente a estos vectores hematófagos (Nuttall et al., 2006).

Por el contrario, las proteínas salivales inoculadas al hospedador durante la alimentación se consideran antígenos expuestos y muchos de ellos inducen respuestas inmunitarias durante los contactos naturales. Estos antígenos tendrían la ventaja de que en los hospedadores vacunados con ellos las infestaciones naturales actuarían como potenciadoras de la respuesta (Nuttall et al., 2006). Sin embargo, algunos autores cuestionan el valor vacunal de los antígenos salivales expuestos, ya que, a lo largo de la coevolución con el hospedador, la garrapata puede

haber desarrollado vías para protegerlos de la respuesta inmunitaria (Brake and Pérez de León, 2012) y de hecho, muchos de ellos inducen respuestas inmunitarias no protectoras.

Considerando esto, los antígenos salivales “silentes” se perfilan como candidatos vacunales más prometedores. Estos antígenos son inoculados al hospedador junto con la saliva sin ser reconocidos por la respuesta inmunitaria natural a la picadura, pero sí por la respuesta inducida cuando se administran mediante vacunación. Estos antígenos no han estado sometidos a la presión selectiva del sistema inmunitario del hospedador y la garrapata no habrá desarrollado mecanismos para protegerlos, por lo que, en teoría conservarán una alta inmunogenicidad y pueden servir para desarrollar vacunas en las cuales las propias picaduras actuarían después como dosis antigénicas de recuerdo (Trimnell et al., 2002).

5.1. Ensayos con antígenos ocultos del intestino y otros órganos internos.

El primero de estos trabajos fue el de Chinzei y Minoura (1988), quienes vacunaron conejos con el vitelo de huevos de *O. moubata* y obtuvieron una respuesta que disminuyó la fecundidad de las hembras en un 50%. Dado que los anticuerpos del hospedador acceden intactos desde el lumen intestinal a la hemolinfa (Minoura et al., 1985; Chinzei y Minoura, 1988; Ben-Yakir, 1989), unos anticuerpos anti-vitelina/vitelogénina podrían haber inhibido la incorporación de la vitelogénina, desde el intestino y la hemolinfa, a los oocitos en forma de vitelina, lo cual podría explicar el efecto protector (Kopacek et al., 2000; Gudderra et al., 2002; Horigane et al., 2010).

Poco después, Need y Butler (1991) inmunizaron ratones CD1 frente a *O. turicata* y *O. talaje* con extractos del intestino y del conjunto de los órganos internos distintos del intestino. Ninguno de los dos extractos proporcionó protección contra las larvas de *O. turicata*, pero sí frente a las de *O. talaje*, de alimentación lenta, en las que provocaron un aumento de la mortalidad del 12% al 29%, un efecto similar al inducido por la respuesta inmunitaria natural frente a esta especie.

Nuestro grupo comenzó los estudios con antígenos ocultos de argásidos vacunando cerdos con extractos solubles de la hemolinfa, singanglio, glándulas coxales e intestino medio de *O. erraticus* (Astigarraga et al., 1995). Con estos antígenos no se obtuvo protección alguna, probablemente porque durante la preparación de los extractos antigénicos se eliminaron las proteínas de membrana. Según los criterios mencionados en el apartado 4.3, dichas proteínas —especialmente las presentes en la cara luminal de los enterocitos— podrían ser las de mayor interés para el desarrollo de vacunas.

La verificación de la hipótesis anterior en *O. erraticus* y en *O. moubata* fue parte de los estudios doctorales de Manzano-Román (2002) y García Varas (2004), respectivamente. En dichos estudios se observó que la vacunación de hospedadores (cerdos, conejos y ratones) con extractos crudos del intestino medio proporcionaba respuestas protectoras que bloqueaban la alimentación y reproducción de las hembras hasta un 50% en ambas especies y, además, en *O. erraticus* provocaban la muerte de hasta el 80% de las ninfas en las primeras 24-72 horas post-alimentación.

En *O. erraticus* se demostró que la acción de la vacuna era consecuencia de los daños producidos en la pared del intestino por los anticuerpos y el complemento del hospedador, de forma similar a lo observado en las vacunas basadas en los antígenos Bm86 y Bm95. La caracterización, parcial, de los antígenos de *O. erraticus* responsables de este efecto mostró que eran proteínas de la membrana luminal de los enterocitos cuya expresión aumenta tras la ingestión de la sangre, alcanzando un máximo entre las 24-72 horas post-alimentación (Manzano-Román et al., 2006, 2007). Aunque estas proteínas no fueron identificadas, lo anterior confirmaba el potencial vacunal de los antígenos de membrana del intestino medio de estos argásidos convirtiendo a este órgano en objetivo prioritario de estudio para la búsqueda e identificación de candidatos vacunales, en concordancia con lo sugerido por otros autores en relación con los ixódidos.

En consecuencia, la identificación y validación experimental de antígenos intestinales protectores, tanto de *O. erraticus* como de *O. moubata*, fueron abordados aplicando una estrategia vacunómica que incluyó los siguientes objetivos: (i) la obtención de los mialomas (transcriptoma y proteoma) de ambas especies en dos estados fisiológicos (antes y a las 48 horas de la alimentación) y su análisis comparado para identificar los genes/proteínas expresados diferencialmente en respuesta a la ingestión de la sangre; (ii) la selección *in silico* como candidatos vacunales de las proteínas antigénicas, sobreexpresadas en la membrana luminal de los enterocitos y anotadas con funciones asociadas a los procesos de digestión de la sangre; (iii) la producción de los candidatos con mayor potencial protector teórico y (iv) su evaluación y eventual validación como antígenos protectores en pruebas de inmunización de animales.

De este modo se caracterizaron unos 75-90 antígenos potencialmente protectores a partir del intestino medio de cada una de estas dos especies, 20 de los cuales se produjeron y evaluaron experimentalmente y cinco de ellos se validaron como antígenos protectores: dos fueron identificados en *O. moubata* (OM85 y OM03; Obolo-Mvoulouga et al., 2018) y cinco en *O. erraticus* (OeSEL, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2) (Perez-Sánchez et al., 2019a, 2019b) (Tabla 1). Todos ellos indujeron protección cruzada frente a ambas especies y, curiosamente, todos ellos fueron significativamente más eficaces frente a *O. erraticus* que *O. moubata*. La mayor sensibilidad de *O. erraticus* respecto a *O. moubata* frente a los antígenos intestinales ya había sido observada en trabajos previos en los que los hospedadores se vacunaron con extractos crudos de membranas del intestino medio de cada una de estas especies (García-Varas, 2004; Manzano-Román et al., 2006, 2007). Esto sugiere que en *O. moubata* puede haber determinados factores anatómicos, fisiológicos, moleculares y/o microbianos que reducen la eficacia protectora de los antígenos intestinales frente a esta especie.

Estos estudios también mostraron que la combinación de varios antígenos intestinales protectores (concretamente, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2) en una vacuna multiantigénica aumentaba la eficacia protectora. Mientras que su eficacia protectora individual osciló entre el 47% y el 58%, la eficacia conjunta alcanzó el 66%. En resumen, esta investigación validó varios antígenos intestinales protectores que pueden ser utilizados, en combinación con antígenos salivales protectores, en la formulación de vacunas multiantigénicas potencialmente más eficaces destinadas al control de argásidos vectores del género *Ornithodoros*.

Adicionalmente también se ha investigado el potencial protector de otros antígenos ocultos, como los ortólogos de subolesina en *O. erraticus* y *O. moubata*. La subolesina, descubierta como antígeno protector en *Ixodes scapularis*, es un ortólogo de las akirinas de insectos y vertebrados, que funciona como un factor de transcripción regulando la expresión génica en múltiples procesos fisiológicos de las garrapatas incluyendo la digestión, el desarrollo, la reproducción y la respuesta inmunitaria a la infección por patógenos. La vacunación con subolesina, o con sus epítomos protectores conservados, protege frente a las infestaciones por ixódidos, mosquitos y flebótomos y reduce las tasas de transmisión de patógenos, por lo que se considera un buen candidato para el desarrollo de vacunas de amplio rango frente a vectores hematófagos y los patógenos que transmiten (de la Fuente et al., 2013; Parizi et al., 2023). Por este motivo se examinó el valor vacunal de la subolesina en ambas especies de *Ornithodoros* observándose que su silenciamiento génico por RNAi en *O. erraticus* y *O. moubata* no afectaba a las tasas de alimentación ni supervivencia, pero inhibía la oviposición en más de un 88 %. La vacunación con formas recombinantes de subolesina proporcionó, sin embargo, un bajo grado de protección (5% y 24,5%), muy probablemente debido a la inducción de anticuerpos no protectores frente a epítomos inmunodominantes localizados en regiones altamente estructuradas de subolesina (Manzano-Román et al., 2012b). Para comprobar esta hipótesis se utilizó el mapeo epitópico, la predicción de epítomos B lineales y el modelado 3D para diseñar péptidos sintéticos a partir de las regiones desordenadas de la proteína, los cuales aumentaron significativamente las tasas de protección contra ambos *Ornithodoros* (70,1% y 83,1%). Estos resultados indicaban que el efecto protector de las vacunas basadas en subolesina depende de los epítomos concretos que son reconocidos por los anticuerpos y sugieren que la actividad biológica de estas proteínas es asumida por sus regiones no estructuradas, en paralelo con lo observado por otros autores (Manzano-Román et al., 2015). También que la predicción de epítomos B y T representa una herramienta prometedora para mejorar la inmunogenicidad de otros candidatos vacunales con un bajo grado de protección, así como para diseñar quimeras que contengan subolesina u otros epítomos antigénicos protectores (Parizi et al., 2023). Por último, estos resultados suministraron 4 péptidos protectores al repertorio de candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata y permiten incluir a los argásidos en el conjunto de vectores hematófagos sensibles a las vacunas basadas en subolesina/akirina.

5.2. Ensayos con antígenos salivales.

El primero de estos ensayos fue el de Need y Butler (1991), en el cual observaron un 16 % de mortalidad en las larvas de *O. talaje* alimentadas sobre ratones CD1 vacunados con un extracto completo de las glándulas salivales; mortalidad que resultó de similar magnitud a la inducida por la respuesta natural.

Más recientemente, Salat et al. (2010) evaluaron la capacidad protectora de la cistatina OmC2 de *O. moubata* en ratones C3H/HeN, observando un 15 % de mortalidad y un 39 % de reducción en las tasas de alimentación y muda de las ninfas-1 alimentadas sobre los animales vacunados, que fue la única fase evolutiva analizada en este trabajo.

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

Frente a *O. moubata*, el SGE indujo una respuesta protectora uniforme en todos los animales vacunados, que redujo la alimentación y oviposición de las hembras entre el 60% y 70%. Todos los animales vacunados reconocieron una proteína de 44 kDa (Om44), que no era reconocida por la respuesta inmunitaria del hospedador en los contactos naturales, respondiendo a la definición de antígeno salival silente (Astigarraga et al., 1995).

Estudios posteriores revelaron que el antígeno Om44, purificado y administrado individualmente a cerdos y conejos, inducía respuestas protectoras similares a las del SGE y que la protección aumentaba tras sucesivos contactos con *O. moubata* (García-Varas, 2004). La caracterización funcional de Om44 mostró que era un antagonista de la P-selectina del hospedador, capaz de inhibir la interacción entre la P-selectina en la superficie de las plaquetas y su ligando en la superficie de los leucocitos, bloqueando así los mecanismos hemostáticos desencadenados por esta interacción (Cleator et al., 2006). Los anticuerpos anti-Om44 inducidos por la vacuna anulan la función de la Om44 restaurando la hemostasia e impidiendo la alimentación del parásito. Los datos anteriores representaban la primera evidencia de un nuevo mecanismo antihemostático en vectores hematófagos y por tanto asignaban un gran interés a la Om44 como antígeno vacunal (García-Varas et al., 2010).

Los subsiguientes intentos de identificación de Om44 mediante espectrometría de masas mostraron que Om44 no es un ortólogo de ningún ligando conocido de P-selectina, como el PSLG-1 ni la pentraxina 3, pero sugerían que Om44 podría ser una isoforma de enolasa (Pérez-Sánchez et al., 2010). Dado que en la saliva de *O. moubata* se habían encontrado cantidades significativas de enolasa, esta proteína se clonó y se analizó funcionalmente (Díaz-Martín et al., 2013a, 2013b). El análisis mostró que la enolasa de la saliva no era un ligando de P-selectina y que, por el contrario, actuaba como un receptor profibrinolítico de plasminógeno del hospedador, potenciando la generación de plasmina. El descubrimiento de esta actividad de la enolasa en la interfase garrapata-hospedador, inédita hasta la fecha, la convertía en posible diana vacunal. La evaluación de su eficacia protectora en conejos inmunizados con enolasa recombinante mostró una reducción en torno al 20% en la oviposición de las hembras y en la supervivencia de las ninfas; un efecto que difería cuantitativa y cualitativamente del efecto

protector inducido por Om44, confirmando que la enolasa no era la identidad de Om44 (Díaz-Martín et al. 2013b).

La identificación de Om44 se abordó entonces mediante la construcción de microarrays de proteínas a partir de una genoteca cDNA de glándulas salivales de *O. moubata* y el sondeo de los microarrays con P-selectina y suero hiperinmune frente a Om44. Estos experimentos mostraron que Om44 era una forma secretada de fosfolipasa A2 (GenBank KC908103.1) capaz de unirse a P-selectina mediante interacciones proteína-proteína sin la participación de grupos glicánicos (Díaz-Martín, 2014; Manzano-Román et al., 2012c).

Además, la secuenciación al azar de la genoteca cDNA permitió identificar otras dos proteínas salivales antihemostáticas de *O. moubata*, concretamente una apirasa (GenBank KC908110.1) y una disagregina ortóloga a la savignygrina de *O. savignyi*, a la cual denominamos mougrina (GenBank KC908105.1). La vacunación de conejos con las formas recombinantes de estas tres proteínas salivares (administradas individual y conjuntamente) proporcionó respuestas protectoras que redujeron la alimentación y fertilidad de las hembras y la supervivencia de las ninfas (Díaz-Martín et al., 2015a). La eficacia protectora individual de cada antígeno varió entre el 27% y el 44 % y la eficacia conjunta alcanzó el 50 % en una primera infestación y superó el 60 % en infestaciones secundarias. En conjunto, estos resultados confirman que, en argásidos, los antígenos salivales con funciones antihemostáticas son candidatos vacunales muy prometedores por los siguientes motivos: (i) estos antígenos inducen respuestas protectoras que bloquean parcialmente la ingestión de sangre como consecuencia de la neutralización por los anticuerpos de su función antihemostática; (ii) el uso combinado de varios de estos antihemostáticos como antígenos eleva la eficacia protectora al evitar que la redundancia funcional de los componentes salivales de las garrapatas compense la pérdida de función de cada antígeno vacunal individual (Chmelar et al., 2012; Kazimírová and Štibrániová, 2013) y (iii) el efecto protector iniciado por los antígenos recombinantes es posteriormente mantenido e incluso aumentado por las formas nativas de dichos antígenos cuando son inoculadas al hospedador vacunado en infestaciones posteriores, lo que en principio, haría innecesarias las revacunaciones.

La identificación de epítomos protectores en estos antígenos sentaría las bases para reconocer epítomos conservados en ortólogos funcionales de otras especies de argásidos e incluso de ixódidos. Estos epítomos podrían incorporarse al diseño de antígenos recombinantes quiméricos, con el objetivo de desarrollar vacunas de amplio espectro que permitan controlar un mayor número de vectores y, en consecuencia, los patógenos que transmiten (de la Fuente y Contreras, 2021; de la Fuente et al., 2023).

En cuanto a *O. erraticus*, la vacunación de cerdos con SGE indujo una respuesta protectora bastante variable, que llegó a inhibir hasta el 50 % la alimentación y la fecundidad de las hembras, demostrando que en esta especie es posible inducir respuestas protectoras con antígenos salivales. La protección lograda en estas pruebas se atribuyó al reconocimiento, forzado por los adyuvantes de Freund, de varios antígenos silentes del SGE de 70, 50 y 20 kDa (Astigarraga et al., 1995).

En estudios posteriores en los que estos antígenos se purificaron y administraron individualmente a los hospedadores (cerdos), se comprobó que los antígenos de 70 y 50 kDa inducían en todos los animales fuertes respuestas humorales que, sin embargo, no eran protectoras y que, por el contrario, el antígeno de 20 kDa sí inducía respuestas protectoras, pero que la mayoría de los cerdos vacunados eran incapaces de reconocerlo, con independencia de la dosis, adyuvante y modo de administración. Estos resultados indicaban que frente a *O. erraticus*, la mera inducción del reconocimiento de componentes salivales silentes, como los de 70 y 50 kDa, no es sinónimo de protección y que, en cambio, sí podría serlo el reconocimiento de antígenos silentes concretos, como el de 20 kDa, los cuales están mucho más protegidos por el parásito, en vista de la dificultad para inducir una respuesta frente a ellos en todos los animales vacunados (Manzano Román, 2002). Las desventajas y limitaciones de estos tres antígenos les restaron interés como candidatos vacunales, motivo por el cual se abandonó su identificación y caracterización, de modo que hasta la fecha aún no se ha identificado ningún candidato salival de esta especie.

En consecuencia, urge identificar antígenos salivales protectores de *O. erraticus*. Este objetivo puede abordarse desarrollando una estrategia vacunómica similar a la mencionada en el apartado anterior para los antígenos intestinales. Esto es, el análisis del transcriptoma de las glándulas salivales de esta especie a lo largo del ciclo trofogónico y la identificación de los genes sobreexpresados diferencialmente tras la ingestión de la sangre, ya que, previsiblemente, estos genes son los que codifican a las proteínas que están dotadas con actividad biológica y que son secretadas en la saliva con el fin de modificar la fisiología del hospedador en el lugar de la picadura y posibilitar la alimentación del parásito, lo que las convierte en potenciales dianas vacunales.

Tabla 1.1. Ensayos de vacunación frente a argásidos utilizando **antígenos ocultos**. Extraída de Díaz-Martín et al. (2015b) y Obolo-Mvoulouga (2017) y actualizada con los candidatos vacunales identificados por Obolo-Mvoulouga et al. (2018) y Pérez-Sánchez et al. (2019a, 2019b).

Species	Antigen name	Protein identity	Antigen type	Protein function	Host	Protection	Reference
<i>Argas polonicus</i>	LH	-	Larval homogenate	-	Pigeon	60% reduction in engorged larvae	Dusbábek et al., 1990
<i>Argas persicus</i>	DNA from eggs	-	-	-	Chicken	75% - 89% rejection of feeding ticks	Sayed et al., 2004
<i>O. erraticus</i>	Haemolymph	-	Soluble fraction of tissue extracts	-	Pig	No protection	Astigarraga et al., 1995
	Synganglion	-		-			
	Coxal glands	-		-			
	Midgut	-		-			
	GME	-	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	-	Pig	80% reduction in nymphs survival, 50% reduction in female feeding and fecundity	Manzano-Román et al., 2006
	GME	-	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	-	Mouse	67% and 29% reduction in nymphs and larvae survival, respectively	Manzano-Román et al., 2006
	Oe45	Not determined	Native protein, purified from midgut membranes	-	Pig	21% - 27% reduction in nymphs survival, 35% - 42% reduction in female feeding and fecundity	Manzano-Román et al., 2007
	rOeSub	<i>O. erraticus</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	22% reduction in oviposition	Manzano-Román et al., 2012b

	rOmSub	<i>O. moubata</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	24.3 % reduction in oviposition	
	OE1	<i>O. erraticus</i> subolesin	Synthetic peptides	Transcription factor	Rabbit	49% reduction in fecundity	Manzano-Román et al., 2015
	OE2	<i>O. erraticus</i> subolesin				82% reduction in fecundity	
	OM1	<i>O. moubata</i> subolesin				50% reduction in fecundity	
	OM2	<i>O. moubata</i> subolesin				17% reduction in fecundity	
	rtOm86	<i>O. moubata</i> Bm86-homologue	Recombinant	-	Rabbit	No protection	Obolo-Mvoulouga et al., 2018
	rtOm17	<i>O. moubata</i> Receptor expression-enhancing protein	Recombinant	Transmembrane transporter		35% reduction in fecundity (E = 37%)	
	OM99	<i>O. moubata</i> Protein NEF1, putative	Synthetic peptides	Protein N-linked glycosilation		21% reduction in female feeding and fecundity (E = 22%)	
	OM85	<i>O. moubata</i> transmembrane protein, putative		-		59% reduction in female feeding and fecundity (E = 60%)	
	OM03	<i>O. moubata</i> conserved hypothetical protein		-		65% reduction in female feeding and fecundity (E = 66%)	
	OeABC	<i>O. erraticus</i> ABC transporter	Synthetic peptides	Transmembrane transporter	Rabbit	3% reduction in female survival	Pérez-Sánchez et al., 2019a
	OeAQP	<i>O. erraticus</i> Aquaporin		Water channel		15% reduction in fecundity (E = 16%)	

	OeAQP1	<i>O. erraticus</i> Aquaporin 1		Water channel		15% reduction in fecundity (E = 16%)	
	OeSEL	<i>O. erraticus</i> Selenoprotein T		Defence against oxidative stress		48% reduction in female feeding and fecundity (E = 48%)	
	OeCHI	<i>O. erraticus</i> chitinase	Recombinant	glycoside hydrolase	Rabbit	30% reduction in nymphs moulting (E = 30%)	Perez-Sánchez et al., 2019b
	OeTSP1	<i>O. erraticus</i> Tetraspanin 1		Transmembrane protein, signalling, cell adhesion		25% reduction in nymph moulting and 42% reduction in female fecundity (E = 56%)	
	OeTSP2	<i>O. erraticus</i> Tetraspanin 2		Transmembrane protein, signalling, cell adhesion		25% reduction in nymph moulting and 42% reduction in female fecundity (E = 56%)	
	OeRPP0	<i>O. erraticus</i> 60S ribosomal protein P0		structural component of ribosome, protein synthesis		37% reduction in nymph moulting and 34% reduction in female fecundity (E = 58%)	
	OePK4	<i>O. erraticus</i> Secreted peptide PK 4		-		47% reduction in nymph moulting and 25% reduction in female fecundity (E = 58%)	
	OeTSP1 + OeTSP2 + OeRPP0 + OePK4	-	Multiantigen mix: recombinant and synthetic peptide	-		13% reduction in nymph survival and 60% female fecundity (E = 66%)	
<i>O. moubata</i>	Egg yolk protein	Vitellin	Native	Embryonic development	Rabbit	50% reduction in oviposition	Chinzei and Minoura, 1988

	GME	-	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	-	Mouse, rabbit, pig	40% reduction in female feeding and reproduction	García-Varas, 2004
	rOeSub	<i>O. erraticus</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	8.5 % reduction in oviposition	Manzano-Román et al., 2012b
	rOmSub	<i>O. moubata</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	5.2 % reduction in oviposition	
	OE1	<i>O. erraticus</i> subolesin	Synthetic peptides	Transcription factor	Rabbit	35% reduction in fecundity	Manzano-Román et al., 2015
	OE2	<i>O. erraticus</i> subolesin				40% reduction in fecundity	
	OM1	<i>O. moubata</i> subolesin				45% reduction in fecundity	
	OM2	<i>O. moubata</i> subolesin				60% reduction in fecundity	
	rtOm86	<i>O. moubata</i> Bm86-homologue	Recombinant	-	Rabbit	7% reduction in female survival (E = 7%)*	Obolo-Mvoulouga et al., 2018
	rtOm17	<i>O. moubata</i> Receptor expression-enhancing protein	Recombinant	Transmembrane transporter	Rabbit	3% reduction in female survival and 15% reduction in female fecundity (E = 19%)*	
	OM99	<i>O. moubata</i> Protein NEF1, putative	Synthetic peptides	Protein N-linked glycosilation	Rabbit	3% reduction in female survival and 8% reduction in female fecundity (E = 13%)*	
	OM85	<i>O. moubata</i> transmembrane protein, putative		-	Rabbit	39% reduction in female feeding and fecundity (E = 39%)*	

	OM03	<i>O. moubata</i> conserved hypothetical protein		-	Rabbit	4% reduction in female survival and 15% reduction in female fecundity (E = 18%)*	
	OeABC	<i>O. erraticus</i> ABC transporter	Synthetic peptides	Transmembrane transporter	Rabbit	22% reduction in female fecundity (E = 22%)*	Pérez-Sánchez et al., 2019a
	OeAQP	<i>O. erraticus</i> Aquaporin		Water channel		5% reduction female fecundity (E = 5%)*	
	OeAQP1	<i>O. erraticus</i> Aquaporin 1		Water channel		5% reduction female fecundity (E = 5%)*	
	OeSEL	<i>O. erraticus</i> Selenoprotein T		Defence against oxidative stress		10% reduction in female fecundity (E = 10%)*	
	OeCHI	<i>O. erraticus</i> chitinase	Recombinant	glycoside hydrolase	Rabbit	8% reduction in female feeding and 18% reduction in fecundity (E = 20%)*	Pérez-Sánchez et al., 2019b
	OeTSP1	<i>O. erraticus</i> Tetraspanin 1		Transmembrane protein, signalling, cell adhesion		7% reduction in nymph moulting and 6% in female fecundity (E = 11%)*	
	OeTSP2	<i>O. erraticus</i> Tetraspanin 2		Transmembrane protein, signalling, cell adhesion		7% reduction in nymph moulting and 6% in female fecundity (E = 11%)*	
	OeRPP0	<i>O. erraticus</i> 60S ribosomal protein P0		structural component of ribosome, protein synthesis		No protection	
	OePK4	<i>O. erraticus</i> Secreted peptide PK 4		-		13% reduction in nymph moulting and 6% reduction in female feeding (E = 8%)*	

	OeTSP1 + OeTSP2 + OeRPP0 + OePK4	-	Multiantigen mix: recombinant and synthetic peptide	-		26% reductions in female feeding and Reproduction (E = 26%)*	
<i>O. talaje</i>	Gut	-	Tissue extract	-	CD1 mouse	32% reduction in tick survival	Need and Butler, 1991
	Internal organs, not gut	-	Tissue extract	-	CD1 mouse	27% reduction in tick survival	
<i>O. turicata</i>	Gut	-	Tissue extract	-	CD1 mouse	No protection	Need and Butler, 1991
	Internal organs, not gut	-	Tissue extract	-	CD1 mouse	No protection	

*La eficacia vacunal (E) fue calculada como $E = 100 (1 - (S \times F \times N \times M))$, donde **S** y **F** representan, respectivamente, la reducción en las tasas de supervivencia y fertilidad de las hembras alimentadas en los animales vacunados respecto de las alimentadas en los animales control, y **N** y **M** representan la reducción en las tasas de supervivencia y muda de la ninfas alimentadas en los animales vacunados respecto de las alimentadas en los animales control.

Tabla 1.2. Ensayos de vacunación frente a argásidos utilizando **antígenos salivales**. Extraída de Díaz-Martín et al. (2015b) y actualizada por Obolo-Mvoulouga (2017). No se han descrito nuevos antígenos salivales protectores en argásidos hasta la fecha.

Species	Antigen name	Protein identity	Antigen type	Protein function	Host	Protection	Reference
<i>Argas polonicus</i>	SGE	-	Salivary gland extract	-	Pigeon	No protection	Dusbábek et al., 1990
<i>Argas persicus</i>	SGE	-	Salivary gland extract	-	Chicken	58% - 62% rejection of feeding ticks	Sayed et al., 2001, 2004
<i>O. erraticus</i>	SGE	-	Salivary gland extract	-	Pig	Variable, < 50% reduction in female feeding and fecundity	Astigarraga et al., 1995
	70 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	No protection	Manzano-Román, 2002
	50 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	No protection	
	20 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	Up to 50% reduction in female feeding and fecundity	
<i>O. moubata</i>	SGE	-	Salivary gland extract	-	Pig	60% - 70 % reduction in female feeding and fecundity	Astigarraga et al., 1995
	Om44	-	Native	P-selectin antagonist	Pig Rabbit	54% reduction in tick feeding, 50% reduction in female fecundity	García-Varas et al., 2010
	OmC2	Cystatin	Recombinant	Peptidase inhibitor	C3H/HeN mouse	39% reduction in nymph-1 feeding, 15% increase in	Salat et al., 2010

						nymph-1 mortality	
	rOmENO	Enolase	Recombinant	Glycolytic enzyme	Rabbit	18% reduction in female fecundity, 20% increase in nymphal mortality	Díaz-Martín et al., 2013b
	rOmPLA2	Phospholipase A ₂	Recombinant	Anti-haemostatic	Rabbit	23% reduction in female fertility, 11% - 32% increase in tick mortality (E = 44.2%) ^a	Díaz-Martín et al., 2015a
	rOmAPY	Apyrase	Recombinant	Anti-platelet aggregation		26% reduction in female fertility, 16% increase in adult mortality (E = 27.2%) ^a	
	rOmMOU	Mougrin	Recombinant	Disaggregin		32% reduction in female fecundity (E = 43.2%) ^a	
	rOmPLA2+ rOmAPY+ rOmMOU		Multiantigen mix: recombinant	Anti-haemostatics		(E = 50% first infestation; E = 60% second infestation)	
	rOmTSGP4	Tick salivary gland protein 4	Recombinant	Lipocalin, cysteinyl leucotriene scavenger		(E = 14% reduction in female survival and fertility)	
<i>O. talaje</i>	SGE	-	Salivary gland extract	-	CD1 mouse	19% reduction in larvae survival	Need and Butler, 1991

*La eficacia vacunal (E) fue calculada como $E = 100 (1 - (S \times F \times N \times M))$, donde **S** y **F** representan, respectivamente, la reducción en las tasas de supervivencia y fertilidad de las hembras alimentadas en los animales vacunados respecto de las alimentadas en los animales control, y **N** y **M** representan la reducción en las tasas de supervivencia y muda de la ninfas alimentadas en los animales vacunados respecto de las alimentadas en los animales control.

Hipótesis y Objetivos

El argásido *Ornithodoros erraticus* se distribuye por la Península Ibérica, el Norte de África y Oriente Medio, donde transmite el virus de la Peste porcina africana (PPA) y dos espiroquetas productoras de Fiebre recurrente humana (*Borrelia hispanica* y *Borrelia crocidurae*).

La presencia de *O. erraticus* en entornos domésticos y peridomésticos favorece la persistencia de ambas enfermedades en las zonas endémicas, supone un riesgo constante de propagación hacia otras regiones y, en el caso de la PPA, incrementa el peligro de reintroducción en países donde ha sido erradicada, como España y Portugal.

La prevención y control de dichas enfermedades requiere la eliminación de las poblaciones sinantrópicas de *O. erraticus*. La aplicación de acaricidas como método de lucha frente a este argásido resulta ineficaz y, por tanto, se necesitan métodos alternativos de control, y el más prometedor son las vacunas anti-garrapata.

Estas vacunas tienen como objetivo inducir en los hospedadores una respuesta inmunitaria humoral frente a determinadas proteínas antigénicas de la garrapata, de manera que cuando la garrapata se alimente sobre un hospedador vacunado, los anticuerpos ingeridos con la sangre neutralicen la función de las proteínas diana y produzcan daños significativos al parásito, que pueden ir desde el bloqueo de su alimentación y reproducción hasta la muerte de la garrapata.

En el desarrollo de vacunas anti-garrapata el primer paso, y el reto más importante, es la identificación de antígenos protectores. Una forma de abordar esta tarea es seleccionar candidatos antigénicos que realicen funciones biológicas vitales para las garrapatas y que compartan motivos funcionales y estructurales con sus ortólogos en otras especies de garrapatas, lo que facilitaría la protección cruzada y el control simultáneo de dichas especies.

Las glándulas salivales y el intestino medio de las garrapatas son compartimentos esenciales de la interfase hospedador-garrapata-patógeno y en ellos se expresan proteínas específicamente desarrolladas por las garrapatas para adaptarse a su estilo de vida estrictamente hematófago. Las glándulas salivales producen la saliva, que contiene proteínas que neutralizan las respuestas defensivas del hospedador permitiendo la ingestión de sangre, mientras que el intestino expresa proteínas que llevan a cabo la digestión de la sangre, el transporte y metabolismo de los nutrientes, la gestión de los residuos tóxicos y la respuesta al estrés oxidativo, secundario a la digestión. Por tanto, estas proteínas desempeñan funciones clave para la fisiología de la garrapata y la transmisión de patógenos, lo que las convierte en potenciales candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata.

Teniendo esto en cuenta, en investigaciones anteriores nuestro grupo emprendió la búsqueda de antígenos protectores en el intestino medio de *O. erraticus* aplicando una estrategia vacunómica en la que, primero, se obtuvieron el transcriptoma y el proteoma de este órgano antes y después de la alimentación y, a partir de la integración y análisis de esos datos ómicos, se hizo una selección *in silico* de candidatos antigénicos que cumplieran una serie de criterios basados en hipótesis, incluyendo la sobreexpresión en respuesta a la ingestión de sangre, la predicción de antigenicidad, ser fácilmente accesibles a los anticuerpos y tener una función biológica relevante. Los candidatos seleccionados se produjeron en forma recombinante

y su eficacia protectora se evaluó en ensayos de vacunación de conejos. De este modo se validaron cuatro antígenos protectores cuya eficacia protectora individual frente a *O. erraticus* estuvo entre el 47% y el 58%, mientras que su eficacia conjunta, administrados como una vacuna coctel, alcanzó el 66% frente a *O. erraticus* y un 26% frente a *O. moubata*, confirmando simultáneamente la hipótesis de la mayor eficacia de las vacunas multiantigénicas y la hipótesis de protección cruzada entre especies.

Estos antecedentes permiten suponer que el desarrollo de vacunas multiantigénicas más amplias, en las que se combinen **antígenos intestinales protectores** con **antígenos salivales protectores**, pueden proporcionar una protección más completa frente a *O. erraticus*, ya que al anular la función de varias proteínas diana en órganos y procesos biológicos distintos, cabe esperar que la garrapata experimente efectos deletéreos sinérgicos, o al menos acumulativos.

Para poder desarrollar dichas vacunas multiantigénicas es necesaria y urgente la **identificación de antígenos salivales protectores** en *O. erraticus*. En esta especie, como en el resto de los argásidos, debido a su estrategia de alimentación rápida, es necesario que las moléculas salivales bioactivas que facilitan la ingestión de la sangre ya estén sintetizadas, almacenadas en gránulos en las células salivales y dispuestas para ser secretadas en la saliva antes de que las garrapatas accedan al hospedador. Tras la alimentación, los ejemplares de *O. erraticus* deben resintetizar y reponer las proteínas bioactivas consumidas durante la alimentación a fin de poder repetir un nuevo ciclo trofogónico.

En este contexto, se puede asumir que, de todos los transcritos salivales, los sobreexpresados entre dos alimentaciones consecutivas son los que codifican las proteínas bioactivas consumidas, necesarias para completar la ingestión de sangre, y, por lo tanto, son potenciales dianas antigénicas para el desarrollo de vacunas anti-*O. erraticus*.

Dado que el genoma de *O. erraticus* no está secuenciado y que se desconoce casi por completo su sialoma (sialotranscriptoma + el proteoma de su saliva), en la presente tesis doctoral nos propusimos como **OBJETIVOS GENERALES**: (i) la obtención del sialoma (transcriptoma y proteoma salival) de *O. erraticus*, el análisis de la expresión génica salival a lo largo del ciclo trofogónico y la caracterización de los genes sobreexpresados después de la alimentación; (ii) la identificación de antígenos salivales protectores mediante una estrategia vacunómica incluyendo la validación de los candidatos en pruebas de inmunización de animales; y (iii) el diseño y validación de una vacuna multiantigénica anti-*Ornithodoros* basada en la combinación de antígenos protectores salivales e intestinales.

La consecución de dichos objetivos generales se planteó a través de los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Obtención del sialotranscriptoma de hembras de *O. erraticus* por RNA-seq y análisis de la expresión génica diferencial en tres puntos de su ciclo trofogónico: antes de la alimentación y a los 7 y 14 días post-alimentación.
2. Obtención del proteoma de la saliva (sialoproteoma) de hembras y machos de *O. erraticus* y análisis diferencial entre sexos: cualitativo, cuantitativo y funcional.

3. Integración de los datos ómicos y selección *in silico* de antígenos salivales potencialmente protectores basándonos en criterios como la sobreexpresión tras la alimentación, antigenicidad y anotación funcional relevante. Caracterización molecular de los candidatos seleccionados y producción en forma recombinante.
4. Evaluación de la eficacia protectora individual y conjunta de los candidatos salivales frente a *O. erraticus* y *O. moubata* en animales de experimentación (conejos) y validación, en su caso, como antígenos protectores. Adicionalmente, formulación de vacunas multiantigénicas combinando antígenos protectores salivales e intestinales y evaluación de su eficacia protectora en animales de experimentación.

Material y Métodos

MATERIAL PARASITARIO Y MÉTODOS GENERALES.

1. HOSPEDADORES.

Se han utilizado 36 conejos de raza *New Zealand White*. Los animales, todas hembras y de 1,5 kg de peso al inicio del estudio, se mantuvieron en el animalario del IRNASA (Nº de Registro, P.A.E.-SA.002, ES372740000043) alimentados *ad libitum* con pienso específico para conejos de esa edad (Campercuni de Nanta).

Estos animales se emplearon para el mantenimiento de las colonias de garrapatas (9 animales) y para los ensayos de vacunación que se describen posteriormente (27 animales).

Todos los procedimientos en los que se utilizaron estos conejos cumplían con la correspondiente legislación europea (Directiva 2010/63/EU) y la norma estatal en materia de experimentación con animales (Reales Decretos 1201/2005 y 53/2013, Orden ECC/566/2015), y contaron con la evaluación favorable del Comité de Ética del CSIC y la autorización de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León.

2. PARÁSITOS.

Los ejemplares de *Ornithodoros erraticus* y *Ornithodoros moubata* utilizados en el presente trabajo proceden de dos colonias de laboratorio mantenidas en el insectario del IRNASA (CSIC). La colonia de *O. erraticus* se originó a partir de especímenes capturados en Sanchón de la Ribera (41° 5' 0" N, 6° 25' 0" O), provincia de Salamanca (España). La colonia de *O. moubata* se inició a partir de especímenes proporcionados por el Instituto de Salud Animal de Pirbright (Surrey, Reino Unido), los cuales procedían originalmente de Malawi (13° 59' 00" S 33° 47' 00" E). Ambas colonias se mantienen en cámara de cultivo a 28 °C con 85% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad, alimentándolas regularmente sobre conejos.

3. MATERIAL PARASITARIO.

3.1. Glándulas salivales.

Se han utilizado glándulas salivales de hembras de *O. erraticus* obtenidas a partir de ejemplares en ayunas (tiempo 0), y a los 7 y 14 días tras la alimentación. Para su obtención, las garrapatas se diseccionaron en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4 a 4 °C, tratado con dietil pirocarbonato (DEPC) al 1%. Una vez extraídas, las glándulas se lavaron en este mismo medio y se depositaron inmediatamente en RNAlater (Sigma) para preservar la integridad del RNA.

El RNA de las glándulas salivales se utilizó para la obtención de los correspondientes transcriptomas y como material de partida para la síntesis y posterior clonaje de los cDNAs codificantes de los candidatos vacunales seleccionados. Los procedimientos para cada uno de estos usos se detallan específicamente en el objetivo correspondiente.

3.2. Saliva.

Se obtuvieron muestras de saliva de ambas especies, *O. moubata* y *O. erraticus*, mediante la estimulación de su secreción con pilocarpina siguiendo el protocolo descrito por Díaz-Martín

et al. (2013) con algunas modificaciones. En primer lugar, las garrapatas fueron lavadas mediante inmersiones sucesivas en agua corriente, peróxido de hidrógeno al 3%, dos lavados en agua destilada, etanol al 70% y dos lavados finales en agua destilada. A continuación, las garrapatas se secaron e inmovilizaron en posición ventral sobre una placa de vidrio mediante cinta adhesiva de doble cara en grupos de cinco individuos. A cada ejemplar se administró una solución de clorhidrato de pilocarpina (Sigma) al 1% en PBS utilizando una jeringuilla Hamilton de 5 µL con aguja de calibre 33 y 25 mm de longitud. A las hembras se les administró 1 µL de pilocarpina 1% a través del poro genital, mientras que los machos recibieron 0,5 µL de pilocarpina 1% a través del poro anal. Poco después de la estimulación, las garrapatas comenzaron a mover sus quelíceros y a emitir pequeñas gotas de saliva clara y viscosa. Para recolectar las gotas de saliva, se colocaba 1 µl de PBS sobre las piezas bucales de la garrapata, que era inmediatamente recogido y depositado sobre 50 µl de PBS enfriado con hielo. La saliva se recolectó continuamente durante 15-20 minutos después de la estimulación. Finalmente, las muestras de saliva se centrifugaron durante 20 min a 12.000 g y 4 °C, tras lo cual se recuperaron los sobrenadantes. La concentración de proteínas en las muestras se midió mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad) y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.3. Intestino medio.

Se han utilizado muestras de intestino medio de hembras de *O. erraticus* y *O. moubata* tomadas de ejemplares en ayunas y a las 48 horas después de su alimentación. Para obtenerlas, las garrapatas se diseccionaron en PBS pH 7,4 a 4 °C y los intestinos se extrajeron y lavaron exhaustivamente en PBS para eliminar la sangre y los restos de la digestión. Estos tejidos se emplearon para la preparación de extractos proteicos de intestino medio según el protocolo descrito por Oleaga et al. (2015). Brevemente, se partió de lotes de 25 intestinos de cada especie y cada condición fisiológica, y los tejidos se homogeneizaron y se sonicaron en PBS pH 7,4 a 4 °C complementado con inhibidores de proteinasas (Roche Diagnostics). A continuación, los homogenizados de tejido se centrifugaron a 10⁴ g para sedimentar los restos de partículas y tras ello se recuperaron los sobrenadantes. La concentración proteica de estos extractos se evaluó utilizando el kit BCA Protein Assay Reagent (Thermo-Fisher) y los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS E INMUNOENZIMÁTICAS.

Las técnicas de rutina empleadas para el análisis de proteínas han sido la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y el western blot. Los protocolos y las condiciones generales de estas técnicas se describen a continuación y en los apartados correspondientes las condiciones particulares en las que se efectuaron.

4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Esta técnica se ha utilizado como método analítico, empleando minigeles de 5 x 9 cm. Se utilizó un sistema discontinuo, similar al descrito por Laemmli (1970), en el que la concentración del gel de carga fue del 3% y la del gel separador del 12% o en gradiente del 5% al 20%. Inmediatamente antes de ser cargadas, las muestras se hirvieron durante cinco minutos en tampón desnaturizante (TRIS-HCl 31,25 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerina 10% y 2-mercaptoetanol 5%). Los geles se cargaron con 5-10 µg de proteína por pocillo y las electroforesis se efectuaron

a 30-45 mA/gel. Una vez completadas, las proteínas resueltas en los geles fueron teñidas con distintos colorantes o bien transferidas a membranas de nitrocelulosa.

Como referencia para la valoración de los pesos moleculares, en cada gel se cargó también una mezcla de proteínas marcadoras tratadas de igual modo que el resto de las muestras: Unstained Protein MW Marker (Thermo) en los geles destinados a ser teñidos, o bien Precision Plus Protein™ Dual color Standards (Bio-Rad) en los geles destinados a ser transferidos a nitrocelulosa.

4.2. Tinción de los geles.

Como método de rutina, la tinción se realizó con azul de Coomassie o con nitrato de plata siguiendo los protocolos descritos por Morrissey (1981). Tras la tinción de los geles, estos fueron escaneados y digitalizados utilizando el ChemiDoc XRS+ Imaging System y el software Image Lab (Bio-Rad).

4.3. Western blot.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin et al. (1979). Las transferencias se realizaron a 400 mA y 4 °C durante 90 minutos en tampón TRIS 25 mM, glicina 192 mM, pH 8. Las membranas se lavaron en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 1 hora a 37 °C. Tras 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente en PBS con Tween 20 al 0,05% (TPBS), las membranas se incubaron con el primer anticuerpo diluido en TPBS durante 1 hora a 37 °C. Tras 3 nuevos lavados, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, diluido en TPBS, durante 1 hora a 37 °C, y se revelaron con un sustrato colorimétrico (4-cloro-naftol) o luminiscente (luminol). Al igual que los geles, las membranas fueron escaneadas y digitalizadas utilizando el ChemiDoc XRS+ Imaging System y el software Image Lab (Bio-Rad).

OBJETIVO 1.**OBTENCION DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS GLANDULAS SALIVALES DE HEMBRAS DE *O. erraticus* Y ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A LO LARGO DEL CICLO TROFOGÓNICO.**

Para llevar a cabo este objetivo se extrajeron las glándulas salivales de hembras de *O. erraticus*, de 3 meses de edad, en 3 estados fisiológicos diferentes: antes de su alimentación (ayunas) y a los 7 y 14 días post-alimentación. Estos puntos de muestreo fueron seleccionados como puntos intermedios del ciclo trofogónico de las hembras *O. erraticus*, el cual tiene una duración de unos 28 días, desde la alimentación hasta la oviposición, en las condiciones del laboratorio. Para cada estado fisiológico, se recogieron dos muestras de 50 pares de glándulas salivales cada una.

1.1.Extracción de RNA, construcción de genotecas y secuenciación.

La preparación de las genotecas y su secuenciación se llevó a cabo en el servicio de genómica de la fundación Parque Científico de Madrid (España) (<https://fpcm.es/en/servicios-cientificos/>).

Las seis muestras de glándulas salivales (dos replicas biológicas de cada uno de los tres estados fisiológicos anteriormente citados) se procesaron según el protocolo descrito por Oleaga et al. (2021a). Inicialmente, los tejidos se lisaron y homogenizaron empleando el kit TissueLyser II (Qiagen). A continuación, se extrajo el RNA total con el Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los posibles restos de DNA contaminante se eliminaron tratando las muestras con Turbo DNase-free (Ambion). La calidad y concentración del RNA se evaluó midiendo el *RNA integrity number* (RIN) en un Bioanalizador 2100 (Agilent), que proporcionó valores entre 8,1 y 9,7 para las 6 muestras, siempre dentro del rango de calidad recomendado.

A partir de 1 µg de cada uno de estos RNA totales se purificaron los correspondientes mRNA polyA+ usando el NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (Biolabs) y, acto seguido, se prepararon las correspondientes bibliotecas con el NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs) de acuerdo con el protocolo estándar. El tiempo de fragmentación se fijó en 10 minutos para obtener fragmentos de mRNA más largos (en torno a 500 pb) con el objetivo de facilitar el ensamblaje de las lecturas. Las 6 genotecas resultantes fueron analizadas y cuantificadas en el Bioanalizador 2100 (Agilent).

Las bibliotecas se titularon mediante PCR cuantitativa usando el kit Kapa-SYBR FAST qPCR para LightCycler480 (Kapa Biosystems) y un estándar de referencia para la cuantificación. A continuación, se mezclaron en proporción equimolecular y se cargaron en el cartucho de secuenciación NextSeq v2.5 (Illumina) empleando el kit NextSeq 500 High Output Kit v2.5 (Illumina). La secuenciación se llevó a cabo en el secuenciador NextSeq 500 (Illumina) en lecturas de 150 nucleótidos en ambos sentidos (2x).

1.2. Pre-procesamiento y ensamblaje *de novo* del transcriptoma.

El procesado informático de las secuencias, su anotación, caracterización funcional y análisis de expresión diferencial fue realizado por la empresa Biotechvana del Parque Científico de la Universidad de Valencia (<https://www.biotechvana.com/>).

Los protocolos para el pre-procesamiento, ensamblaje *de novo*, la anotación y el análisis de expresión diferencial se ejecutaron utilizando las herramientas DeNovoSeq y de RNAseq de la plataforma GPRO desarrollada por la empresa Biotechvana (<https://gpro.biotechvana.com/>) (Futami et al., 2011).

En todas las muestras, las lecturas de secuencia se transformaron en archivos FastQ y fueron sometidas a control de calidad con la herramienta FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), estableciendo como umbral de calidad de las bases una puntuación PHRED superior a 30. Los archivos FastQ de longitud superior a 100 nucleótidos con menos del 5% de indeterminación en su secuencia fueron filtrados y seleccionados. A continuación, usando la herramienta Prinseq (Schmieder et al., 2011), se eliminaron los adaptadores añadidos durante la secuenciación y los datos de baja calidad, básicamente los primeros 10 nucleótidos de la lectura.

El transcriptoma de cada muestra se ensambló *de novo* usando el programa Oases (Schulz et al., 2012), aplicando un rango de k-mer de 57 a 67. Posteriormente, utilizando la herramienta Minimus2 del paquete de Amos (Sommer et al., 2007) se obtuvo el transcriptoma combinado para cada estado fisiológico, así como el transcriptoma consenso de las seis muestras. Los transcritos redundantes con una similitud de secuencia superior al 95% fueron eliminados usando la herramienta CD-HIT (Fu et al., 2012).

1.3. Anotación y caracterización del transcriptoma.

La identificación de las secuencias codificantes del transcriptoma consenso se llevó a cabo con las herramientas ORFPredictor (Min et al., 2005) y SeqEditor (Hafez et al., 2020). Únicamente se seleccionaron para su posterior anotación las secuencias con un nivel de expresión superior a 1 Read Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads (RPKM) y con marcos de lectura abiertos (ORF) superiores a 240 pares de bases desde el ATG hasta el codón de parada.

La anotación se realizó utilizando los programas BLASTx y BLASTn del paquete NCBI BLAST estableciendo un valor de $e < 10^{-05}$ como umbral de corte. La búsqueda/alineamiento se llevó a cabo en tres bases de datos:

- Base de datos de secuencias no redundantes del **NCBI (nr)** restringido a artrópodos (Altschul et al., 1990; Sayers et al., 2019),
- **Swiss-Prot** (Uniprot Consortium, 2019)
- **Genoma de *Ixodes scapularis*** obtenido del portal Ensembl (<https://ensemblgenomes.org/>) (Howe et al., 2020).

Para ello, las secuencias seleccionadas en estas bases de datos (21 de noviembre de 2019) fueron descargadas y combinadas en una base de datos personalizada que contenía 8.048.569 secuencias.

Las secuencias de nucleótidos codificantes fueron traducidas a secuencias de aminoácidos con el software ORFPredictor (Min et al., 2005) y los polipéptidos resultantes se caracterizaron/anotaron de la siguiente manera:

- (i) Caracterización funcional, la cual se basó en:
 - La identificación de dominios proteicos conservados incluidos en la base de datos Uniprot y de familias de proteínas incluidas en la base de datos de Interpro (Finn et al., 2017) según los términos Pfam (El-Gebali et al., 2019).
 - La asignación de términos de Gene Ontology (GO) (Gene Ontology Consortium, 2015) relativos a las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular. Para ello se ha utilizado la herramienta Worksheet de la plataforma GPRO.
 - El análisis de sus rutas metabólicas en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2000) usando los códigos enzimáticos (EC) asociados a términos GO funcionales.
- (ii) Caracterización topológica, que incluyó la detección/predicción de:
 - Dominios transmembrana con el programa TMHMM (Krogh et al., 2001).
 - Anclajes tipo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) con la herramienta PredGPI (Pierloni et al., 2008).
 - Péptido señal utilizando la herramienta SignalP-5.0 (Almagro et al., 2019).
- (iii) Predicción de antigenicidad con el programa Vaxijen 2.0 (Doytchinova et al., 2007b) estableciendo un valor de 0,5 como umbral de corte por defecto para antígenos parasitarios.

La caracterización topológica y la predicción de antigenicidad únicamente se llevaron a cabo en los transcritos anotados.

La integridad del transcriptoma consenso de las glándulas salivales de *O. erraticus* se evaluó utilizando la herramienta BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) comparando dicho transcriptoma con un conjunto de genes altamente conservados, ortólogos de proteínas bien conocidas de la clase Arachnida (arachnida_odb10, fecha de creación: 05-08-2020; número de especies: 10; número de BUSCOs: 2.934) (Simao et al., 2015).

1.4. Análisis de expresión diferencial a lo largo del ciclo trofogónico.

Para el análisis de la expresión génica diferencial entre los tres estados fisiológicos comparados, en primer lugar, se llevó a cabo el alineamiento de las lecturas crudas de cada genoteca frente al transcriptoma consenso utilizando la herramienta Bowtie2 (Langmead et al., 2012).

A continuación, se empleó el software Corset (Davidson et al., 2014) para agrupar jerárquicamente los transcritos cortos en genes más largos facilitando su cuantificación y análisis posterior. Los datos del recuento de lecturas por grupo de transcritos se incorporaron al paquete EdgeR (Robinson et al., 2010) y se utilizaron para realizar el análisis de expresión diferencial entre los transcriptomas de las glándulas salivales en los tres estados fisiológicos analizados. En concreto se llevaron a cabo tres comparaciones: 7 días post alimentación *versus* no alimentadas

(7 vs. 0); 14 días post alimentación *versus* 7 días post alimentación (14 vs. 7) y 14 días post-alimentación *versus* no alimentadas (14 vs. 0).

Para hacer estas comparaciones se utilizó el método de Benjamini- Hochberg (Benjamini et al., 1995). Se consideró que un gen estaba diferencialmente expresado cuando el $\log_2$ de su cambio de nivel de expresión (*fold-change*, $\log_2$ FC) mostraba valores ≥ 1 ó ≤ -1 y un valor de p ajustado menor de 0,05. La significación estadística del cambio de expresión se estimó fijando un *False Discovery Rate* inferior a 0,05 ($FDR < 0,05$).

1.5. Análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas y de términos GO

En los transcritos diferencialmente expresados se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO y de rutas metabólicas utilizando para ello el paquete GSeq (Young et al., 2010). El análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas se llevó a cabo utilizando la base de datos KEGG y la de términos GO la base de datos de Gene Ontology. Se consideraron significativamente enriquecidos los términos GO y las rutas metabólicas que mostraron valores de p ajustados $< 0,05$.

1.6. Disponibilidad de datos

Los datos transcriptómicos generados en este estudio fueron depositados en el National Institute for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>) con el nombre BioProject ID PRJNA666995 y los siguientes códigos de acceso a las 6 muestras biológicas: SAMN16339901, SAMN16339902, SAMN16339903, SAMN16339904, SAMN16339905, SAMN16339906. El Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) resultante ha sido depositado en DDBJ/ EMBL/GenBank con el registro GIXX00000000. La versión que se describe en esta tesis es la primera versión, GIXX01000000, y contiene las secuencias GIXX01000001 a GIXX01018959.

OBJETIVO 2.

OBTENCIÓN DEL PROTEOMA DE LA SALIVA DE HEMBRAS Y MACHOS DE *O. ERRATICUS* Y ANÁLISIS DIFERENCIAL ENTRE SEXOS: CUALITATIVO, CUANTITATIVO Y FUNCIONAL.

Para alcanzar este objetivo se utilizó una estrategia “Proteómica Informada por Transcriptómica” (*Proteomics informed by Transcriptomics*, PIT). En ella se analizaron muestras de saliva de hembras y machos por separado utilizando el sialotranscriptoma de *O. erraticus* obtenido en el objetivo anterior como base de datos de referencia y dos técnicas distintas de espectrometría de masas: (i) cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ejecutada en modo de adquisición dependiente de datos (*Data Dependent Acquisition*, DDA) y (ii) espectrometría de masas basada en la adquisición secuencial de todos los espectros de masas teóricos (*Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*, SWATH-MS), que opera en modo independiente de datos (*Data independent Acquisition*, DIA).

2.1. Obtención de muestras de saliva de hembras y machos de *O. erraticus*.

Utilizando el procedimiento de estimulación de la secreción con pilocarpina descrito en el apartado 3.2. de Métodos Generales, se prepararon tres muestras replicadas de saliva de cada sexo. Las muestras de saliva de hembras (*Female*, F1, F2, F3) se prepararon a partir de 20 hembras por muestra y las de los machos (*Male*, M1, M2, M3) a partir de 30 ejemplares por muestra. Se procesó un mayor número de machos debido a que este sexo es de menor tamaño y emite menos cantidad de saliva.

Tras cuantificar la concentración proteica de las muestras de saliva, se examinó su composición y reproducibilidad para cada sexo mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida en gradiente de 5%-20% teñidos con plata.

2.2. Digestión proteica y preparación de las muestras.

La digestión con tripsina y los análisis proteómicos de las muestras se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, que es miembro de la Plataforma de Proteómica ISCIII ProteoRed.

En primer lugar, se llevó a cabo la digestión con tripsina (Promega) de las proteínas salivales en disolución. Para ello, alícuotas de 10 µg de cada muestra de saliva (F1, F2, F3, M1, M2, M3) se redujeron mediante incubación con 10 mM de ditioneitol (DTT) en un volumen total de 100 µl de bicarbonato amónico 50 mM durante 20 minutos a 60 °C. Las proteínas se alquilaron con 5,5 mM de yodoacetamida en un volumen final de 110 µL de bicarbonato amónico 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El exceso de yodoacetamida se neutralizó añadiendo 100 µL de DTT 20 mM en bicarbonato amónico 50 mM e incubando la solución durante 1 hora a 37 °C. A continuación, cada muestra se trató con 400 ng de tripsina en un volumen final de 218 µl y se incubó durante toda la noche a 37 °C. La digestión se detuvo con 20 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 10% en agua. Las mezclas se secaron en un evaporador rotatorio y se disolvieron en un volumen final de 40 µL de bicarbonato amónico 50 mM.

En paralelo, una mezcla de las muestras de saliva de hembras (F1 + F2 + F3) se sometió a digestión en gel siguiendo el protocolo de Shevchenko et al. (1996). De forma resumida, 20 µg de la mezcla se resolvieron mediante SDS-PAGE en un gel en gradiente 5% - 20% y se tiñeron con azul de Coomassie. El carril correspondiente se cortó en tres piezas en función del tamaño de las bandas de proteínas: la pieza 1 (*slice* 1, S1) contenía bandas de 300 a 100 kDa; pieza 2 (S2), bandas de 100 a 25 kDa; y pieza 3 (S3), bandas de 25 a 10 kDa. Las 3 piezas de gel se redujeron con DTT, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron con 20 ng/µL de tripsina durante toda la noche a 37 °C. La digestión se detuvo añadiendo TFA al 10% hasta una concentración final de 0,1% y los sobrenadantes de la digestión se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm y se secaron por centrifugación al vacío. Los pellets que contenían los péptidos digeridos se resuspendieron en 11 µL (S1 y S3) ó 6 µL (S2) de 2% de acetonitrilo con 0,1% de TFA.

2.3. LC-MS/MS.

Los péptidos recuperados de las digestiones con tripsina se separaron mediante cromatografía líquida (LC) empleando el sistema NanoLC 425 LC (Eksigent Technologies LC) y se analizaron en un espectrómetro de masas microESI qTOF (sistema TripleTOF 6600+ de AB Sciex).

Las muestras de saliva digeridas en disolución se analizaron por separado para cada sexo. Con ese fin, se prepararon dos mezclas distintas: una contenía 2 µL de cada muestra de saliva digerida de hembras (F1, F2, F3) y la otra 2 µL de cada muestra de saliva digerida de machos (M1, M2, M3). De cada una de estas mezclas se cargaron 5 µL en una columna trampa (3 µm; C18-CL; 120 Å; 350 µm × 0,5 mm; Eksigent Technologies) y se desalaron con TFA al 0,1% a una tasa de flujo de 5 µL/min durante 5 minutos. A continuación, los péptidos se cargaron en una columna analítica (3 µm; C18-CL; 120 Å; 0,075 × 150 mm; Eksigent Technologies), se equilibraron con acetonitrilo (ACN) al 5% y ácido fórmico (FA) al 0,1% y se eluyeron usando un gradiente lineal 7% - 40% de tampón B (0,1% FA en ACN) en tampón A (FA al 0,1% en agua) durante 45 minutos a 300 nL/min.

Los péptidos eluidos se ionizaron en un sistema OptiFlow Turbo Ion Source (Sciex) (< 1 µL Nano) aplicando un voltaje de 3,0 kV al emisor de aerosol y el analizador tripleTOF se operó en modo de adquisición dependiente de datos (DDA). Los espectros de masas del primer barrido (MS1) se adquirieron en un rango de 350–1400 masa/carga (m/z) durante 250 ms en modo ión positivo y se seleccionaron los 100 iones más intensos para la fragmentación. Los espectros MS2 se adquirieron en un rango de 100-1500 m/z durante 25 ms en modo de alta sensibilidad.

El análisis de las muestras de saliva de hembras digerida en gel se llevó a cabo a partir de alícuotas de 5 µL del digerido de cada pieza de gel (S1, S2, S3). El análisis fue similar al que acabamos de describir para las muestras digeridas en disolución, pero en carreras LC-MS/MS de 20 minutos.

2.4. SWATH-MS.

La adquisición de datos SWATH-MS de las seis muestras individuales de saliva de machos y hembras se realizó con el mismo espectrómetro de masas microESI qTOF utilizado para la LC-MS/MS (sistema TripleTOF 6600+; AB Sciex LLC), pero operado en modo SWATH. Las seis muestras (F1, F2, F3, M1, M2, M3) se cargaron en un orden aleatorio para evitar sesgos en el análisis.

Alícuotas de 5 µL del digerido de cada muestra fueron cargadas individualmente en una columna trampa (columna LC; 12 nm; 3 µm; Triart-C18; 0,5 × 5,0 mm; YMC Co.) y desaladas con TFA al 0,1% a una tasa de flujo de 10 µL/min durante 5 min. Posteriormente, los péptidos se cargaron en una columna analítica (LC columna; Luna Omega; 3 micras; Polar C18; 150 × 0,3 mm; Phenomenex), se equilibraron con ACN al 3% y FA al 0,1% y se eluyeron en un gradiente lineal 3% – 35% de tampón B (FA al 0,1% en ACN) en tampón A (FA al 0,1% en agua) durante 45 minutos a 5 µL/min. Las muestras se ionizaron en un sistema OptiFlow Turbo Ion Source (1–50 µL, micro), aplicando 4,5 kV al emisor de aerosol y el análisis se llevó a cabo en modo de adquisición independiente de datos (DIA). Los escaneos MS1 se adquirieron desde 400 a 1250 m/z durante 250 ms, seguidos por barridos de iones producto de 25 ms desde 100 a 1500 m/z en modo de alta sensibilidad a lo largo de 100 ventanas secuenciales cubriendo de 400 a 1250 m/z.

2.5. Identificación y cuantificación de las proteínas.

Los archivos de datos SCIEX.wiff obtenidos por LC-MS/MS se procesaron utilizando el motor de búsqueda ProteinPilot v5.0 (AB Sciex LLC). Los tres archivos SCIEX.wiff obtenidos en el análisis por LC-MS/MS de las tres piezas de gel (S1, S2, S3) que contenían el pool de saliva de hembras digerida en gel se combinaron en una búsqueda única.

La búsqueda e identificación proteica se llevó a cabo utilizando el algoritmo Paragon de ProteinPilot (Shilov et al., 2007) y la base de datos de proteínas derivada del sialotranscriptoma de glándulas salivales de *O. erraticus* obtenido en el objetivo anterior, que incluía 102.625 proteínas teóricas, 22.007 de ellas de gran fiabilidad y 18.959 con anotación funcional (BioProject ID: PRJNA666995). Los ajustes en estas búsquedas incluyeron especificidad para tripsina y cis-alquilación con yodoacetamida.

Las proteínas identificadas se agruparon basándose en sus espectros MS/MS mediante el algoritmo ProteinPilot Pro Group™, tomando como proteína principal de cada grupo la que podía explicar más datos espectrales con confianza.

De todas las proteínas identificadas por LC-MS/MS en las muestras de saliva, se seleccionaron las que tenían una puntuación Protein-Pilot superior a 1,3 (equivalente a ≥ 95% de confianza) y una FDR menor del 1%. Las proteínas seleccionadas se examinaron manualmente y se eliminaron las identificadas sin anotación funcional y las identificaciones redundantes conservando sólo las que tenían la puntuación más alta.

El archivo ProteinPilot resultante del filtrado anterior contenía todos los datos espectrales de hembras y machos y fue usado como **biblioteca espectral de referencia** para cuantificar las proteínas identificadas utilizando los datos crudos adquiridos por SWATH-MS y el software PeakView 2.2 (AB Sciex LLC).

Con ese fin, PeakView extrajo el área bajo la curva de los péptidos identificados con más del 95% de confianza y una FDR inferior al 1% y, posteriormente, seleccionó automáticamente un máximo de 20 péptidos por proteína, calculando el área bajo la curva de cada proteína como la suma de las áreas de los péptidos correspondientes. Las áreas bajo la curva de las proteínas se normalizaron por el área total usando la herramienta MarkerView v1.3 (AB Sciex LLC) y se utilizaron para el análisis de expresión diferencial.

Las proteínas cuantificadas por SWATH-MS se filtraron en una forma similar a la de las proteínas identificadas por LC-MS/MS, esto es, se eliminaron las coincidencias con las proteínas no anotadas y las identificaciones redundantes.

Los datos proteómicos de este estudio se han depositado en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) con el código identificador PXD027367.

2.6. Anotación funcional y clasificación de las proteínas identificadas.

La anotación funcional de las proteínas identificadas se llevó a cabo utilizando la base de datos UniProt. Los códigos UniProt de las proteínas identificadas se utilizaron para extraer los correspondientes términos GO en las categorías de proceso biológico, función molecular y componente celular, así como las referencias cruzadas en las bases de datos InterPro, Pfam y Panther. Las proteínas identificadas se clasificaron funcionalmente de acuerdo con los términos GO asignados y la información bibliográfica disponible, tomando como modelo la clasificación aplicada por Kim et al. (2020) en su estudio del proteoma de la saliva de *Amblyomma americanum* (Ixodidae).

2.7 Expresión diferencial y análisis estadístico.

Las áreas de proteínas normalizadas fueron analizadas por el programa MultiExperiment Viewer (MeV) (<http://www.tm4.org/mev.html>) para identificar a las proteínas expresadas diferencialmente en la saliva entre hembras y machos aplicando el test de la *t* de Welch sujeto a la corrección de Bonferroni. Las proteínas salivales que mostraban un valor de *p* ajustado menor de 0,05 se consideraron expresadas diferencialmente de manera significativa entre hembras y machos. La cantidad de cada proteína expresada en cada sexo fue calculada como la media del área del pico correspondiente en las tres muestras replicadas de saliva de dicho sexo, y el cambio de expresión (fold-change) entre hembras y machos fue expresado como la proporción entre el área media en hembras y machos. Usando la herramienta MeV también se efectuó un análisis de agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) de las proteínas expresadas diferencialmente entre hembras y machos, y se construyó un mapa de calor (*heat map*) con valores de Z-score normalizados usando distancias euclídeas.

Para facilitar la comprensión de los procedimientos experimentales que hemos llevado a cabo, en la Figura 2.1 se representa esquemáticamente el flujo de trabajo seguido en este objetivo en relación con el procesamiento de muestras, la adquisición y análisis de datos, la generación de bibliotecas espectrales y la identificación y cuantificación de las proteínas.

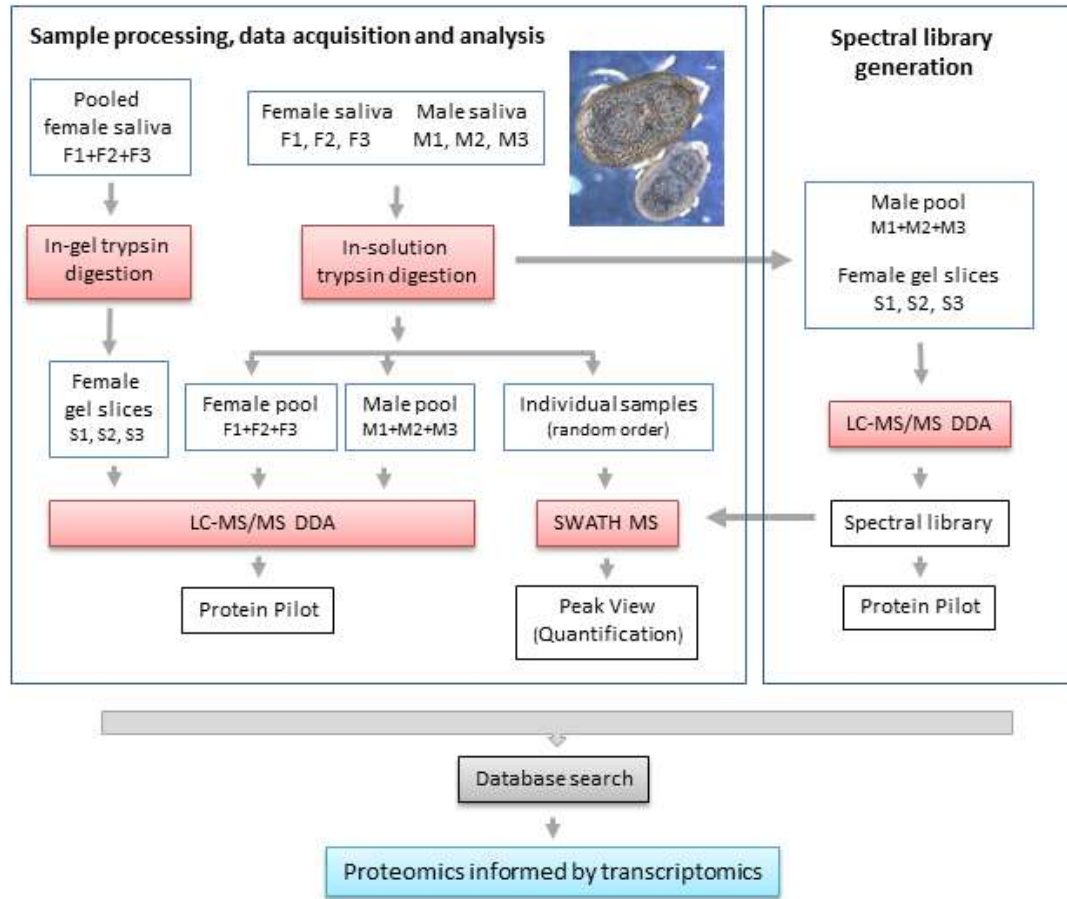


Figura 2.1. Esquema del flujo de trabajo seguido en el estudio desarrollado en el objetivo 2.

OBJETIVO 3.

SELECCIÓN Y ANÁLISIS *IN SILICO* DE ANTÍGENOS SALIVALES POTENCIALMENTE PROTECTORES Y PRODUCCIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES DE LOS CANDIDATOS SELECCIONADOS.

3A. SELECCIÓN Y ANÁLISIS *IN SILICO*

Según nuestra hipótesis de trabajo, las glándulas salivales y el intestino medio de las garrapatas son compartimentos esenciales de la interfase hospedador-garrapata-patógeno en los que estos parásitos expresan proteínas que ejercen funciones vitales específicas, adquiridas a lo largo de la coevolución con los hospedadores, que les permiten adaptarse a su estilo de vida estrictamente hematófago.

Las glándulas salivales producen la saliva, la cual contiene numerosas proteínas bioactivas solubles que son inoculadas al hospedador durante la picadura. Estas proteínas neutralizan las respuestas defensivas del hospedador permitiendo la ingestión de la sangre y facilitando la transmisión de patógenos, lo que las convierte en candidatos antigénicos de primera elección para el desarrollo de vacunas anti-garrapata eficaces.

Los argásidos, incluyendo *O. erraticus*, completan la ingestión de sangre en minutos. Esto significa que las proteínas salivales que hacen posible la alimentación sanguínea deben haber sido sintetizadas previamente y estar almacenadas en las glándulas salivales, listas para ser secretadas con la saliva antes de que las garrapatas accedan al hospedador.

Dado que argásidos adultos se alimentan varias veces a lo largo de su vida, las proteínas salivales bioactivas que se consumen durante cada alimentación deberán ser resintetizadas y reemplazadas después de la ingestión de sangre para que la garrapata pueda alimentarse de nuevo. Por lo tanto, asumimos que los genes que codifican estas proteínas deberán ser sobreexpresados en algún momento posterior a la toma de sangre.

En consecuencia, para seleccionar a ese grupo de genes/proteínas candidatos a dianas antigénicas potencialmente protectoras, examinamos el transcriptoma de las glándulas salivales y el proteoma de saliva de *O. erraticus*, obtenidos en los objetivos 1 y 2, aplicando secuencialmente los siguientes filtros.

3.1. Selección de genes/proteínas sobreexpresados a los 7 días tras la alimentación.

De acuerdo con el criterio definido en el punto 1.4. del objetivo 1, de los 18.961 genes salivales anotados en el sialotranscriptoma, 3.535 fueron expresados diferencialmente tras la alimentación. De ellos, se seleccionaron los 2.088 genes sobreexpresados en los 7 primeros días post alimentación. Es decir, se seleccionaron los expresados más del doble en las hembras a los 7 días post-alimentación que en las hembras sin alimentar ($FC > 2$; $\log_2 FC > 1$; $FDR < 0,05$).

3.2. Selección de proteínas secretadas solubles.

Entre las proteínas sobreexpresadas resultantes del punto anterior, se seleccionaron (i) las detectadas en el proteoma de la saliva y (ii) todas aquellas que, aun no habiendo sido

detectadas en el proteoma, portaban en su secuencia codificante señales de secreción, tanto clásicas (péptido señal) como no clásicas, pero no dominios transmembrana ni anclajes tipo GPI.

Todas estas proteínas/transcritos se clasificaron como solubles secretadas. Las carentes de péptido señal, dominios transmembrana y anclaje GPI se consideraron intracelulares no secretadas; y, por último, las que presentaban dos o más dominios transmembrana -con o sin péptido señal-, junto con las que presentaban un único dominio transmembrana o anclaje GPI pero sin péptido señal, se clasificaron como proteínas de membrana.

3.3. Selección de proteínas antigénicas.

A continuación, entre las anteriores, se seleccionaron las proteínas/transcritos potencialmente antigénicas. Para ello, las correspondientes secuencias polipeptídicas se analizaron con el programa Vaxijen 2.0, fijando el umbral de inmunogenicidad en el 0,5 establecido por defecto para organismos parásitos (Manchinova et al., 2007a, 2007b; Flower et al., 2010). Las proteínas con una puntuación superior a dicho umbral fueron consideradas antigénicas.

3.4. Inspección/selección manual.

La lista de candidatos resultantes del filtrado anterior se inspeccionó y refinó manualmente, seleccionando un grupo reducido de candidatos para su producción en forma recombinante y posterior evaluación de su eficacia protectora individual en pruebas de vacunación de animales. En esta selección, se dio prioridad a los candidatos que cumplieran el mayor número posible de los siguientes criterios adicionales.

1. Desempeñar funciones vitales para la garrapata. En particular, funciones relacionadas con la modulación de los mecanismos de defensa del hospedador y la ingestión de sangre.
2. Predicción de expresión extracelular.
3. Máxima integridad de su secuencia codificante (ORF) para facilitar la amplificación por RT-PCR y el posterior clonaje y expresión.
4. Elevados niveles de expresión.
5. Elevado nivel de sobreexpresión post alimentación (*fold change*).

3.5. Análisis topológico y filogenético de los candidatos seleccionados.

Las predicciones topológicas de la secuencia de aminoácidos de los candidatos se realizaron con el software DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022). La presencia de péptidos señal, señales de secreción no clásicas y anclajes GPI se predijo utilizando, respectivamente, las herramientas: SignalP-5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019), SecretomeP 2.0 (Bendtsen et al., 2004) y GPI-SOM (Fankhauser et al., 2005).

Para el análisis filogenético, primero se utilizó la herramienta BLASTp a fin rastrear las bases de datos UniProt y NCBI nr en busca de ortólogos de cada candidato en otras especies de argásidos e ixódidos. A continuación, se utilizó herramienta de alineación Clustal Omega para el alineamiento múltiple de los ortólogos recuperados y la identificación de regiones conservadas.

Los análisis filogenéticos y de evolución molecular de estos ortólogos se realizaron con el software MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Los árboles filogenéticos se construyeron aplicando el método *neighbour-joining*, en el que los espacios se trataron como eliminaciones por pares, las distancias entre aminoácidos se calcularon usando el modelo de Poisson y los valores de ramificación se evaluaron mediante un análisis *bootstrap* (10.000 bootstraps).

3.6. Predicción de estructura secundaria, modelado tridimensional y predicción de epítomos B y T.

La predicción de la estructura secundaria y el modelado tridimensional (3D) de los candidatos proteicos se llevó a cabo con los servidores Phyre² (Kelley et al., 2015) y Swiss model. Los modelos 3D resultantes se visualizaron usando el paquete PyMOL (DeLano, 2002).

Los candidatos antigénicos se analizaron con el fin de predecir si contenían epítomos B lineales y epítomos T. La predicción de los epítomos B lineales continuos en los candidatos seleccionados se llevó a cabo con las herramientas ABCpred (Saha and Raghava, 2006), BCEpred (Saha et al., 2004) y BepiPred-2.0 (Larsen et al., 2006). Los fragmentos de secuencia identificados como epítomos B por al menos dos de estas herramientas se definieron como epítomos B lineales predichos por consenso.

La predicción de epítomos T, o dicho de otro modo, la presencia de péptidos con capacidad de unión a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II se analizó con las herramientas NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>) y NetMHCIIpan 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0>).

La información sobre los alelos MHC en cerdos y otros hospedadores vertebrados de *O. erraticus* se limita actualmente al MHC-I del cerdo. Debido a esto, para predecir los péptidos T con capacidad de unirse y ser presentados en moléculas MHC-II, se han utilizado las bases de datos de alelos MHC-II de ratón, que son bien conocidas y están disponibles. Los resultados obtenidos se han considerado extrapolables a otros hospedadores vertebrados de *O. erraticus*, como los cerdos, cuyo repertorio de alelos MHC-II aún se desconoce.

3B. PRODUCCIÓN DE CANDIDATOS EN FORMA RECOMBINANTE

3.7. Verificación experimental de las secuencias obtenidas por RNA-seq para los candidatos seleccionados.

Los candidatos antigénicos elegidos en el objetivo 3 fueron los denominados OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like. Dado que su selección se basó únicamente en el análisis *in silico* de las secuencias de mRNA obtenidas por RNA-seq, consideramos necesario verificar experimentalmente la integridad y precisión de dichas secuencias antes de iniciar la producción de los candidatos en forma recombinante. Con ese fin, los cDNA codificantes completos de estos 4 candidatos, desde el codón de inicio hasta el de terminación, fueron amplificados por RT-PCR convencional, secuenciados y alineados con las secuencias homónimas proporcionadas por el RNA-seq.

3.7.1. Amplificación de los cDNA completos.

La RT-PCR se llevó a cabo a partir de muestras de RNA total de las glándulas salivales de hembras de *O. erraticus* tomadas a los 7 días post alimentación, equivalentes a las muestras utilizadas para el RNA-seq. Este proceso se llevó a cabo siguiendo procedimientos estándar descritos con detalle en trabajos previos (Oleaga et al., 2022). Brevemente, el RNA total de las glándulas salivales se purificó con el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y la transcripción reversa (RT) se llevó a cabo empleando el Kit 1st Strand cDNA Synthesis (Roche), con el oligo-p(dT)₁₂ como cebador y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las amplificaciones por PCR se efectuaron con cebadores específicos diseñados con el software Primer3 Plus (Untergasser et al., 2012) a partir de las secuencias de nucleótidos proporcionadas por RNA-seq (BioProject PRJNA666995): *O. erraticus* ATSP (OeATSP) (GenBank, GIXX02003429.1), *O. erraticus* SOD (OeSOD) (GenBank, GIXX02013702.1) y *O. erraticus* SULT-proteína hipotética secretada (OeSULT-like) (GenBank, GIXX02011269.1).

Las Tablas 2.1 y 2.2 muestran, respectivamente, la mezcla de reacción utilizada en estas PCR y las secuencias de los cebadores junto con las condiciones de reacción utilizadas para cada candidato.

Tabla 2.1. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos.

Reactivos (concentración)	Volumen (μl)	Concentración final
H ₂ O	19,75	-
Buffer 10X (Mg ²⁺ 25 mM)	2,5	1X (Mg ²⁺ 2 mM)
dNTP Mix (10 mM)	0,5	200 μM
Cebador directo (50 μM)	0,5	1 μM
Cebador reverso (50 μM)	0,5	1 μM
Taq (5U/ μl)	0,25	1,25 U
cDNA	1	-
Volumen total	25	-

Tabla 2.2. Oligonucleótidos y condiciones térmicas empleados en la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos.

Gen	Descripción	Cebadores: directo/reverso	Condiciones PCR	Tamaño producto PCR (pb)
OeATSP	Acid tail salivary protein	5'-ATGAAAGTCGTTTCTGCCTTTG 5'-CTACTTGAGCTCAAAGGTCTCCTC	94 °C 2 min + 35x (94°C 15 s; 60° 30 s; 72°C 40 s) + 72 °C 7 min	531
OeMCFD2	Multicoagulation factor deficiency protein 2	5'-ATGGCTGCATCCCAACAAC 5'-TCACATCGCTGATCGCATC	94 °C 2 min + 35x (94°C 15 s; 66° 30 s; 72°C 40 s) + 72 °C 7 min	420
OeSOD	Superoxide dismutase	5'-ATGGCGACTCCGGCGG 5'-TCAAGGTGCAGCAATGGCG	94 °C 2 min + 35x (94°C 15 s; 60° 30 s; 72°C 40 s) + 72 °C 7 min	558
OeSULT-like	Hypothetical secreted protein 1669 (sulfotransferase-like)	5'- ATGAACATTGCTCCAGTACTCCTT 5'-TCAAGGCATCGGCAAGGAAT	94 °C 2 min + 35x (94°C 15 s; 60° 30 s; 72°C 40 s) + 72 °C 7 min	657

3.7.2. Purificación de los productos de PCR.

Los productos de estas PCRs se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en Tris-Borato-EDTA (TBE) teñido con GelRed (Biotium). Las bandas correspondientes se cortaron y se purificaron rutinariamente con el StrataPrep DNA Gel Extraction Kit (Agilent Technologies) y ocasionalmente, para facilitar su clonaje, se repurificaron con el NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). Los cDNA purificados se resuspendieron en agua ultrapura estéril y su concentración se determinó por espectrofotometría a 260 nm en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.7.3. Clonaje y secuenciación.

Tras su purificación, los productos de PCR se clonaron en el vector pSC-A (Figura 2.2), utilizando el StrataClone PCR Cloning kit (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

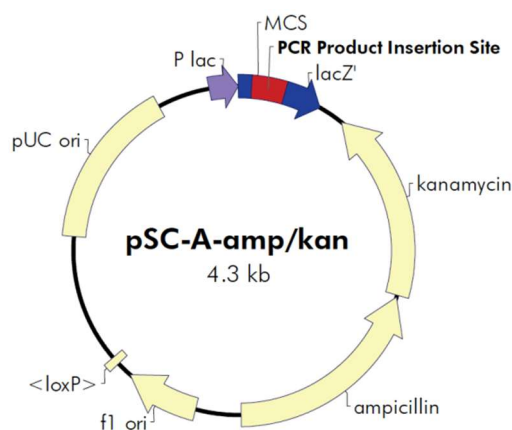


Figura 2.2. Mapa del vector pSC-A utilizado para el clonaje directo y secuenciación de los productos de PCR (Agilent Technologies).

Las distintas construcciones pSC-A-cDNAs se usaron para transformar células *Escherichia coli* SoloPack suministradas en el kit. Tras la transformación, las células se sembraron en placas de agar con 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/mL de kanamicina y 80 µL/placa de X-gal al 2%. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y al día siguiente se seleccionaron varias colonias recombinantes (de color blanco) de cada una de las transformaciones y se inocularon en cultivos de 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina y kanamicina en las mismas concentraciones antes indicadas.

Los cultivos se incubaron a 37 °C, en agitación, hasta el día siguiente, tras lo cual las células se recuperaron por centrifugación, se lisaron y su DNA plasmídico fue extraído utilizando el kit Qiaprep® Spin Miniprep (Qiagen). La presencia de inserto en los plásmidos purificados se verificó mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI durante 2 horas a 37 °C (Tabla 2.3) y análisis del producto de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 2.3. Mezcla de reacción para la digestión con EcoRI.

Componente	Volumen (µL)
ADN plasmídico (0,5 -1 µg)	2
Buffer H (10x)	2
EcoRI FastDigest (Thermo Scientific)	1
Agua	15
Volumen total	20

Los insertos fueron secuenciados en ambas cadenas utilizando los cebadores universales T3 y T7. La secuenciación se efectuó en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca (<https://nucleus.usal.es/secuenciacion/presentacion>).

Las secuencias obtenidas se depuraron y analizaron utilizando las aplicaciones Chromas 2.1.1 y Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>); su identidad se verificó mediante BLASTn (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) y, finalmente, cada secuencia fue alineada y comparada con la secuencia homónima proporcionada por el RNA-seq.

Cuando se observaron diferencias entre las secuencias procedentes del RNA-seq y las homónimas obtenidas por RT-PCR, se utilizaron las segundas para los estudios posteriores.

En estos casos, las correspondientes secuencias peptídicas se re-analizaron *in silico* para verificar su topología utilizando las aplicaciones indicadas en el apartado 3.6.

3.8. Producción recombinante de las formas maduras (sin péptido señal) de los candidatos seleccionados.

Tras obtener las secuencias codificantes completas de nuestros candidatos, pudimos verificar que, efectivamente, que se trata de proteínas solubles con péptido señal, sin dominios transmembrana ni anclajes GPI. En consecuencia, produjimos sus formas maduras (sin péptido señal) en forma de proteína recombinante truncada (tOeATSP, tOeMCFD2, tOeSOD y tOeSULT-like) siguiendo protocolos estándar descritos previamente (Oleaga et al., 2022).

Estas formas truncadas se amplificaron por PCR a partir de las secuencias codificantes completas clonadas en pSC-A y se subclonaron en el vector de expresión pQE-30 (Qiagen). Este vector produce proteínas recombinantes con una marca de hexahistidina en el extremo aminoterminal (Figura 2.2), que permite la purificación de las recombinantes mediante cromatografía de afinidad en resina de níquel.

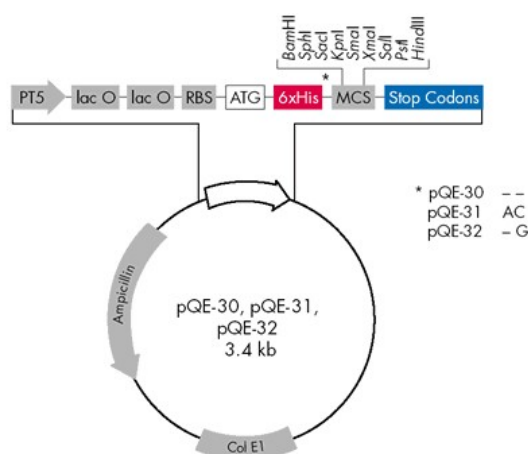


Figura 2.3. Mapa de los vectores de expresión de la serie pQE-30 (Qiagen).

3.8.1. Amplificación de las formas truncadas (sin péptido señal).

Para amplificar los fragmentos de cDNA codificante de estas formas truncadas se diseñaron nuevos pares de cebadores específicos, a los que se añadieron sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI ó KpnI, con el objetivo de facilitar el subclonaje de los amplicones en el vector pQE-30 (Tabla 2.4). También se añadieron varios nucleótidos adicionales en el extremo 5' de los cebadores para aumentar la eficiencia de la digestión de los amplicones con dichas enzimas (Manual de uso, New England Biolabs; <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-ADN-fragments>).

Tabla 2.4. Cebadores* y condiciones de PCR** utilizados para la amplificación de los fragmentos de cDNA que codifican las secuencias maduras de los candidatos.

Protein	Diana de amplificación (aa)	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño Producto PCR	Enzima
OeATSP	Forma truncada (21-176)	OE_ATSP_BamH1F OE_ATSP_BamH1R	CGCGGATCCGAAGATTGGAAATCGTCTGC CGCGGATCCCTACTTGAGCTCAAAGGTCTCCTC	471	BamHI
OeMCFD2	Forma truncada (26-139)	OE_MCFD_BamH1F OE_MCFD_BamH1R	CGCGGATCCGACGATTGAGCGGCCG CGCGGATCCTCACATCGCTGATCGCATC	345	BamHI
OeSOD	Forma truncada (26-185)	OE_SOD_Kpn1F OE_SOD_Kpn1R	CGGGGTACCCAGCAAGAAGAGGTCGTCAC CGGGGTACCTTAAGGTGCAGCAATGGC	483	KpnI
OeSULT-like	Forma truncada (19-218)	OE_SULF1_BamH1F OE_SULF1_BamH1R	CGCGGATCCGGCGGACCACTGGACTCC CGCGGATCCTCAAGGCATCGGCAAGGAAT	603	BamHI

* Los cebadores incluyen sitios de restricción (subrayados) para facilitar el clonaje en el vector pQE-30.

** Las condiciones de PCR fueron las mismas para todas las dianas (94 °C, 2 min + 10 × (94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 90 s) + 25 × (94 °C, 30 s; 66 °C, 30 s; 72 °C, 90 s) + 72 °C, 7 min)), excepto para OeMCFD2, que requirió 62 °C en las primeras 10 rondas de amplificación y 67 °C en las segundas 25.

Los productos de estas PCR se separaron en geles de agarosa, se purificaron a partir del gel tal como se ha descrito previamente y su concentración se estimó en el Nanodrop 2000.

3.8.2. Clonaje en el vector pQE-30.

Preparación de los insertos.

A fin de generar extremos cohesivos, los productos de las PCR anteriores se digirieron con las enzimas BamHI (Promega) en el caso de tOeATSP, tOeMCFD y tOeSULT-like y con KpnI (Thermo Scientific) en el caso de la tOeSOD siguiendo las instrucciones del proveedor de estas enzimas, como muestra la Tabla 2.5.

Tras la digestión, los insertos se purificaron con el NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) y su concentración se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Tabla 2.5. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para la digestión de los amplicones tOeATSP, tOeMCFD y tOeSULT-like con la enzima BamHI y para la digestión del amplicón tOeSOD con KpnI.

	tOeATSP y tOeMCFD	tOeSULT-like	tOeSOD
Componente	Volumen (μL)	Volumen (μL)	Volumen (μL)
H ₂ O	2,3	10,1	7,5
Buffer E, 10X	2	2	2
BSA, 10 μg/μL	0,2	0,2	-
ADN (1 μg)	15	7	10
BamHI (Promega), 10 U/μL	0,5	0,7	-
KpnI (Thermo), 10 U/μL	-	-	0,5
Volumen total	20	20	20
Condiciones térmicas	3:30 horas, 37 °C	1 hora, 37 °C	1 hora, 37 °C

Preparación del vector pQE-30.

Paralelamente se prepararon dos lotes del vector pQE-30: uno digerido con BamHI y otro digerido con KpnI, y ambos defosforilados con “Thermosensitive Alkaline Phosphatase” (TSAP).

La defosforilación del vector se realizó al mismo tiempo que su digestión con BamHI o KpnI, tras lo cual se inactivó a la fosfatasa calentando la reacción durante 15 minutos a 74 °C. Las mezclas y condiciones de reacción de ambos procesos se exponen en la tabla 2.6.

Tras la digestión, las muestras de vector se separaron en gel de agarosa y las bandas obtenidas se cortaron y se purificaron con el StrataPrep ADN Gel Extraction Kit (Agilent Technologies) y, a continuación, se repurificaron con el NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). Su concentración se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Tabla 2.6. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para la digestión y defosforilación simultáneas del vector pQE-30 con BamHI/TSAP o con KpnI/TSAP.

	Digestión/ defosforilación BamHI	Digestión/ Defosforilación KpnI
Componente	Volumen (μL)	Volumen (μL)
H ₂ O	4	-
Buffer E (Promega), 10X	6	-
Buffer E (Thermo) 10X	-	7
BSA, 10 μg/μL	0,6	-
pQE-30 (9 μg)	45	45
BamHI (Promega), 5 U/μL	4,5	-
KpnI (Thermo), 10 U/μL	-	9
TSAP (Promega), 1 U/μL	9	-
TSAP (Thermo), 1 U/μL	-	9
Volumen total	70	70
Condiciones térmicas	15 min, 37 °C	1 hora, 37 °C
Inactivación TSAP	15 minutos, 74 °C	15 minutos, 74 °C

Ligación de los insertos al vector pQE-30.

Las ligaciones fueron realizadas en una proporción 5:1 (inserto:vector) partiendo de 100 ng de vector digerido y defosforilado.

En el proceso se empleó la enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) con el 2X Rapid Ligation Buffer (Promega) y las mezclas de reacción se incubaron a 4 °C durante toda la noche hasta el día siguiente. Así mismo se incubaron reacciones de ligación sin inserto, que se usaron como controles negativos (Tabla 2.7).

Tabla 2.7. Mezclas de reacción para las ligaciones de los insertos y el vector pQE-30.

	tOeATSP	tOeMCFD	tOeSOD	tOeSULT-like	Controles negativos
Componente	Volumen (μL)				
H ₂ O	3,5	1,71	5,58	3,34	6
Buffer Tb 10X	1	1	1	1	1
Inserto	2,87	4,29	1,9	2,86	-
pQE-30, 50 ng	2,5	2	0,52	1,8	2
Ligasa, 1U/μL	1	1	1	1	1
Volumen total	10	10	10	10	10

3.8.3. Transformación de células competentes *Escherichia coli* M15 con los plásmidos recombinantes pQE-30-inserto.

Los productos de las ligaciones anteriores (pQE-30-inserto) se utilizaron para transformar células que soportaran la expresión de las proteínas recombinantes, en este caso células *E. coli* M15 (Qiagen). La transformación de las M15, y la expresión y purificación de las proteínas recombinantes se realizaron según los protocolos estándar proporcionados por el fabricante (The QIA expressionist, Qiagen).

Al día siguiente, se picaron aleatoriamente 10 colonias de cada transformación y se incubaron en 5 ml de medio LB con los mismos antibióticos, a la misma concentración. De cada uno de estos cultivos se tomó una alícuota para su almacenamiento en glicerol 15% a -80 °C.

El resto de cada cultivo se utilizó para purificar el DNA plasmídico y secuenciar el inserto a fin de verificar si la secuencia, la orientación y el marco de lectura eran los correctos. Para esa secuenciación se utilizó el cebador pQE Promoter Region (5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG); los clones correctos se almacenaron a -80 °C.

3.8.4. Expresión de las proteínas recombinantes truncadas tOeATSP, tOeMCFD, tOeSOD y tOeSULT-like.

Una alícuota de cada clon seleccionado se inoculó en medio LB con ampicilina y kanamicina a 100 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente. Los preinóculos se incubaron a 37 °C, 180 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se diluyeron en un volumen 20 veces superior del mismo medio de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO_{600nm} en torno a 0,6. Una vez alcanzada esa DO, se tomó una muestra de cultivo para usar como control no inducido y en el resto del cultivo se indujo la expresión de la proteína añadiendo 1 mM de Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) (Fisher Scientific) e incubando el cultivo en las mismas condiciones durante al menos 3 horas.

Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 4.000 g durante 20 minutos y se re-suspendieron en tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,9). A continuación, la mezcla anterior se sonicó durante 5 ciclos de 30 segundos y el lisado celular se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos, recogiendo el sobrenadante y el sedimento. Ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie para observar si la proteína recombinante se producía de forma soluble o insoluble.

En los casos en que la recombinante no se expresó o lo hizo en poca cantidad, se hicieron pruebas de expresión adicionales aumentando la concentración de IPTG (2 y 3 mM) y/o el tiempo de inducción (4 y 5 horas).

3.8.5. Purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad con Níquel siguiendo protocolos estándar adaptados y descritos por Díaz-Martín et al. (2011).

La proteína tOeMCFD se expresó en forma 100% soluble, por lo que se purificó en condiciones nativas a partir del sobrenadante del lisado celular.

Las otras tres proteínas (tOeATSP, tOeSOD y tOeSULT-like) se expresaron en forma insoluble 100%. En consecuencia, primero fue necesario solubilizarlas con un agente caotrópico y a continuación se purificaron en condiciones desnaturalizantes. Con ese fin, el sedimento de la lisis celular se solubilizó en el tampón de lisis suplementado con urea 8M (tampón de solubilización). Una vez solubilizado, se centrifugó 30 minutos a 20.000 g y se recogió el sobrenadante.

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

Una vez preparada la columna, la fracción solubilizada se filtró en alícuotas de 1 mL. Posteriormente, a fin de favorecer la renaturalización de la proteína unida a la columna, se efectuaron varios lavados sucesivos con 5 ml/lavado de tampón de solubilización conteniendo cantidades decrecientes de urea (6M, 4M, 2M y 0M). Por último, la proteína fue eluída con 250 mM de imidazol en tampón NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM (pH 7,9). Se realizaron 4 eluciones consecutivas con 1 mL de este tampón y las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE para verificar la presencia y pureza de la proteína. Las fracciones que contenían la proteína purificada se mezclaron y dializaron frente a PBS durante 24 horas a 4 °C.

Finalmente, la concentración de las proteínas dializadas se midió mediante densitometría de banda en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie e interpolación en una curva estándar de albúmina bovina (BSA), utilizando el equipo ChemiDoc XRS+ y el software Image Lab (BIO-RAD) y las muestras se almacenaron a -20 °C.

OBJETIVO 4.**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PROTECTORA INDIVIDUAL Y CONJUNTA DE LOS CANDIDATOS SALIVALES EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.****FORMULACION DE VACUNAS MULTIANTIGÉNICAS CON ANTÍGENOS SALIVALES E INTESTINALES Y EVALUACION DE SU EFICACIA PROTECTORA**

La inmunogenicidad y la capacidad protectora (eficacia vacunal) de los cuatro antígenos recombinantes (tOeATSP, tOeMCFD, tOeSOD y tOeSULT-like) se evaluaron en tres ensayos consecutivos de vacunación de conejos. En el primer ensayo se evaluó cada antígeno de forma individual y en los siguientes de forma conjunta en formulaciones multiantigénicas.

4.1. Primer ensayo: vacunación con los antígenos salivales recombinantes formulados individualmente.

El propósito de este ensayo fue evaluar la capacidad individual de cada antígeno recombinante para inducir respuestas inmunes protectoras frente a las infestaciones por *O. erraticus* y *O. moubata*.

4.1.1. Inmunización.

Se utilizaron 15 conejos, divididos en 5 grupos de 3 conejos cada uno. Un grupo se utilizó como control y los 4 grupos restantes se inmunizaron con cada una de las recombinantes (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Protocolo de vacunación de conejos con cada proteína recombinante.

Grupo	No. Conejos por grupo	Proteína	Dosis (µg)	No. de dosis	Adyuvante
0 (control)	3	-	-	3	Montanide ISA 61 VG
1	3	tOeATSP	100	3	
2	3	tOeMCFD2	100	3	
3	3	tOeSOD	100	3	
4	3	tOeSULT-like	100	3	

Cada animal recibió tres dosis subcutáneas de 100 µg de recombinante por dosis en 1 mL de PBS emulsionado con 1 mL del adyuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic), administradas cada 14 días. Por su parte, a los conejos del grupo control se les administró únicamente el adyuvante emulsionado con PBS.

Se tomaron muestras de sangre de todos los conejos antes de la administración de la primera dosis antigénica (suero preimmune), a los 14 días tras la última dosis antigénica (inmediatamente antes de realizar las infestaciones con garrapatas, 14 dpi), y de nuevo a los 28 días tras la última inmunización (28 dpi), es decir, a los 14 días de la infestación con garrapatas.

Las muestras de sangre se dejaron coagular en temperatura ambiente y el suero se almacenó a -80°C (Figura 2.4).

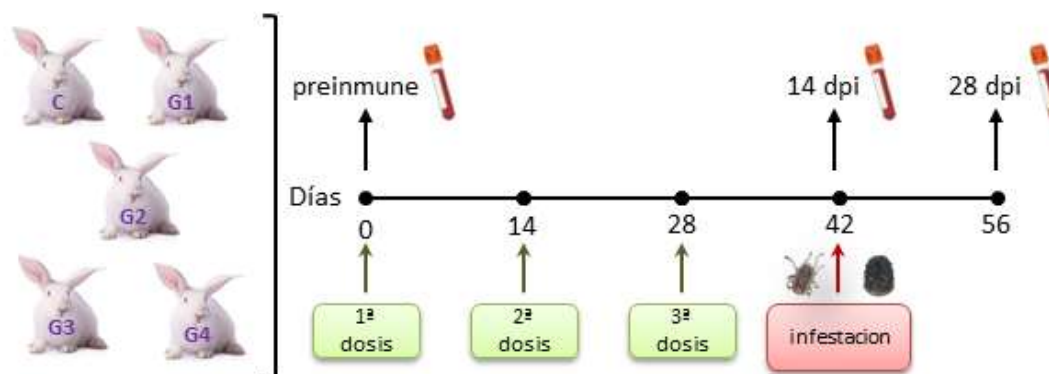


Figura 2.4. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 1. **C**, grupo control. **G1-G4**, grupos 1 al 4.

4.1.2. Análisis de la respuesta humoral: ELISA y Western Blot.

En los sueros inmunes tomados a los 14 dpi se determinó, primero, el título de anticuerpos frente a la recombinante homóloga mediante un ensayo convencional de diluciones seriadas en ELISA (García-Varas et al., 2010). Para ello, las placas de ELISA se tapizaron con 100 ng/pocillo de antígeno recombinante en 100 μL /pocillo de tampón de carbonato ($\text{pH } 9,6$) a 4°C durante la noche y se postapizaron con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C . C. Los sueros se diluyeron en PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (TPBS) en diluciones seriadas al doble, desde 1/100 hasta 1/12.800. Cada dilución se incubó en pocillos duplicados durante 1 hora a 37°C . Tras 3 lavados con TPBS, las placas se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa) (Sigma) diluido 1/10.000 en TPBS durante 1 hora a 37°C . Como sustrato cromogénico se usó orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma), las reacciones se detuvieron con ácido sulfúrico 3N y la densidad óptica (DO) se leyó a 492 nm. El título del suero se definió como la dilución más alta a la que el suero inmune presentaba al menos el doble de reactividad que el suero preinmune correspondiente a la misma dilución.

Una vez titulados, la especificidad de los sueros inmunes se analizó enfrentándolos por ELISA y western blot con: (i) la recombinante homóloga, (ii) la saliva de *O. erraticus* y de *O. moubata* y (iii) los 2 extractos proteicos del intestino medio de cada especie, esto es, de hembras antes de alimentarse y a las 48 horas post-alimentación.

Para los ELISAs, las placas se tapizaron con 1 μg /pocillo de saliva o extracto de intestino, los sueros se diluyeron a 1/100 y la anti-rabbit-IgG se diluyó 1/2.000. Para el Western Blot, los sueros se diluyeron a 1/50, la anti-rabbit-IgG a 1/2.000 y las reacciones se revelaron usando un sustrato quimioluminiscente (ClarityTM Western ECL Substrate, BIO-RAD).

4.1.3. Infestaciones.

A los quince días de la tercera y última dosis antigénica, cada conejo recibió una infestación con 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. erraticus* y con 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. moubata*.

Los ejemplares utilizados en estas infestaciones eran lotes homogéneos en cuanto a su fase de desarrollo, sexo, edad y condición fisiológica. Los adultos eran ejemplares jóvenes que únicamente habían desarrollado un ciclo trofogónico previo y llevaban unos 4 meses en ayunas. Las ninfas-3 eran ejemplares que llevaban 2 meses en ayunas.

Los parásitos se pesaron antes de alimentarlos y se mantuvieron sobre los conejos durante un máximo de 2 horas, por ser éste un tiempo suficiente para que todas las fases evolutivas completen su alimentación, aunque la mayoría de las ejemplares finalizaron la toma de sangre en menos de una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, los ejemplares se recogieron y se depositaron en la cámara ambiental durante 24 horas (a 28 °C, 85% de humedad relativa y 12 horas luz/oscuridad) para que completaran la emisión del fluido coxal. Al día siguiente, se pesaron y se distribuyeron en distintos viales: las ninfas alimentadas en un mismo conejo se depositaron juntas, mientras que cada hembra se emparejó con dos machos y se depositaron en un vial individual. En estas condiciones se mantuvieron durante 2 meses en cámara ambiental, hasta completar la oviposición y la eclosión de las larvas (o ninfas-1 en el caso de *O. moubata*). Durante ese tiempo se evaluó la mortalidad de los ejemplares cada 24 horas hasta los 3 días post-infestación y, posteriormente, cada 7 días. Transcurridos los 2 meses, se evaluó la tasa de supervivencia de todos los ejemplares, la fertilidad de las hembras y la tasa de muda de las ninfas-3.

4.1.4. Parámetros analizados para determinar la acción de la respuesta inmunitaria.

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

1. Cantidad de sangre ingerida.
2. Tasa de oviposición: número de huevos puestos por cada hembra.
3. Tasa de fertilidad: número de larvas vivas por hembra (ninfas-1 en el caso de *O. moubata*).
4. Porcentaje de muda de las ninfas-3
5. Porcentaje de mortalidad/supervivencia a los 2 meses en ninfas-3 y adultos.

Por último, se calculó la eficacia protectora de cada antígeno recombinante con la fórmula propuesta por Contreras y de la Fuente (2016), la cual se basa en la reducción de los procesos de desarrollo estudiados en garrapatas alimentadas sobre los animales vacunados, en comparación con garrapatas alimentadas sobre los controles. En concreto, la eficacia de la vacuna se calculó como $E = 100 \times [1 - (S \times F \times N \times M)]$, donde S y F son, respectivamente, la reducción en la supervivencia y fertilidad de las hembras y N y M representan, respectivamente, la reducción en la supervivencia y muda de ninfas-3 (Pérez-Sánchez et al., 2019a).

4.1.5. Análisis estadístico.

Los valores obtenidos para estos parámetros en los ejemplares alimentados en cada conejo (vacunados y controles) se resumieron como la media $\pm$ desviación estándar (DE) por grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos vacunados y el grupo control se evaluaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido por el test de la *t* de Dunnett para determinar el grado de significación en dichas diferencias. Las diferencias se consideraron significativas para una probabilidad de error menor del 5% ($p < 0.05$). Todo el análisis estadístico se efectuó con el programa SPSSv. 29 (IBM).

4.2. Segundo ensayo: vacunación con los 4 antígenos salivales formulados conjuntamente.

El objetivo de este ensayo fue doble: (i) evaluar la eficacia conjunta de los 4 antígenos salivales del ensayo anterior formulados en una vacuna multiantigénica (tOeATSP+ tOeMCFD2+ tOeSOD+ tOeSULTlike) y (ii) comprobar si las infestaciones en los animales vacunados actuaban como dosis antigénicas de refuerzo aumentando la eficacia protectora.

4.2.1. Inmunización.

Se utilizaron 6 conejos, divididos en 2 grupos de 3 conejos cada uno. Un grupo se utilizó como control y el otro se inmunizó con la mezcla de los 4 antígenos (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Protocolo de vacunación de conejos con los 4 antígenos salivales formulados conjuntamente en una vacuna multiantigénica.

Grupo	No. Conejos por grupo	Proteínas en la mezcla	Dosis de cada proteína (Dosis total)	No. de dosis	Adyuvante
0 (control)	3	-	-	3	Montanide ISA 61 VG
1	3	tOeATSP tOeMCFD2 tOeSOD tOeSULT-like	50 μ g (200 μ g)	3	

Se preparó una formulación que contenía 50 μ g de cada antígeno recombinante (200 μ g de proteína total) en 1 mL de PBS y se emulsionó en un 1 mL de Montanide ISA 61 VG. Cada conejo recibió tres dosis subcutáneas (200 μ g de proteína por dosis), administradas cada 14 días. A los conejos del grupo control se les administró únicamente el adyuvante emulsionado con PBS.

Se tomaron muestras de sangre de todos los conejos siguiendo el mismo calendario descrito en el ensayo anterior, esto es, antes de la administración de la primera dosis antigénica y a los 14 y 28 días tras la última dosis antigénica (Figura 2.5).

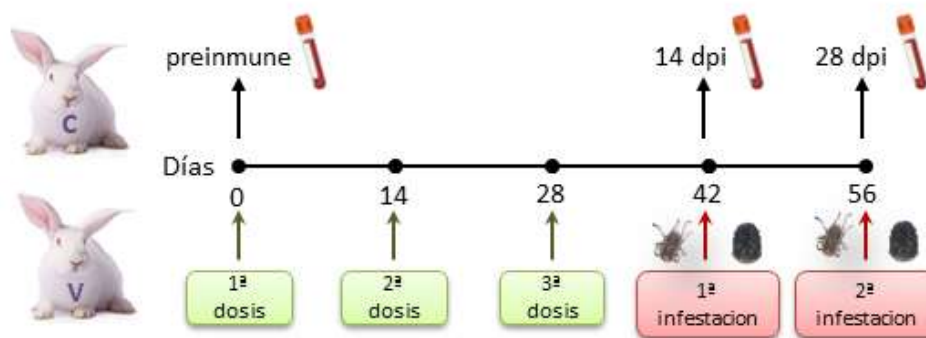


Figura 2.5. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 2. **C**, grupo control; **V**, grupo vacunado con la formulación multiantigénica salival.

Los sueros inmunes a los 14 dpi se titularon frente a cada proteína recombinante mediante un ensayo ELISA similar al descrito en el ensayo 1. Posteriormente, la reactividad de todos los sueros inmunes, a los 14 dpi y los 28 dpi, se analizó por ELISA frente a cada recombinante a una dilución fija.

4.2.2. Infestaciones, acción de la respuesta inmunitaria y análisis estadístico.

A los 14 y a los 28 días de la administración de la tercera dosis multiantigénica, todos los conejos recibieron dos infestaciones con 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. erraticus* y 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. moubata* por conejo e infestación.

En estas infestaciones, la evaluación de la acción de la respuesta inmunitaria sobre los parásitos, el análisis estadístico de los resultados y, finalmente, la determinación de la eficacia protectora de la vacuna multiantigénica se llevó a cabo de forma idéntica a la descrita para el primer ensayo vacunal.

4.3. Tercer ensayo: vacunación con una formulación multiantigénica combinando antígenos protectores salivales e intestinales de *O. erraticus*.

El propósito de este ensayo fue (i) evaluar la eficacia protectora de una vacuna multiantigénica formulada con los antígenos salivales más eficaces validados en los ensayos anteriores (OeATSP, OeMCFD2 y OeSOD) y con 4 antígenos intestinales protectores validados en estudios previos (OePK4, OeRPP0, OeTSP1, OeTSP2) (Pérez-Sánchez et al., 2019a, 2019b), y (ii) comprobar la hipótesis de si este tipo de vacuna puede proporcionar una protección más completa frente a *O. erraticus* (y a *O. moubata*) al anular la función de varias proteínas diana en órganos y procesos biológicos distintos.

4.3.1. Inmunización.

Se utilizaron 6 conejos en dos grupos de 3 conejos por grupo. Un grupo se utilizó como control y el otro se inmunizó con el cóctel de las proteínas salivales e intestinales (Tabla 2.10).

Como en el ensayo número 2, se preparó una formulación que contenía 50 µg de cada antígeno recombinante (350 µg de proteína total) en 1 mL de PBS y se emulsificó en un 1 mL de Montanide ISA 61 VG. Cada conejo del grupo experimental recibió tres dosis subcutáneas de esta emulsión antigénica (350 µg de proteína por dosis), administradas cada 14 días. A los conejos del grupo control se les administró únicamente el adyuvante emulsionado con PBS.

Tabla 2.10. Protocolo de vacunación de conejos con antígenos protectores salivales (azul) e intestinales (rojo) formulados conjuntamente en una vacuna multiantigénica.

Grupo	No. Conejos por grupo	Proteínas en la mezcla	Dosis de cada proteína (Dosis total)	No. De dosis	Adyuvante
0 (control)	3	-	-	3	Montanide ISA 61 VG
1	3	tOeATSP tOeMCFD2 tOeSOD OePK4 OeRPP0 OeTSP1 OeTSP2	50 µg (350 µg)	3	

Todos los conejos se sangraron antes de administrar la primera dosis de inmunógeno (sueros preinmunes) y a los 14 y 28 días de la tercera dosis antigénica (Figura 2.6).

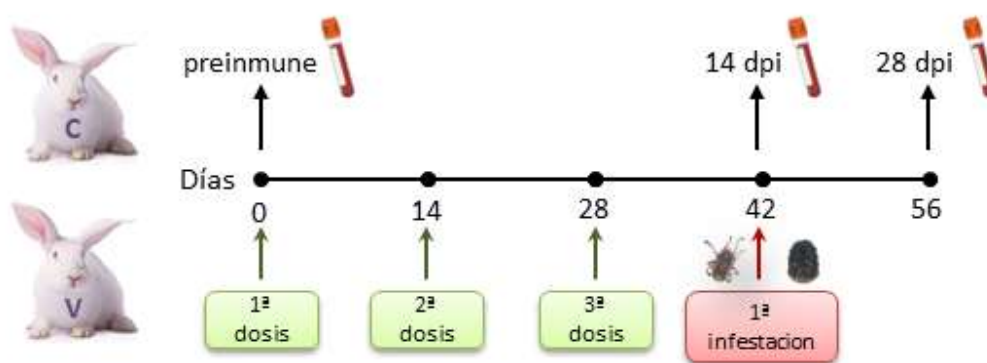


Figura 2.6. Protocolo de inmunización y sangrado de los conejos en el ensayo 3. **C**, grupo control; **V**, grupo vacunado con la formulación multiantigénica salival-intestinal.

Los sueros inmunes a los 14 dpi se titularon frente a cada proteína recombinante mediante un test ELISA similar al descrito en los ensayos 1 y 2. Posteriormente, la reactividad de todos los sueros inmunes, a los 14 dpi y 28 dpi, se analizó por ELISA frente a cada recombinante a una dilución fija.

4.3.2. Infestaciones, acción de la respuesta inmunitaria y análisis estadístico.

A los 14 días de la administración de la tercera dosis multiantigénica, todos los conejos recibieron una infestación con 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. erraticus* y 15 hembras, 30 machos y 50 ninfas-3 de *O. moubata* por conejo.

Tras la infestación, la evaluación de la acción de la respuesta inmunitaria sobre los parásitos, el análisis estadístico de los resultados y, finalmente, la determinación de la eficacia protectora de la vacuna multiantigénica se llevó a cabo de forma idéntica a la descrita en el primer ensayo vacunal.

Resultados y Discusión

OBJETIVO 1

TRANSCRIPTOMA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE HEMBRAS DE *ORNITHODOROS ERRATICUS*

1.1. Secuenciación y ensamblaje *de novo* del transcriptoma de las glándulas salivales de hembras de *O. erraticus*.

Nuestro objetivo ha sido llevar a cabo el ensamblaje *de novo* y la anotación del sialotranscriptoma de hembras de *O. erraticus*, así como evaluar la dinámica de expresión génica salival a lo largo de su ciclo trofogónico. Para ello, obtuvimos muestras duplicadas de las glándulas salivales de hembras en tres condiciones fisiológicas diferentes: hembras no alimentadas (OE0_1, OE0_2) y hembras a los 7 (OE7_1, OE7_2) y 14 días (OE14_1, OE14_2) después de la ingesta de sangre (días post-alimentación, d.p.a.).

Las seis muestras fueron secuenciadas utilizando la tecnología “RNAseq pair-end” de Illumina y las bibliotecas FastQ resultantes fueron sometidas a un control de calidad y ensamblaje *de novo*. En el ensamblaje de los transcritos primarios únicamente se utilizaron las lecturas de más de 100 nucleótidos. De este modo se ensamblaron, respectivamente, 82.838 y 88.590 transcritos en las muestras OE0_1 y OE0_2, 61.373 y 53.779 en las muestras OE7_1 y OE7_2, y 73.236 y 77.721 en las muestras OE14_1 y OE14_2 (Tabla suplementaria 3.1.).

A continuación, se confeccionaron transcriptomas consenso para cada estado fisiológico, esto es, de las glándulas salivales de hembras en ayunas y a los 7 y 14 d.p.a., que contenían 106.223, 75.491 y 93.846 transcritos, respectivamente.

Y por último también se construyó un transcriptoma consenso combinando los ensamblajes de las seis muestras. Este transcriptoma consenso contenía 103.041 transcritos con las siguientes métricas: longitud N50 1.884 pares de bases (pb), longitud promedio 1.194 pb y longitud máxima 26.653 pb (Tabla suplementaria 3.1 y Tabla 3.1).

A continuación, se aplicaron los siguientes criterios para seleccionar las secuencias que serían sometidas a posteriores análisis (anotación, caracterización funcional, análisis de expresión diferencial, etc.): (i) Transcritos con una similitud de secuencia inferior al 95% para lo cual se utilizó la herramienta CD-HIT; (ii) Transcritos con un nivel de expresión > 1 RPKM (1 lectura por kilobase de transcripto por millón de lecturas mapeadas); (iii) Transcritos con un marco de lectura superior a los 240 pb desde el codón de inicio (ATG) hasta el codón de parada (Open Reading Frame, ORF > 240). Tras aplicar estos tres filtros se obtuvo un transcriptoma final con 22.007 secuencias (Tabla 3.1).

El análisis de la integridad de este transcriptoma final con la herramienta BUSCO reveló un alto nivel de integridad (84,2%), puesto que, de los 2.934 genes de referencia BUSCO conservados en la clase Arachnida, 2.469 genes se encontraban presentes en nuestro transcriptoma. De estos 2.469 genes, los completos y con una sola copia supusieron el 47,0% del total (n= 1.379), los genes completos y duplicados supusieron el 37,2% (n= 1.090), los genes fragmentados el 1% (n= 30) y los genes perdidos o no encontrados el 14,8% (n= 435).

Tras verificar la calidad del ensamblaje y la integridad del transcriptoma, las 22.007 secuencias que lo integraban fueron procesadas para su anotación y caracterización funcional,

análisis de expresión diferencial a lo largo del ciclo trofogónico y análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas y términos GO (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Datos estadísticos del ensamblaje y anotación de los transcriptomas de glándulas salivales de hembras de *O. erraticus* tomadas antes de la alimentación (día 0) y a los 7 y 14 días post-alimentación, así como del transcriptoma consenso (merged).

Summary	0 days	7 days	14 days	merged
Transcriptome assembly statistics				
Total transcriptome size	130,120,686	93,400,441	118,099,223	123,061,068
Number of transcripts	106,223	75,491	93,846	103,041
Longest transcript (bp)	17,265	17,479	26,653	26,653
Shortest transcript (bp)	100	100	100	100
% transcripts > 1Kb	41.32%	40.83%	41.52%	39.97%
Mean transcript size (bp)	1,224	1,237	1,258	1,194
Median transcript size (bp)	815	797	817	780
N50 transcript length (bp)	1,875	1,979	1,978	1,884
L50 transcript count	19,869	13,592	16,813	18,414
Transcriptome annotation statistics				
Transcript clusters				97,343
Transcripts > 1 RPKM				28,061
Full ORF > 240 bp				22,007
Annotated in at least one database				18,961 (86.0%)
Assigned with EC numbers				3,608 (16.4%)
Assigned with GO terms				9,249 (42.0%)
Assigned to KEGG pathways				3,725 (16.9%)
Assigned with PFAM identifiers				6,619 (30.0%)
Assigned with InterPro identifiers				9,116 (41.7%)
Number of non-redundant predicted proteins				9,355

1.2. Anotación y clasificación funcional según los términos GO, familias de dominios proteicos y rutas biológicas.

La anotación de los 22.007 transcritos obtenidos se hizo mediante búsqueda por BLAST en las bases de datos del NCBI nr, Swiss-Prot y la del genoma de *Ixodes scapularis*.

Se anotaron 18.962 secuencias (86,16% de los transcritos ensamblados) con un valor de $E < 10^{-05}$, de las cuales, 14.219 (75,0%) mostraron una similitud de secuencia de más del 60% (Tabla suplementaria 3.2 y Tabla 3.1).

Las 3.046 secuencias restantes (13,84%) no mostraron homología significativa con ninguna secuencia depositada en las bases de datos citadas anteriormente. Estas secuencias podrían corresponder a proteínas aún desconocidas, a secuencias codificantes mal ensambladas o incluso a RNAs de cadena larga no codificantes, los cuales pueden ser difíciles de distinguir de las secuencias mal ensambladas (Dinger et al., 2008; de Castro et al., 2017) (Tabla 3.1).

Estos 18.962 transcritos anotados se caracterizaron funcionalmente empleando las bases de datos “Gene Ontology (GO)”, “Protein Domain Families (Pfam)” y “Biological Pathways (KEGG)” asociadas a las anotaciones de Swiss-Prot.

Un total de 9.249 transcritos fueron anotados con uno o varios términos GO (Tabla suplementaria 3.2), que incluyeron 18.719 componentes celulares, 10.222 funciones moleculares y 15.476 procesos biológicos, los cuales fueron visualizados utilizando la herramienta Web Gene Ontology Annotation Plot (WEGO) (Ye et al., 2018). La Figura 3.1 representa los transcritos clasificados de acuerdo con su componente celular, función molecular y proceso biológico empleando términos GO de nivel 2.

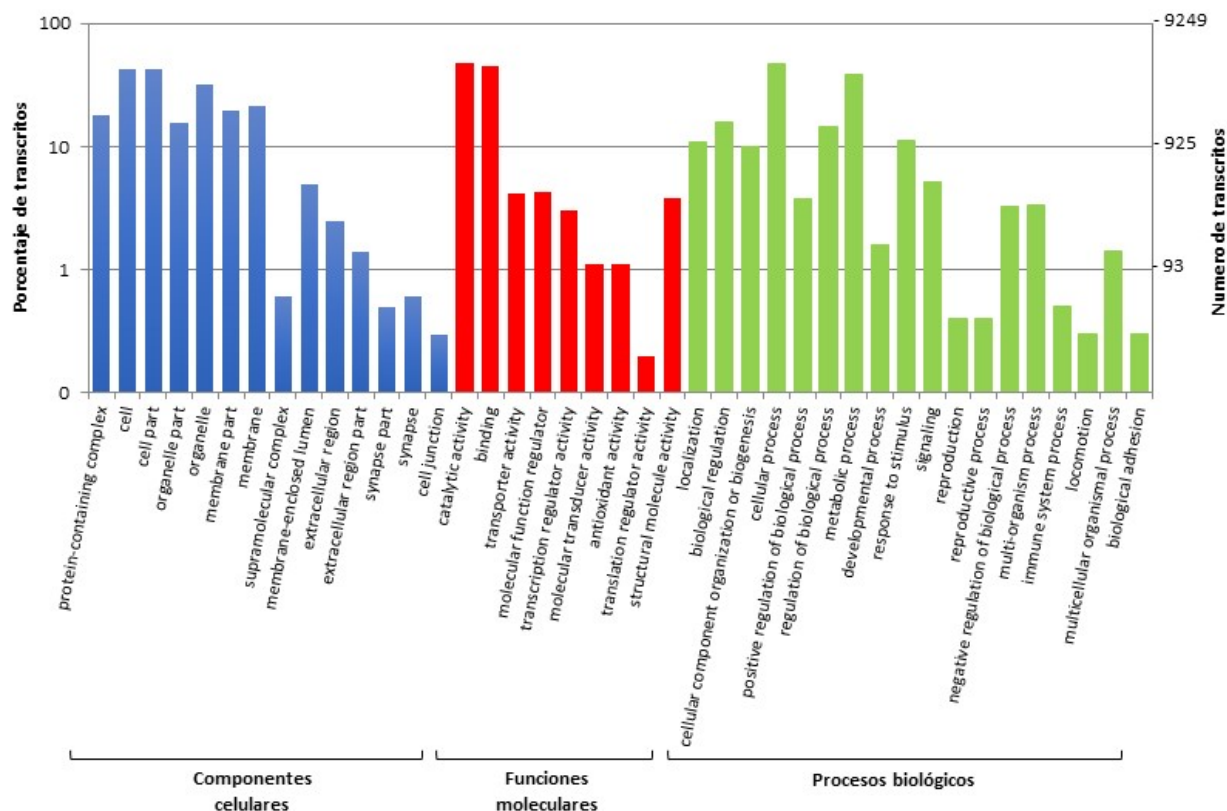


Figura 3.1. Distribución de la ontología génica (GO) del transcriptoma de las glándulas salivales de *O. erraticus*. Nivel 2 de términos GO de los componentes celulares (azul), las funciones moleculares (rojo) y los procesos biológicos (verde). Las barras representan el porcentaje y el número de transcritos anotados en cada categoría.

Los componentes celulares se clasificaron en 14 categorías, siendo las 7 más representadas las siguientes: célula (n= 3.969), parte celular (n= 3.907), orgánulo (n= 2.939), membrana (n= 1.994), parte de la membrana (n= 1.795), complejos que contienen proteínas (n= 1.667) y parte de orgánulos (n= 1.795).

En la clasificación según función molecular se obtuvieron 9 categorías. Las más representadas fueron la actividad catalítica (n= 4.412) y de unión (n= 4.187). El resto de las categorías incluyeron las siguientes funciones: reguladora (n= 397), actividad transportadora (n= 386), actividad estructural (n= 349), regulación de la transcripción (n= 274), actividad antioxidante (n= 101), transducción molecular (n= 98) y regulación de la traducción (n= 18).

En la clasificación de los procesos biológicos se obtuvieron 18 categorías. Las más abundantes fueron: procesos celulares (n= 4.281), procesos metabólicos (n= 3.518), regulación biológica (n= 1.458), regulación de los procesos biológicos (n= 1.335), respuesta a estímulos (n=

1.037), localización (n= 1.019), organización de los componentes celulares o biogénesis (n= 916) y señalización (n= 477).

Esta distribución de términos GO es similar a la obtenida en los mialomas de hembras de *O. erraticus* y *O. moubata* (Oleaga et al., 2017a, 2018) y a la del sialotranscriptoma obtenido en hembras de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a).

El análisis del sialotranscriptoma en la base de datos de familias proteicas Pfam asignó 9.828 dominios Pfam (de los cuales 2.458 eran únicos) a 6.619 transcritos (Tabla suplementaria 3.3). Los 30 dominios Pfam más abundantes se representan en la Figura 3.2. Los más frecuentes fueron el motivo de reconocimiento de RNA (también conocido como RRM, RBD o dominio RNP) (n= 191), el dominio zinc-finger tipo C2H2 (n= 99), el dominio protein kinase (n= 89), el dominio WD G-beta (n= 89), la familia metallo-peptidase M12 (n= 75) y el dominio helicase conserved C-terminal (n= 74).

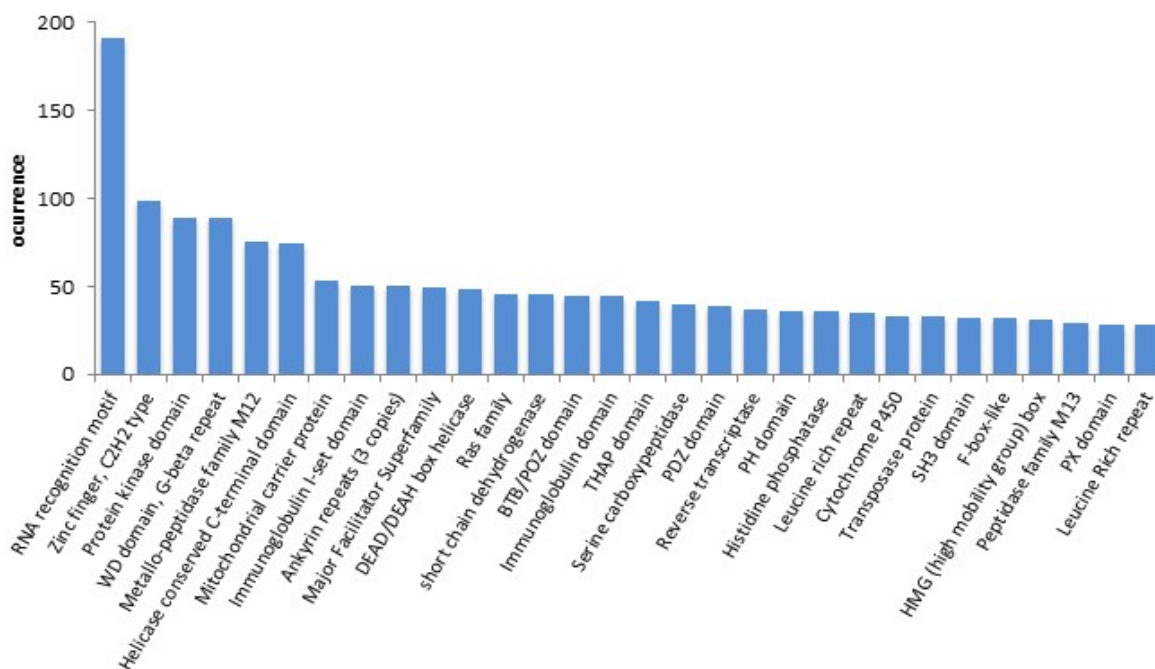


Figura 3.2. Dominios Pfam identificados en el transcriptoma anotado. Se representan los 30 dominios más frecuentes.

Estos dominios proteicos son, en su mayoría, los mismos que se identifican en el sialotranscriptoma de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a) y en los mialomas de *O. erraticus* y *O. moubata* (Oleaga et al., 2017a, 2018). De hecho, estos dominios son muy abundantes en las células eucariotas, donde participan en una amplia gama de funciones biológicas como la apoptosis, el control del ciclo celular, la remodelación de la cromatina, la organización del citoesqueleto, el desarrollo, el transporte intracelular, la biogénesis del ribosoma, la regulación transcripcional, la transducción de señales y las respuestas inmunitarias (Tirloni et al., 2016; Charrier et al., 2018; Perner et al., 2018).

El análisis de las secuencias anotadas en la base de datos KEGG permitió identificar en las glándulas salivales las rutas biológicas activas. De esta manera, 3.725 secuencias salivales de *O. erraticus* se asignaron a 627 enzimas implicadas en 100 rutas metabólicas que, a su vez, se agrupan en 13 clases (Tabla suplementaria 3.4). La Figura 3.3 muestra las 30 rutas metabólicas más abundantemente representadas, que se agrupan en 7 clases e incluyen 2.687 secuencias. La mayoría de estas enzimas participan en el metabolismo de lípidos (1.180 secuencias), carbohidratos (416 secuencias), aminoácidos (382 secuencias) y nucleótidos (335 secuencias).

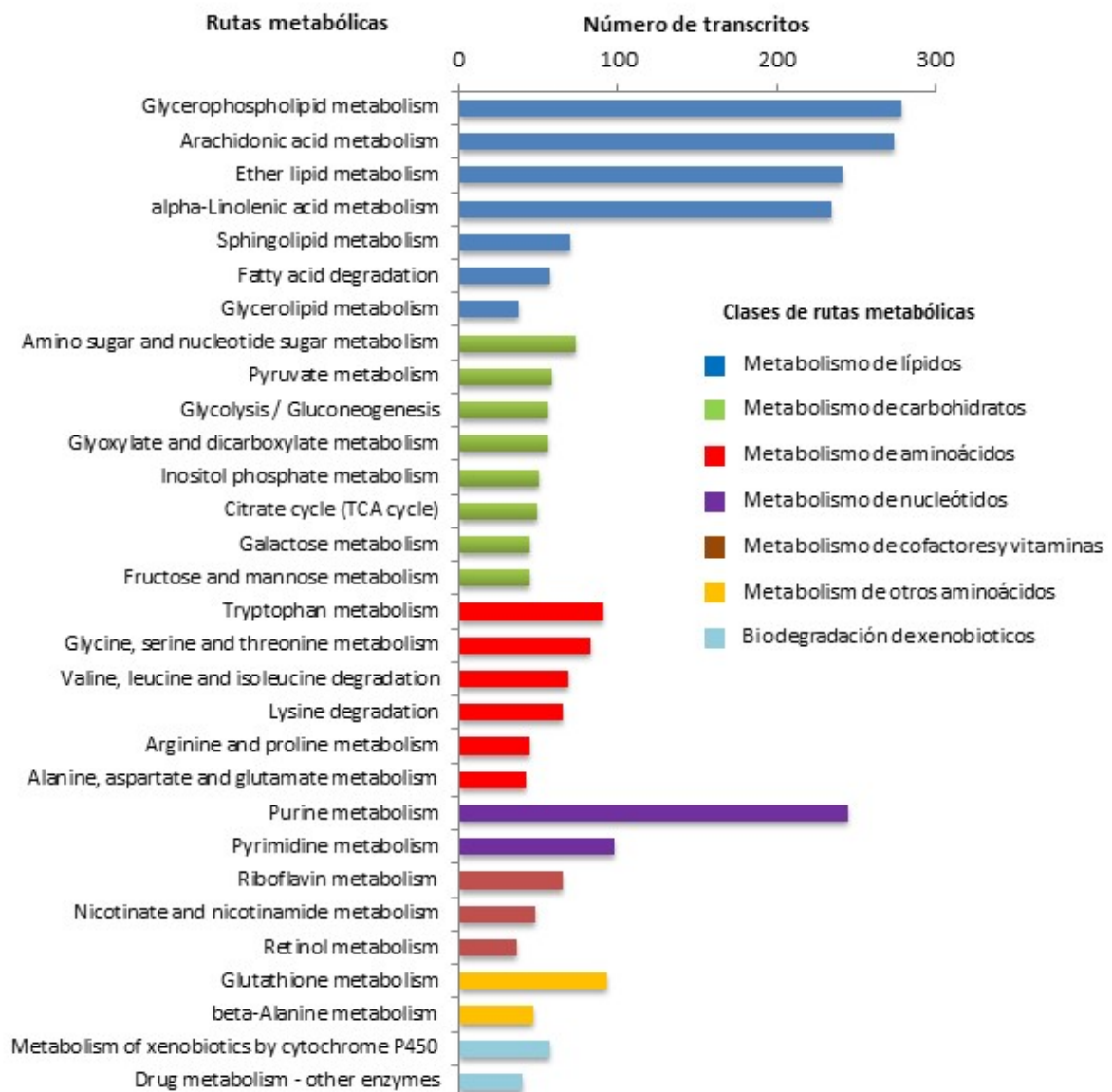


Figura 3.3. Rutas biológicas identificadas en el sialotranscriptoma de *O. erraticus*. Se representan las 30 rutas más abundantes.

1.3. Genes diferencialmente expresados en las glándulas salivales a lo largo del ciclo trofogónico.

Nuestro objetivo en este análisis fue identificar los genes salivales de *O. erraticus* que se expresan de manera diferencial tras la alimentación.

Al igual que en otras especies de argásidos de alimentación rápida, se asume que, antes de la alimentación, los componentes bioactivos de la saliva de *O. erraticus* están sintetizados y almacenados en las glándulas salivales, listos para ser secretados cuando las garrapatas acceden al hospedador. Según esta hipótesis, cabe esperar que, antes de la alimentación, los genes salivales muestren una expresión basal. Una vez que la garrapata ha completado la ingesta de sangre, para poder alimentarse de nuevo, debe sintetizar y reemplazar el conjunto de moléculas bioactivas que ha consumido. Para determinar cuáles son estas proteínas bioactivas y cuándo se expresan, investigamos la expresión génica salival en tres momentos del ciclo trofogónico: antes de la alimentación (día 0, condición basal) y a los 7 y 14 días d.p.a.. Se seleccionaron estos puntos de muestreo porque representan puntos intermedios en el ciclo trofogónico de las hembras de *O. erraticus*, las cuales tardan en completarlo, desde la alimentación hasta la oviposición, entre 19 y 21 días a 28 °C (Encinas-Grandes et al., 1999).

La expresión génica diferencial en las glándulas salivales de *O. erraticus* se evaluó comparando los niveles de expresión génica en los tres estados fisiológicos: 7 d.p.a. frente a no alimentadas o condición basal (7 vs 0), 14 d.p.a. frente a 7 d.p.a. (14 vs 7) y 14 d.p.a. frente a no alimentadas (14 vs 0) (Tabla suplementaria 3.5 y Figura 3.4).

La mayor expresión diferencial se observó a los 7 días después de la alimentación (7 vs 0), con 3.170 transcritos expresados diferencialmente, de los cuales 2.088 estaban sobreexpresados ($\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$) y 1.082 infra-expresados ($\log_2FC < -1$ y $FDR < 0.05$) (Figura 3.4a). Entre los 7 y los 14 d.p.a. (14 vs 7) solo se detectaron ligeras variaciones, con 122 transcritos diferencialmente expresados (Figura 3.4b). La comparación entre los 14 d.p.a. y la condición basal (14 vs 0) reveló 1.482 transcritos diferencialmente expresados, 1.234 de ellos sobreexpresados. Cabe destacar que el 82,3% de los transcritos sobreexpresados diferencialmente a los 14 d.p.a. (1.016) ya habían mostrado una sobre-expresión diferencial a los 7 d.p.a. (Tabla suplementaria 3.5 y Figura 3.4b).

Estos datos, en su conjunto, sugieren que la mayor parte de las proteínas salivales bioactivas secretadas dentro del hospedador durante la ingesta de sangre son sintetizadas y reemplazadas durante los primeros 7 días posteriores a la alimentación. Y también señalan el interés de estudiar la expresión génica salival en periodos de tiempo post-alimentación más breves, como, por ejemplo, cada 24 horas hasta los 7 días. Estos análisis aportarían información más precisa sobre la regulación de la transcripción en cada familia de proteínas salivales y mostraría, previsiblemente, cómo las diferentes familias proteicas -y los diferentes miembros dentro de cada familia particular- son expresados diferencialmente en función del tiempo post-alimentación, de forma similar a lo que se ha observado en los ixódidos durante su prolongado proceso de alimentación.

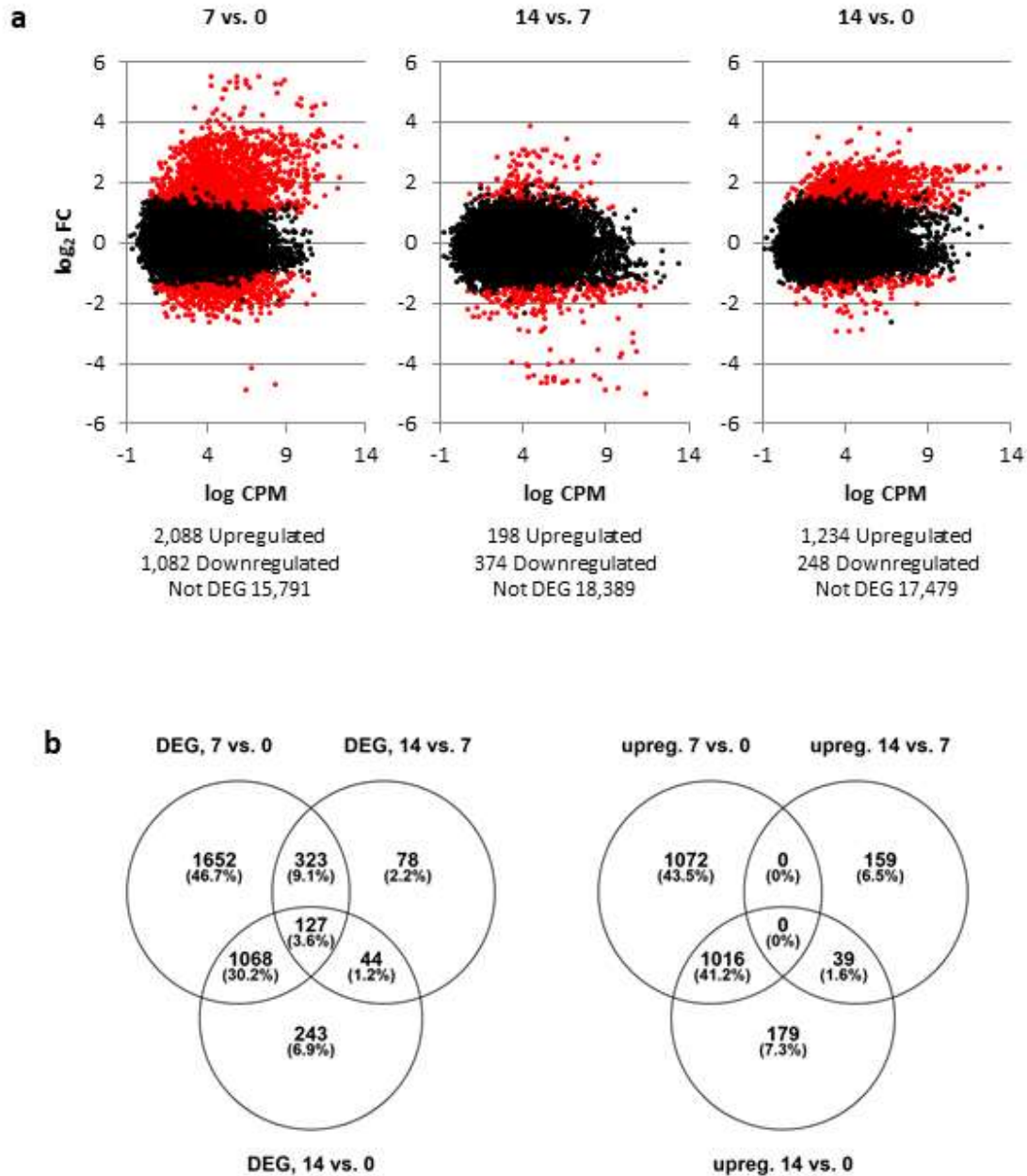


Figura 3.4. Expresión diferencial del sialotranscriptoma de *O. erraticus*. **a)** Diagramas volcán que representan el “ $\log_2$ fold change ($\log_2 FC$)” frente al “ $\log_{10}$ de cuentas por millón” ($\log CPM$) para cada transcrito en las tres comparaciones. Se consideraron expresados diferencialmente aquellos transcritos con un $\log_2 FC \geq 1$ ó ≤ -1 y una $FDR < 0.05$ (en rojo). Los transcritos fuera de este rango no se consideran diferencialmente expresados (en negro). **b)** Diagramas de Venn que muestran el número total de genes expresados diferencialmente (DEG, panel izquierdo) y el de los genes sobreexpresados diferencialmente (upreg., panel derecho) en cada comparación. Comparaciones: 7 vs 0 (7 d.p.a. frente a no alimentadas); 14 vs 7 (14 frente a 7 d.p.a.) y 14 vs 0 (14 d.p.a. frente a no alimentadas).

Los ixódidos, que son garrapatas de alimentación lenta, sintetizan parte de sus proteínas salivales durante el proceso de alimentación y regulan la expresión de los genes que las codifican a lo largo de este proceso, produciéndose una serie de cambios consecutivos en la composición de su sialoma y su saliva. Este fenómeno se conoce por el nombre de “switching” del sialoma y

de la saliva, y se considera que es un mecanismo por el cual las garrapatas pueden evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y adaptar su alimentación a diferentes especies de hospedadores (Karim et al., 2015; Tirloni et al., 2016; de Castro et al., 2017; Perner et al., 2018; Ribeiro et al., 2020).

En argásidos no se ha descrito un fenómeno de “switching” del sialoma/saliva. Esto es algo en principio lógico, ya que son garrapatas de alimentación rápida. La corta duración de dicha alimentación (minutos) haría innecesario este tipo de mecanismo de evasión inmunitaria. No obstante, hay que señalar que el patrón de expresión génica en las glándulas salivales de argásidos durante la alimentación nunca ha sido analizado y permanece desconocido.

En el caso de *O. erraticus* este análisis es técnicamente complejo, ya que las hembras de esta especie finalizan la toma de sangre en aproximadamente 15 minutos, y esta complejidad técnica puede explicar la falta de estudios sobre la expresión génica salival durante la alimentación en argásidos. Por otra parte, actualmente solo se dispone de unos pocos sialomas de argásidos y los estudios sobre patrones de expresión de genes salivales de argásidos antes y después de la alimentación son aún muy incipientes.

1.4. Significado biológico de los genes diferencialmente expresados. Análisis de enriquecimiento.

Para averiguar el significado biológico de los cambios de expresión génica observados en las glándulas salivales de las hembras alimentadas, analizamos los genes diferencialmente expresados en las bases de datos KEGG Pathways y Gene Ontology.

Los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento de términos GO se muestran en la Tabla suplementaria 3.6. Adicionalmente, en la Figura 3.5 se muestran los 20 procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares más abundantemente representados en los genes sobreexpresados en cada una de las tres comparaciones.

Hasta 98 términos GO estaban sobrerrepresentados de forma significativa ($FDR < 0.05$) en al menos una de las tres comparaciones: 36 procesos biológicos, 53 funciones moleculares y 9 componentes celulares.

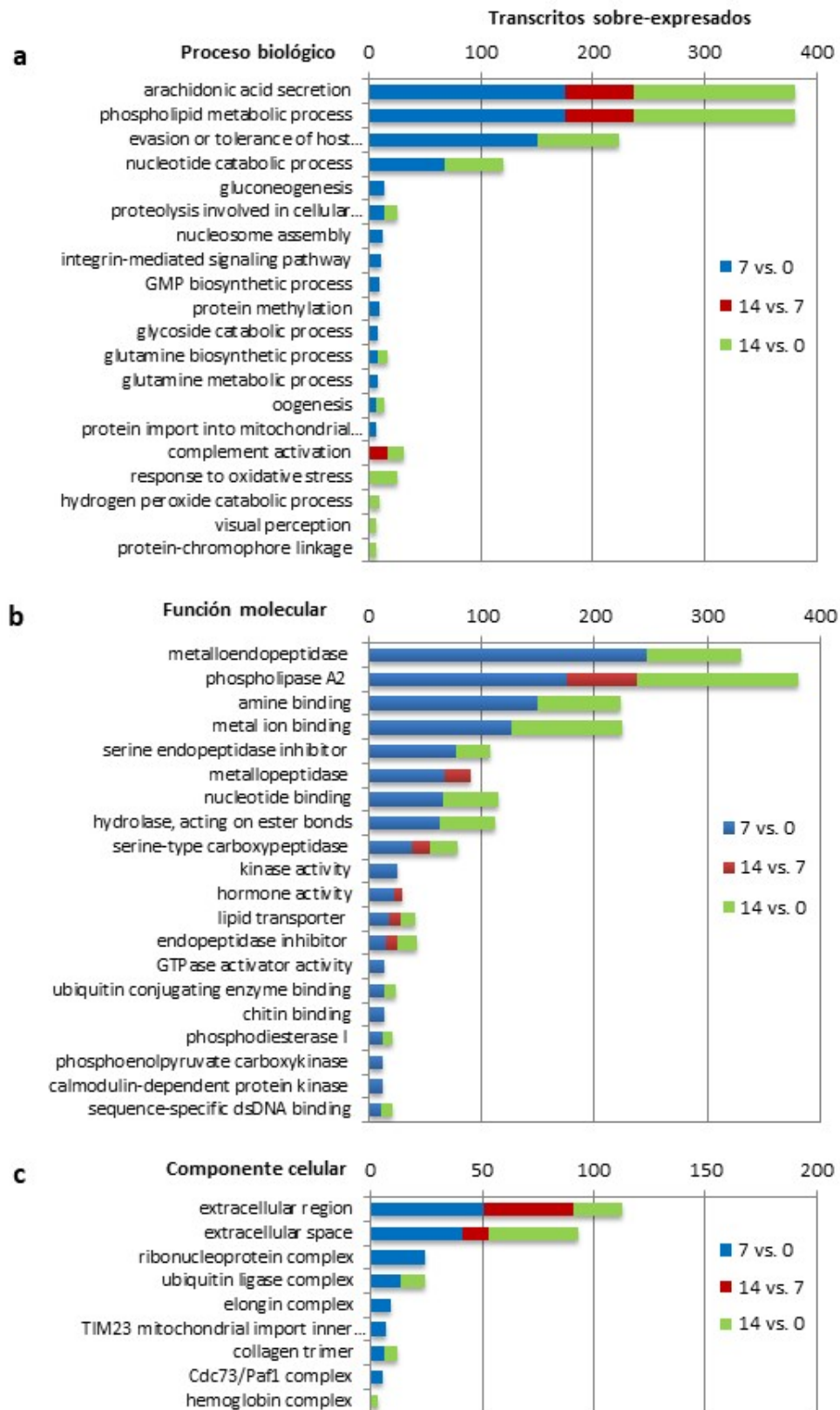


Figura 3.5. Análisis de enriquecimiento de términos GO del sialotranscriptoma de *O. erraticus* sobreexpresado tras su alimentación. Se representan los 20 términos GO más abundantemente representados. **a)** Proceso biológico, **b)** función molecular y **c)** componentes celulares. Comparaciones: 7 vs 0 (7 d.p.a. frente a no alimentadas); 14 vs 7 (14 frente a 7 d.p.a.) y 14 vs 0 (14 d.p.a. frente a no alimentadas).

En la categoría de procesos biológicos, el análisis de enriquecimiento mostró que 20, 11 y 20 términos GO estaban significativamente sobrerrepresentados en las comparaciones 7 vs 0, 14 vs 7 y 14 vs 0 respectivamente (Tabla suplementaria 3.6). En la Figura 3.5a se observa que, en los 20 procesos biológicos más representados, las categorías con el mayor número de secuencias correspondían a proteínas relacionadas con la secreción de ácido araquidónico, el metabolismo de fosfolípidos, la evasión o tolerancia a la respuesta inmune del hospedador y el catabolismo de nucleótidos.

En funciones moleculares, los análisis de enriquecimiento revelaron que 37, 10 y 34 términos GO estuvieron sobrerrepresentados en las comparaciones 7 vs 0, 14 vs 7 y 14 vs 0 respectivamente (Tabla suplementaria 3.6). La Figura 3.5b muestra que a los 7 y a los 14 post-alimentación, la mayoría de las secuencias sobreexpresadas tienen actividad metalopeptidasa, fosfolipasa A2 (PLA2), de unión a aminas y a iones metálicos, y actividad inhibidora de serina peptidasas. Todas estas ontologías están relacionadas con los grupos funcionales y las familias proteicas altamente sobreexpresadas a los 7 y a los 14 d.p.a. Estas incluyen proteínas con actividad de fosfolipasa A2 (PLA2), 5'-nucleotidasas/apirinas, lipocalinas, metalopeptidasas e inhibidores de proteasas, todas ellas con importantes funciones que posibilitan la ingesta de sangre por parte de la garrapata (Charrier et al., 2018).

Con respecto a los componentes celulares, tan sólo 8, 2 y 5 términos GO estuvieron sobrerrepresentados, respectivamente, en las comparaciones 7 vs 0, 14 vs 7 y 14 vs 0 (Tabla suplementaria 3.6). La mayoría de estos términos GO aparecen asignados a secuencias con localización extracelular, muy probablemente relacionadas con la síntesis y secreción de proteínas en la saliva (Figura 3.5c).

El análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas en los genes diferencialmente expresados reveló: (i) una sobrerrepresentación significativa ($FDR < 0.05$) de 9 rutas metabólicas (agrupadas en 5 clases) en al menos una de las tres comparaciones, y (ii) una sobrerrepresentación significativa de 6, 4 y 8 rutas metabólicas en las comparaciones 7 vs 0, 14 vs 7 y 14 vs 0, respectivamente (Tabla suplementaria 3.7 y Tabla 3.2). Este patrón de enriquecimiento a lo largo del ciclo trofagónico es similar al observado en el enriquecimiento de términos GO y al de los genes sobreexpresados ya que la mayoría de las rutas enriquecidas se detectaron en las comparaciones 7 vs 0 y/o 14 vs 0, las cuales agrupaban 733 y 625 secuencias, respectivamente. Las tres rutas metabólicas detectadas en las clases “metabolismo de carbohidratos” y “metabolismo de aminoácidos” se encontraron enriquecidas solamente en la comparación 14 vs 0 (37 secuencias), mientras que la única ruta metabólica detectada en la clase “biodegradación y metabolismo de xenobióticos” sólo estaba enriquecida en la comparación 7 vs 0 (15 secuencias) (Tabla 3.2).

En general, la mayoría de las rutas metabólicas más representadas están relacionadas con el metabolismo de lípidos, aminoácidos, carbohidratos, energía y xenobióticos, siendo las rutas del metabolismo de lípidos las que contenían el mayor número de secuencias (Tabla 3.2). Esta observación concuerda con el elevado número y el alto nivel de expresión de transcritos sobreexpresados anotados como enzimas con actividad PLA2 (Figura 3.5.), las cuales participan en varias rutas del metabolismo de lípidos, como glicerofosfolípidos, ácido araquidónico, éter-lípidos y ácido alfa-linoleico.

Tabla 3.2. Rutas metabólicas enriquecidas significativamente en las glándulas salivales de *O. erraticus* en cada una de las tres comparaciones.

Class	Pathway ID	Pathway	Seq in pathway	Num DE seq in pathway		
				vs 0	4 vs 7	4 vs 0
Lipid metabolism	map00590	Arachidonic acid metabolism	274	81	1	48
	map00564	Glycerophospholipid metabolism	279	76	1	44
	map00565	Ether lipid metabolism	242	76	1	44
	map00592	alpha-Linolenic acid metabolism	235	76	1	44
Carbohydrate metabolism	map00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	52			7
Amino acid metabolism	map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	40			1
	map00350	Tyrosine metabolism	34			
Energy metabolism	map00910	Nitrogen metabolism	17			
Xenobiotics biodegradation and metabolism	map00983	Drug metabolism - other enzymes	40	5		

Comparaciones: 7 vs 0 (7 d.p.a. frente a no alimentadas); 14 vs 7 (14 frente a 7 d.p.a.) y 14 vs 0 (14 d.p.a. frente a no alimentadas). “Seq in pathway”, número de secuencias incluidas en la ruta metabólica. “Num DE seq in pathway”, número de secuencias enriquecidas.

1.5. Principales grupos y familias de proteínas sobreexpresados después de la alimentación.

El interés de nuestro estudio recayó principalmente en los grupos y familias de proteínas que participan en la fijación y alimentación de las garrapatas, incluidas las involucradas en la modulación de las respuestas defensivas del hospedador, ya que estas proteínas pueden ser dianas apropiadas para el desarrollo de vacunas anti-garrapata. En este contexto, asumimos que los genes salivales diferencialmente sobreexpresados después de la alimentación serían, precisamente, los que codifican las proteínas bioactivas que *O. erraticus* necesita para poder alimentarse de nuevo. Por lo tanto, entre los grupos y familias de proteínas que se sobreexpresaron a los 7 y los 14 días después de la alimentación (comparaciones 7 vs 0 y 14 vs 0), nos centramos en los que mostraron los mayores niveles de expresión en RPKM.

Estos grupos son lipocalinas, metaloproteasas, proteasas distintas de metaloproteasas, inhibidores de proteasas, proteínas con actividad PLA2, 5'-nucleotidasas/apirinas, proteínas de cola ácida, cola básica y sin cola (respectivamente, “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless proteins”), y proteínas de unión al grupo hemo (Figura 3.6 y Tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6). En conjunto, estos grupos acumulan el 80,9% y el 83,5% de la expresión total del transcriptoma anotado y sobreexpresado a los 7 y a los 14 días post-alimentación, respectivamente. Y, precisamente, la mayoría de estos grupos y familias proteicas son también las más abundantes en los sialomas de otras especies de argásidos e ixódidos (Araujo et al., 2019; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

La Figura 3.6 muestra, para cada uno de estos grupos/familias, el número de transcritos sobreexpresados, el nivel de expresión en RPKM y su ratio de expresión (en porcentaje) con respecto a la expresión total en RPKM del transcriptoma anotado y sobreexpresado a los 7 d.p.a. (Figura 3.6a) y 14 d.p.a. (Figura 3.6b).

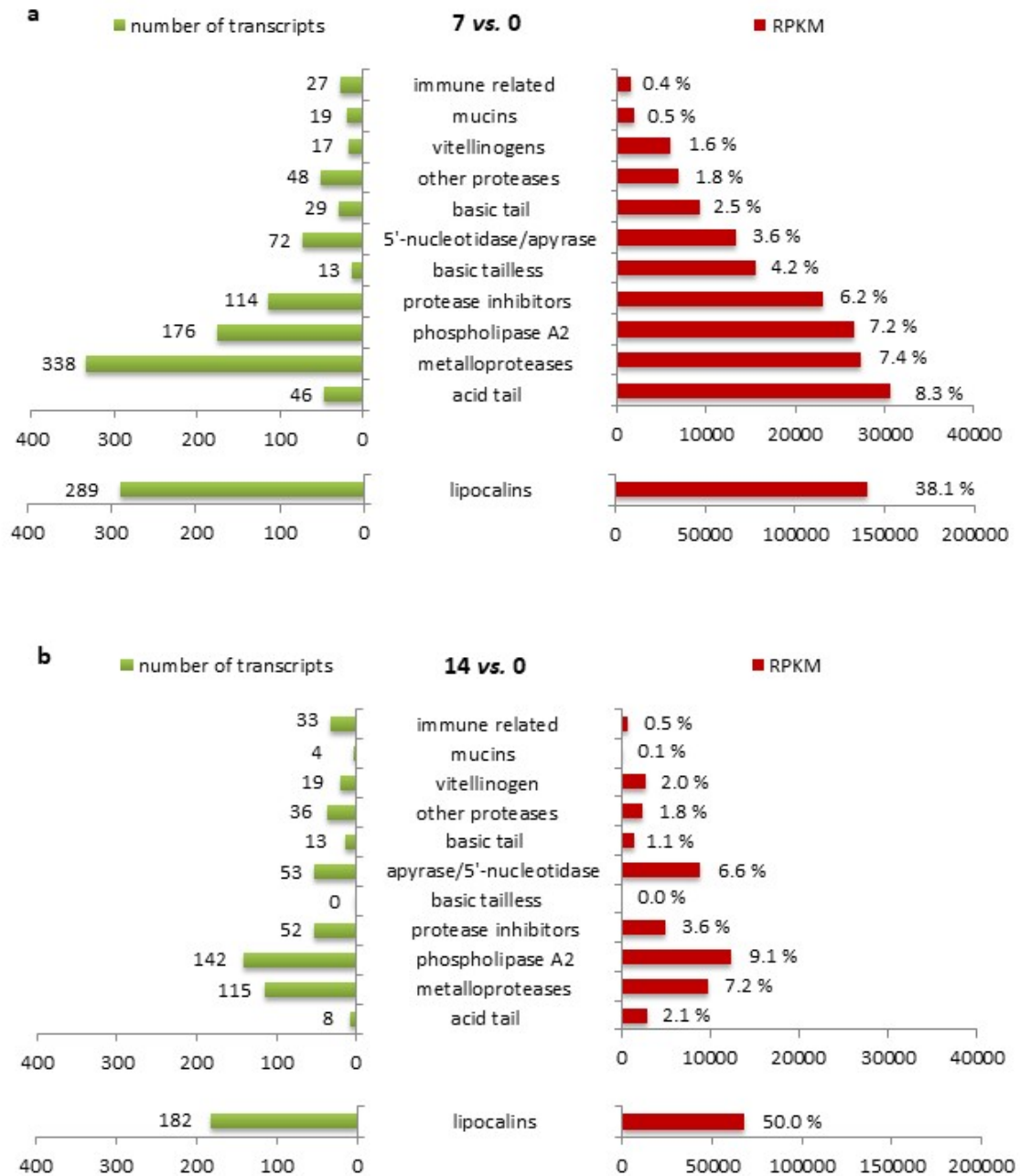


Figura 3.6. Número de transcritos sobreexpresados y anotados (barras verdes) y nivel de expresión en RPKM (barras rojas) para cada familia/grupo de proteínas en las comparaciones: **(a)** 7 d.p.a. frente a no alimentadas (7 vs 0) y **(b)** 14 d.p.a. frente a no alimentadas (14 vs 0). Los porcentajes indicados en las barras rojas representan la proporción entre el nivel de expresión de cada grupo/familia de proteínas y la expresión global en RPKM del transcriptoma sobreexpresado anotado.

A los 7 d.p.a., la familia de las lipocalinas mostró el mayor nivel de expresión (140.291 RPKM) y fue la segunda en número de transcritos sobreexpresados ($n= 289$). Las lipocalinas representaron cerca del 38,1% de la expresión total del transcriptoma sobreexpresado, con un nivel de expresión 5 veces mayor que el de los restantes grupos/familias (Figura 3.6a). En el resto de los grupos la ratio de expresión se encontraba entre el 8,3% y el 1,6%. En estas familias, las metaloproteasas y las proteínas con actividad PLA2 mostraron el mayor número de transcritos (388 y 176 respectivamente), mientras que el número de proteínas “acid tail” fue relativamente bajo ($n= 46$) considerando el nivel de expresión que mostraron en conjunto (8,3%) (Figura 3.6a). Una situación similar se observó en el sialotranscriptoma de *O. rostratus*, donde tan sólo se anotaron 7 transcritos como proteínas “acid tail”, que, no obstante, representaban el 21% de todo el mRNA de las glándulas salivales (Araujo et al., 2019).

A los 14 d.p.a., en la mayoría de los grupos, el nivel de expresión y el número de transcritos resultó significativamente menor, especialmente en el grupo de proteínas “acid tail”, “basic tail” y en las proteínas “basic tailless”. Por el contrario, las proteínas de unión al grupo hemo (vitellogeninas) mostraron un ligero incremento en cuanto al número de transcritos sobreexpresados y a sus niveles de expresión (Figura 3.6b).

1.6. Análisis de los grupos de proteínas más abundantemente sobreexpresadas a los 7 d.p.a.

Teniendo en cuenta el interés de los grupos y familias de proteínas anteriormente mencionadas como potenciales antígenos vacunales, en esta sección se analizan con mayor profundidad las proteínas más abundantemente expresadas.

1.6.1. Lipocalinas.

La familia de las lipocalinas es una de las más numerosas, diversas y abundantes en los sialomas de las garrapatas. Estas proteínas secretadas desempeñan funciones importantes en la evasión de las respuestas hemostáticas, inflamatorias e inmunitarias del hospedador, principalmente como secuestradores de aminas biogénicas (histamina) y eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) (Oleaga et al., 2007; Díaz-Martin et al., 2013a; Araujo et al., 2019; Chmelar et al., 2019; Kim et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

En este estudio encontramos 289 transcritos anotados como lipocalinas (Tabla 3.3, Figura 3.6a). De ellos, hasta 145 (50%) fueron anotados con el código InterPro “IPR002970 Tick Histamine-binding protein” (Tabla suplementaria 3.2), lo que sugiere que, para poder alimentarse, *O. erraticus* debe evitar la reacción inflamatoria inducida por la liberación de histamina en la lesión de alimentación.

De los transcritos restantes, hasta 130 se anotaron como moubatina, proteínas similares a la moubatina o TSGP2. Todos ellos pertenecen al “grupo de la moubatina”, que incluye, por un lado, proteínas inhibidoras de la agregación plaquetaria y neutrofílica al retirar el tromboxano A2 (TXA2) y el leucotrieno B4 (LTB4) respectivamente, y por otro, proteínas que inhiben la activación del complemento al secuestrar el componente C5 (Roversi et al., 2007; Beaufays et al., 2008; Mans et al., 2008a, 2008b). La abundancia de moubatinas en el sialotranscriptoma

sobreexpresado sugiere que el bloqueo de la hemostasia y de la inmunidad innata del hospedador es crucial para que *O. erraticus* pueda alimentarse.

Tabla 3.3. Lipocalinas y 5'-nucleotidasas/apirinas sobreexpresadas a los 7 d.p.a. (7 vs 0).

Description	Accession	No. transcripts	RPKM 0	RPKM 7	Log ₂ FC
Lipocalins					
Lipocalin	ABI52664, ABI52661, ABI52807, ASV59774	61	2,930.76	13,014.59	1.10-3.98
Monotonin	ABI52654	4	569.23	5,714.97	3.11-3.52
Moubatin, moubatin-like	ABR23415, ABR23399, ABR23347, ABR23414, ABR23462, ABR23457, ABR23458, ABR23380, ACB70378	128	6,039.08	52,417.05	1.06-4.34
Salivary lipocalin	ACB70384, ABR23445, ACB70352, ABR23418, ACB70348, ABR23386, ABR23385, ACB70377, ABR23357, ACB70386, ABR23394	138	9,266.83	63,248.20	1.12-3.81
Salivary secreted lipocalin	ABR23443, ACB70358	9	1,104.44	4,980.50	1.43-3.39
Savicalin	ADI60053	2	176.64	837.51	2.13-2.25
TSGP2	AAN76829	2	38.49	111.91	1.51-1.56
5'-nucleotidasas/apyrases					
5'-nucleotidase, putative	B7QDH9, B7QKF1	3	69.35	155.018	1.15-1.30
5'-nucleotidase, ecto, putative	B7QI36	2	16.14	37.64	1.19-1.36
5'-nucleotidase/putative apyrase	ABS30896, ABS30897, ACB70391	42	1,239.92	4,759.81	1.21-2.64
5'-nucleotidase-like	XP_027236452	2	52.08	136.51	1.35-1.40
Apyrase	AGJ90350, ETN57989	23	2,050.19	8,280.60	1.15-2.32

Nota: Para cada proteína, se indican los códigos de acceso y el número de transcritos asignados, el nivel de expresión promedio en RPKM a tiempo 0 (RPKM 0) y a los 7 d.p.a. (RPKM 7), y el rango de log₂FC alcanzado.

También se identificaron dos transcritos anotados como savicalina. La savicalina ha sido recientemente identificada en los hemocitos, el intestino medio y los ovarios de *Ornithodoros kalaharensis*, especie anteriormente designada como *O. savignyi*, pero nunca en sus glándulas salivales (Bakkes et al., 2018). Otros estudios habían demostrado que la savicalina se sobreexpresa en el intestino medio y los ovarios después de la alimentación, y en los hemocitos después de un estímulo bacteriano, pudiendo participar tanto en el desarrollo de la garrapata después de la alimentación como en la defensa antimicrobiana (Cheng et al., 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, la presencia de la savicalina en las glándulas salivares/saliva de una

garrapata es un dato novedoso y su función, aunque desconocida, podría estar relacionada con la protección contra los patógenos adquiridos durante la alimentación.

El patrón de expresión de las lipocalinas descrito para *O. erraticus* es similar al encontrado en las lipocalinas salivales en otras especies de argásidos como *O. rostratus* y *O. moubata* (Araujo et al., 2019; Oleaga et al., 2021a).

1.6.2. 5'-Nucleotidasas/apirasa.

Estas enzimas hidrolizan el ATP y el ADP hasta AMP y son comunes en la saliva de los artrópodos hematófagos. Interfieren en la hemostasia del hospedador al hidrolizar el ADP liberado por las células endoteliales en el lugar de la picadura. Este mecanismo previene la agregación plaquetaria y neutrofílica, así como la formación de trombos, lo que permite el mantenimiento del flujo de sangre al lugar de la picadura y facilita la alimentación de la garrapata (Stutzer et al., 2009; Bensaoud et al., 2018; Masoud et al., 2020).

Se han identificado hasta 72 transcritos anotados como 5'-nucleotidasas/apirasa, que representan el 3,6% de la expresión total del transcriptoma sobreexpresado a los 7 días post-alimentación (Tabla 3.3 y Figura 3.6a). Estas enzimas están presentes en los sialomas de garrapatas duras y blandas lo que refleja el importante papel antihemostático que tienen estas enzimas en el proceso de alimentación (Francischetti et al., 2008a 2008b; Stutzer et al., 2009; Díaz-Martin et al., 2013a; Araujo et al., 2019; Mans et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

De hecho, el bloqueo de la apirasa mediante anticuerpos inducidos por la inmunización del hospedador con una apirasa recombinante, redujo significativamente la alimentación de *O. moubata*, demostrando que las 5'-nucleotidasas/apirasa son candidatos prometedores para el desarrollo de vacunas anti-garrapata (Díaz-Martín et al., 2015a).

1.6.3. Proteasas.

Se han encontrado hasta 386 transcritos sobreexpresados y anotados como proteasas, la mayoría de los cuales fueron metaloproteasas (338 transcritos), seguidos por serina proteasas (47 transcritos) y cisteína proteasas (1 transcrito) (Tabla 3.4 y Figura 3.6a).

Tabla 3.4. Proteasas sobreexpresadas diferencialmente a los 7 d.p.a. (7 vs 0).

Description	Accession	No. transcripts	RPKM 0	RPKM 7	Log ₂ FC
Metalloproteases					
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 8 (ADAMs)	KFM57926	1	10.98	24.49	1.16
Carboxypeptidase Q	AMO02552	1	12.20	40.37	1.73
Endothelin converting enzyme	KZC14076, XP_022117928, B7QLL2, B7PLU3	6	79.37	205.27	1.04-1.93
Hypothetical protein B7P43_G04849	PNF39037	1	3.64	10.07	1.46
Hypothetical protein DAPPUDRAFT_187662	EFX85417	2	4.50	11.38	1.31-1.36
Hypothetical protein Phum_PHUM474680	EEB17615	2	2.97	12.91	2.11-2.14
Hypothetical protein TSAR_002326	OXU27510.1	1	6.08	25.88	2.09
Membrane metallo-endopeptidase	ODM96912, XP_015911874, KFM79078	3	18.65	66.46	1.58-2.23
Metalloprotease	BAE00066, ABI52776, BAF43575, ABI52714, ABI52747, ABI52815, ABI52719, BAE72661, ABI52779, ABI52738, BAE72664, ABI52662, ABI52652, B7Q2B8, B7PPE9, B7Q2C1, B7Q4I3, DAA34338	125	4,024.53	14,474.84	1.08-3.24
Metalloprotease 1	AIE44747, AIE44750, AIE44753	4	103.52	277.06	1.04-1.59
Metalloprotease 2	AIE44748	1	26.01	57.17	1.14
Metalloprotease 4	AIE44755	7	127.35	290.99	1.07-1.61
Metis1 protein	CAO00625	14	204.99	574.06	1.09-2.25
Metis2 protein	CAO00626	4	21.61	61.89	1.32-1.61
Metis3 protein	CAO00627	32	494.29	1,754.92	1.00-2.41
Metis4 protein	CAO00628	9	335.26	1,281.06	1.08-2.61
Metis5 protein	CAO00629	1	14.89	86.24	2.53
M20 domain-containing peptidase	B7P153	3	4.84	11.43	1.14-1.24
Neprilysin	XP_001849326, ISCW024547-PA, B7QAF9, B7Q3V5, B7PL32, AAL91975, DAA34245	14	868.32	2,009.44	1.03-2.49

Neprilysin-1	XP_019696599, XP_022255642	9	88.88	340.64	1.12- 2.55
Neprilysin-2	XP_015795185, XP_026818640, XP_008476829, XP_023343136, XP_019868485	9	294.8	845.97	1.17- 2.06
Neprilysin-4	XP_024228249, XP_026469709	2	40.41	126.42	1.63- 1.65
Neprilysin-11	RWS07493, XP_001600059	4	39.64	89.24	1.00- 1.44
Peptidase M12B domain- containing protein	B7QM92	15	518.28	2,083.55	1.03- 3.55
Peptidase-like protein	ADF28505	1	17.18	55.67	1.70
Salivary gland metalloprotease	AAZ39657, AAZ39658, AAZ39659 EEC19961, EEC18166, DAA34140, DAA34198	20	268.52	791.84	1.16- 1.84
Secreted metalloprotease	B7Q2C0, B7QM91, AAM93653	7	77.82	335.34	1.39- 2.98
Truncated metalloprotease	ABR23495	7	199.09	635.98	1.09- 2.05
Venom metalloproteinase 3-like	XP_008547408, XP_014223136	2	21.04	75.98	1.85- 1.86
Venom metalloproteinase antarease-like TtrivMP_A	XP_018494555, XP_022665601	3	35.09	128.99	1.30- 1.90
Zinc-dependent metalloprotease	ACB70344	28	159.78	572.61	1.00- 3.37
Serine proteases					
Carboxypeptidases	B7QF76	14	149.98	383.33	1.28- 1.47
Lysosomal protective protein	XP_013784602	3	9.64	28.98	1.47- 1.77
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	XP_015927829, KFM77940, XP_013787581	11	46.45	234.46	1.78- 2.73
Scpep1	PRD34546	2	269.79	1,921.7	2.82- 2.84
Serine carboxypeptidases	B7PJ32, B7PJ51, DAA34155,	14	538.04	4,083.83	2.87- 3.09
Serine protease K12H4.7	XP_003742341	1	2.03	18.12	3.15
Venom serine carboxypeptidase	XP_017788931, XP_026806100	2	6.68	75.55	3.15- 3.60
Cysteine proteases					
Midgut cysteine proteinase 4	AAO60047	1	8.17	17.33	1.08

Nota: Para cada proteína, se indican los códigos de acceso y el número de transcritos asignados, el nivel de expresión promedio en RPKM a tiempo 0 (RPKM 0) y a los 7 d.p.a (RPKM 7), y el rango de Log₂FC alcanzado.

Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas que requieren un ion metálico, normalmente Zn^{2+} , para su actividad catalítica. Están presentes a lo largo de toda la escala evolutiva, desde bacterias hasta mamíferos, y son componentes importantes del veneno de las serpientes, donde actúan como agentes hemorrágicos (Giebler et al., 2016; Tasoulis et al., 2017).

En garrapatas, las metaloproteasas han sido identificadas en el intestino medio, los ovarios, las glándulas salivales y la saliva, donde son abundantes y variadas (Ali et al., 2015a; Chmelar et al., 2019; Ribeiro et al., 2020). Las metaloproteasas salivales desempeñan importantes funciones relacionadas con la alimentación sanguínea y la modulación de las respuestas defensivas del hospedador. Estas funciones incluyen la degradación de proteínas de la matriz extracelular en el punto de la picadura, la degradación de fibrinógeno y fibrina para prevenir la coagulación sanguínea, la degradación de mediadores inflamatorios y la inhibición de la reparación de los tejidos del hospedador (Stutzer et al., 2009; Ali et al., 2015a; Araujo et al., 2019; Bensaoud et al., 2019; Giachetto et al., 2020). Teniendo en cuenta estas funciones, no es sorprendente que las metaloproteasas sean las enzimas más abundantemente representadas tanto en el sialotranscriptoma de *O. erraticus* (338 transcritos, Tabla 3.4) como en el sialoma de otras especies de garrapatas (Mans et al., 2008a; Bensaoud et al., 2018; Araujo et al., 2019; Bensaoud et al., 2019; Kim et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

El grupo de las metaloproteasas representa un amplio repertorio de enzimas, algunas de las cuales han sido caracterizadas funcionalmente. Por ejemplo, las enzimas conocidas como “desintegrina y metaloproteína con motivos de trombospodina” (ADAMs), “peptidasa M18B” y la “enzima convertidora del endotelio” actúan como vasodilatadores y reguladores de la presión sanguínea (Luque et al., 2003; Macours et al., 2004). Las metaloproteasas “Metis” actúan como agentes fibrinolíticos anticoagulantes y como inhibidores de la cicatrización de heridas (Decrem et al., 2008), y las neprilisininas pueden regular la respuesta inflamatoria e inmune del hospedador (Turner et al., 2001). Dado que estas funciones pueden facilitar la alimentación sanguínea, algunos ortólogos de estas metaloproteasas han sido probados como antígenos para vacunas anti-garrapata (Decrem et al., 2008; Ali et al., 2015a).

Las serina-proteasas también son componentes habituales de los sialomas de ixódidos y argásidos. Se cree que facilitan la toma de sangre mediante la regulación de varios mecanismos defensivos del hospedador, tales como la remodelación de la matriz extracelular, la respuesta inmune innata y la inflamación, la coagulación de la sangre y la fibrinólisis (Francischetti et al., 2009; Díaz-Martin et al., 2013a; García et al., 2014; Bensaoud et al., 2018; Ribeiro et al., 2020). En el transcriptoma sobreexpresado identificamos hasta 47 transcritos de serina proteasas, lo que podría indicar su participación en la alimentación de *O. erraticus* (Tabla 3.4).

Únicamente se identificó una cisteína proteasa, la cisteína proteasa 4 del intestino medio (AAO60047), la cual está relacionada con la cathepsina-L de *Rhipicephalus* spp. (Ali et al., 2015b). La cathepsina-L participa en la digestión de sangre de las garrapatas y se sobreexpresa en el intestino medio de *O. erraticus* después de la alimentación (Oleaga et al., 2018). No existe información disponible de su posible función en la saliva, pero un estudio reciente ha mostrado que una cathepsina-L de *Rhipicephalus microplus* impide la coagulación inducida por la trombina mediante la degradación del fibrinógeno impidiendo su transformación en fibrina, lo que contribuye a mantener la fluidez de la sangre (Xabier et al., 2019). Es evidente que, si este

mecanismo anticoagulante estuviera presente en la saliva de la garrapata, también contribuiría a mantener la fluidez de la sangre y facilitaría su ingesta.

1.6.4. Inhibidores de proteasas.

La mayoría de las respuestas defensivas del hospedador que las garrapatas deben superar para realizar la toma de sangre (hemostasia, inflamación y respuesta inmune) son mediadas por proteasas (Ali et al., 2015a; Xavier et al., 2019). Por lo tanto, para evadir estas defensas y facilitar la alimentación sanguínea, los sialomas de las garrapatas contienen abundantes inhibidores de proteasas, principalmente inhibidores de serina y cisteína proteasas (Chmelar et al., 2017; Almeida et al., 2020).

En las garrapatas los inhibidores de serina proteasas se clasifican en 4 grupos: Inhibidores con dominios Kunitz, inhibidores con dominios Kazal, inhibidores de tripsina con dominios ricos en cisteína (TIL) y serpinas

Los inhibidores Kunitz son los más abundantes en los sialomas de las garrapatas y forman una gran familia de proteínas antihemostáticas que son secretadas e inhiben varias proteasas de la cascada de coagulación, principalmente la trombina y el factor X activado (FXa) (Corral-Rodríguez et al., 2009; Ribeiro et al., 2020).

Los inhibidores con dominios Kazal son menos abundantes en los sialomas de las garrapatas y sus funciones son desconocidas (Chmelar et al., 2017; Ribeiro et al., 2020).

La familia de los inhibidores con dominios TIL incluyen inhibidores de la quimotripsina, la elastasa y de la tripsina. Algunos miembros de esta familia son conocidos por interferir con la respuesta inflamatoria del hospedador y otros han sido caracterizados como péptidos antimicrobianos (Giachetto et al., 2020).

Las serpinas actúan como supresores del sistema inmune del hospedador e inhibidores de la agregación plaquetaria y de la coagulación sanguínea (Tirloni et al., 2016; Chmelar et al., 2017).

Por su parte, los inhibidores de las cisteína-proteasas o cistatinas hallados en garrapatas se clasifican en dos tipos. Las cistatinas tipo 1, que son intracelulares y participan en la digestión intracelular de la hemoglobina, mientras que las cistatinas tipo 2 son, en su mayoría, secretadas al hospedador con la saliva, donde actúan como inmunomoduladores (Chmelar et al., 2017).

En total, se hallaron 114 transcritos de inhibidores de proteasas sobreexpresados a los 7 d.p.a. (Tabla 3.5 y Figura 6a). Los inhibidores con dominios Kunitz fueron los más abundantes, con un total de 86 transcritos, incluyendo a las savignygrinas y las proteínas similares a las papilinas. Las savignygrinas son inhibidores de la agregación plaquetaria pertenecientes al grupo de las desintegrinas, que fueron identificadas por primera vez en *O. kalaharensis* (Mans et al., 2002); recientemente también se ha identificado un ortólogo de la savignygrina en el sialoma de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a). Las papilinas son proteínas con múltiples dominios Kunitz que se encuentran en la matriz extracelular y participan en la formación de la membrana basal y en el desarrollo embrionario (Fessler et al., 2004; Keeley et al., 2020). Recientemente, en los sialomas de *O. rostratus* y de *O. moubata*, también se han identificado varias papilinas, aunque se desconoce su función (Araujo et al., 2019; Oleaga et al., 2021a).

Tabla 3.5. Inhibidores de proteasas diferencialmente sobreexpresados a los 7 d.p.a. (7 vs 0).

Description	Accession	No. transcripts	RPKM 0	RPKM 7	Log ₂ FC
Kunitz domain-containing proteins					
Carboxypeptidase inhibitor SmCI-like isoform X2	XP_022249736	1	5.601	55.65	3.31
Chymotrypsin inhibitor	BAM28739, ACF57858, XP_020288964, XP_019890240	7	128.53	290.81	1.10-1.27
CLUMA_CG020329, isoform A	CRL07350	1	26.10	63.20	1.28
Dual kunitz salivary protein	ABR23474, ACB70326 ACB70328, ACB70330	24	963.30	10,876.82	1.71-5.17
Hypothetical protein B4U80_08130	RWS20793	1	1.28	4.07	1.67
Kunitz domain	ABI52641	2	14.11	45.86	1.69-1.71
Kunitz domain-containing salivary protein	ABR23431	14	1,666.76	5,958.42	1.70-1.94
Kunitz-type serine protease inhibitor	XP_023347625, XP_023347625, PRD26526, ODN00404	4	204.65	823.26	1.98-2.05
Papilin-like	XP_022252622, XP_023226201, XP_011307577, XP_026316323, XP_026316271	7	365.94	1,573.38	2.05-2.14
Savignygrin	AAM54047, AAM54048	14	164.70	789.52	2.15-2.44
Serine protease inhibitor	B7PWG9, B7PG23, B7Q3H2	11	96.72	537.99	2.45-2.58
TIL-domain inhibitors					
Chymotrypsin-elastase inhibitor	P83516	2	21.52	217.19	3.33-3.34
Ixodidin	ACB70299	4	486.49	6,598.35	3.35-4.24
Riddle, putative (Fragment)	B7QLA0	3	67.50	1,349.76	4.25-4.48
Trypsin inhibitor-like	XP_028178942.1	1	2.26	51.32	4.51
Other protease inhibitors					
Alpha-2-macroglobulin	AAN10129, XP_023243497	14	421.09	3,730.10	2.60-3.29
Cystatin	AZB52851	1	27.13	55.61	1.03
Kazal-type serine protease inhibitor domain protein	DAA34653	2	57.08	118.07	1.04-1.05
Pregnancy zone protein-like	XP_022257127	1	1.74	17.44	3.32

Notas: Para cada proteína, se proporcionan los códigos de acceso y el número de transcritos asignados, el nivel de expresión promedio en RPKM a tiempo 0 (RPKM 0) y a los 7 d.p.a. (RPKM 7), y el rango de Log₂FC alcanzado.

Los restantes inhibidores de proteasas sobreexpresados incluyen varios inhibidores con dominios TIL, alfa-2 macroglobulin (α 2M), un inhibidor con dominio Kazal y una cistatina (Tabla 3.5). Entre los inhibidores con dominios TIL, destaca la ixodidina por su elevada sobre-expresión (log₂FC 3,35-4,24) y alto nivel de expresión (6.598,35 RPKM). Esta proteína fue purificada por primera vez a partir de los hemocitos de *Rhipicephalus microplus* y se caracterizó como un péptido antimicrobiano (Fogaca et al., 2006), lo que sugiere que, en la saliva de *O. erraticus*, podría tener una función similar. Las α 2Ms pertenecen a una familia de inhibidores universales

de proteasas conservada a lo largo de la evolución que participan principalmente en la inmunidad innata frente a los ataques proteolíticos indeseados. Varios estudios han demostrado la participación de estas proteínas en la defensa inmune de las garrapatas duras y blandas contra varios microorganismos (Kopacek et al., 2000; Buresova et al., 2009). Más recientemente, Saravanan et al. (2003) y Oleaga et al., (2021a) encontraron que la $\alpha 2M$ se expresa en las glándulas salivales de *O. moubata* y que se sobreexpresa tras la ingesta de sangre, en paralelo con nuestros resultados. Teniendo en cuenta que la $\alpha 2M$ humana actúa como anticoagulante secuestrando cantidades sustanciales de trombina libre (Cvirn et al., 2001), es posible que, además de las funciones en la inmunidad de las garrapatas, la $\alpha 2M$ pueda ejercer también como anticoagulante salival. La elevada cantidad de $\alpha 2M$ detectada en la saliva de *Amblyomma americanum* a lo largo de la alimentación apoya esta hipótesis (Kim et al., 2020).

1.6.5. Fosfolipasa A2 (PLA2).

La PLA2 constituye una superfamilia de enzimas que hidrolizan fosfolípidos. Esta familia tiene hasta 16 subgrupos e incluye a las PLA2 secretadas en el veneno de los animales y en la saliva de las garrapatas (Francischetti et al., 2009; Zambelli et al., 2017; Ribeiro et al., 2020; Teixeira et al., 2020). Cada PLA2 secretada muestra una especificidad enzimática y distribución tisular y celular específicas, lo que justifica sus muy diversas actividades biológicas. Estas incluyen actividad tóxica, virucida y bactericida, inhibidora de la agregación plaquetaria, anticoagulante, reguladora de la inflamación y de la respuesta inmune del hospedador, así como nuevas formas de señalización celular y de transporte de moléculas a través de membranas (Ibeas et al., 2009; Murakami et al., 2015; Zambelli et al., 2017; Dore et al., 2019).

Las PLA2 secretadas están presentes en los sialomas de garrapatas blandas y duras (Araujo et al., 2019; Oleaga et al. 2021a). Se ha demostrado que una PLA2 secretada de las glándulas salivares de *O. moubata* actúa como ligando antagonista de la P-selectina del hospedador, inhibiendo los procesos hemostáticos y proinflamatorios posteriores a la expresión de la P-selectina en el endotelio vascular dañado (García-Varas et al., 2010; Manzano-Román et al., 2012c). Más recientemente, en el sialotranscriptoma de *O. moubata*, se encontró que el mRNA de la PLA2 se sobreexpresa a los 7 d.p.a., lo que refleja la importancia de las funciones antihemostáticas y antiinflamatorias mostradas por esta proteína en la alimentación de las garrapatas (Oleaga et al., 2021a). De hecho, la inmunización de los animales con la forma recombinante de la PLA2 de *O. moubata* indujo una protección significativa frente a esta garrapata (44%) bloqueando su alimentación, lo que confirma la participación de PLA2 en el proceso de ingestión de sangre y su utilidad como candidato antigénico para la elaboración de vacunas anti-garrapata (Díaz-Martin et al., 2015a).

En el sialotranscriptoma de *O. erraticus* se han detectado 176 transcritos de PLA2 altamente sobreexpresados ($\log_2FC$ 1,5-4,13) a los 7 d.p.a., que representan hasta el 7,2% (26.569 RPKM) de la expresión total del transcriptoma (Tabla 3.6 y Figura 3.6a).

Tabla 3.6. Fosfolipasas A2, proteínas unidoras de grupo hemo, y proteínas “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless” sobreexpresadas diferencialmente a los 7 d.p.a. (7 vs 0).

Notas: Para cada proteína, se proporcionan los códigos de acceso, el número de transcritos asignados, el nivel de expresión promedio en RPKM a tiempo 0 (RPKM 0) y a los 7 d.p.a. (RPKM 7), y el rango de Log₂FC

Description	Accession	No. transcripts	RPKM 0	RPKM 7	Log ₂ FC
Phospholipases A2					
Phospholipase A2	ABR23453, AGJ90343, ISCW020728-PA, ACB70350, ABI52736 ABI52805, AWU67138	176	3,574.67	26,568.99	1.05-4.13
Heme binding proteins					
Apolipoprotein B-100, partial	KFM77310	1	8.67	17.63	1.02
GP80 precursor, partial	AAA92143	1	21.77	543.30	4.64
Hemelipoglyco-carrier protein	AJR36491	4	140.84	327.54	1.18-1.34
Hemelipoglycoprotein precursor	ABD83654	1	103.13	317.73	1.62
Vitellogenin	B7QJ67, BAH02666, AAW78557	8	196.58	4,404.67	3.42-4.99
Vitellogenin-1	ALC78840, ASB34115	2	23.69	432.64	3.83-4.25
Acid tail proteins					
Acid tail salivary protein	ABR23355, ACB70371, ABR23361, ACB70369, ABR23412	46	6,985.63 4	30,613.23	1.16-3.28
Basic tail proteins					
Basic tail salivary protein	ABR23429, ABR23472, ACB70313	8	1,090.89	4,346.36	1.12-2.47
BTSP	ABI52639, ACB70365, ACB70321, ABI52632, ACB70394	21	1,156.79	4,931.17	1.49-3.38
Basic tailless proteins					
Salivary basic tailless protein	ABR23379	13	5,590.63	15,443.41	1.18-1.83

alcanzado

1.6.6. Proteínas unidoras del grupo hemo

El grupo hemo, que contiene hierro, es un componente funcional de muchas hemoproteínas y es necesario para la fisiología normal de las garrapatas. Como las garrapatas son incapaces de sintetizar el grupo hemo, deben obtenerlo a partir de la sangre ingerida. Sin embargo, como el grupo hemo en estado libre es tóxico para las células de las garrapatas, su distribución, almacenamiento y detoxificación deben estar estrictamente regulados (Koreny et al., 2013; Perner et al., 2016b).

Las proteínas unidoras de hemo, incluyendo a las hemolipoglicoproteínas (CP) y las vitelogeninas (Vgs), participan en la eliminación y la detoxificación del exceso de hemo libre y en el transporte y almacenamiento de lípidos. Además, las Vgs son precursoras de la vitelina, que es una proteína esencial para el desarrollo de los huevos y para la oviposición (Donohue et

al., 2009; Ibeas et al., 2009; Boldbaatar et al., 2010; Koreny et al., 2013; Murakami et al., 2015; Perner et al., 2016b; Dore et al., 2019).

Se pensaba que las Vgs son sintetizadas en el intestino medio y el cuerpo graso y que están ausentes en las glándulas salivales, donde el transporte y almacenamiento del grupo hemo dependería de las CP (Gudderra et al., 2002; Donohue et al., 2009; Boldbaatar et al., 2010). Sin embargo, en estudios recientes se ha detectado mRNA de Vgs en las glándulas salivales de *Rhipicephalus bursa* (Antunes et al., 2018) y de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a), donde se sobreexpresan en respuesta a la ingesta de sangre. Adicionalmente, se han identificado varias Vgs en los proteomas salivales de *A. americanum* (Kim et al., 2020) y *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2013a). Debido a la actividad proinflamatoria del grupo hemo, se ha especulado que las proteínas unidoras de hemo secretadas en la saliva podrían reducir la concentración del grupo hemo libre en el lugar de la picadura y, por tanto, su toxicidad y potencial proinflamatorio (Antunes et al., 2018; Kim et al., 2020). También se ha sugerido que las CP de la saliva de las garrapatas funcionan como antioxidantes y transportadores de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos (Maya-Monteiro et al., 2004; Antunes et al., 2018).

Encontramos 17 transcritos sobreexpresados de proteínas similares a la Vg, que se unen al grupo hemo y que representan el 1.6% de la expresión total del transcriptoma salival obtenido a los 7 días de la alimentación (Tabla 3.6 y Figura 6a), coincidiendo con lo observado en otros sialomas (Kim et al., 2020; Oleaga et al., 2021a). Esto sugiere que las Vgs son sintetizadas en las glándulas salivales de *O. erraticus* en grandes cantidades y que son secretadas con la saliva al hospedador. Estos hallazgos, junto con su alta inmunogenicidad hacen que estas proteínas sean candidatos antigénicos prometedores para el desarrollo de vacunas anti-garrapata (Antunes et al., 2018).

1.6.7. Proteínas “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless”.

Las proteínas “basic tail” son una superfamilia de proteínas específicas de garrapatas con cientos de miembros que reciben su nombre por tener, la mayoría de ellas, un extremo carboxi-terminal muy básico, con numerosos residuos de arginina y lisina. Por el contrario, otros miembros de esta familia tienen una cola ácida, compuesta principalmente por glutamato, y reciben el nombre de “acid tail proteins”. Otros miembros de esta superfamilia no disponen de dicha cola y son nombrados como “basic tailless proteins” (Francischetti et al., 2009; Chmelar et al., 2019). Estas proteínas se encuentran en cantidades abundantes en los sialotranscriptomas de ixódidos y argásidos, lo que sugiere que ejercen una función específica e importante en la interacción garrapata-hospedador. Sin embargo, solo unas pocas han sido caracterizadas como anticoagulantes e inhibidores del complemento, para la mayoría de ellas se desconocen sus funciones (Francischetti et al., 2009; Perner et al., 2018; Araujo et al., 2019; Chmelar et al., 2019; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

Se han identificado hasta 46 transcritos sobreexpresados como proteínas “acid tail”, 29 “basic tail” y 13 “basic tailless” que representan el 8,3%, 2,5% y 4,2% respectivamente de la expresión del transcriptoma salival a los 7 días de la alimentación (Tabla 3.6 y Figura 6a). Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente en otras especies de argásidos e ixódidos (Perner et al., 2018; Araujo et al., 2019).

Desde la perspectiva de la búsqueda de nuevos candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata, este grupo de proteínas tendrían la ventaja adicional de no tener ninguna homología con proteínas del hospedador evitando así los efectos de posibles reacciones cruzadas.

Los resultados de este objetivo han sido publicados en el siguiente artículo (ver ANEXO):

Pérez-Sánchez R, Carnero-Morán Á, Soriano B, Llorens C, Oleaga A. RNA-seq analysis and gene expression dynamics in the salivary glands of the argasid tick *Ornithodoros erraticus* along the trophogonic cycle. *Parasit Vectors*. 2021 Mar 20;14(1):170. doi: 10.1186/s13071-021-04671-z.

OBJETIVO 2.

PROTEOMA DE LA DE SALIVA DE MACHOS Y HEMBRAS DE *ORNITHODOROS ERRATICUS*

Nuestro objetivo ha sido obtener y comparar cuantitativa y cualitativamente el proteoma de la saliva de machos y hembras de *O. erraticus*. Con este fin preparamos 3 muestras replicadas de la saliva de cada sexo (F1, F2, F3 de hembras y M1, M2, M3 de machos), las cuales fueron primeramente examinadas en geles de acrilamida SDS-PAGE para comprobar su reproducibilidad y posteriormente fueron analizadas mediante dos técnicas proteómicas: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y espectrometría de masas con adquisición de datos en ventanas secuenciales (SWATH-MS).

2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la saliva de hembras y machos de *O. erraticus*

La electroforesis en gel de acrilamida de las muestras de saliva mostró un patrón de bandas muy similar entre las muestras replicadas de cada sexo y bastante diferente entre las muestras de machos y hembras (Figura 3.7). Ambos sexos presentaron numerosas bandas con pesos moleculares que oscilaron entre los 10 y los 260 kDa. Sin embargo, en la saliva de hembras las bandas más numerosas y más intensas estuvieron entre los 100 y los 300 kDa, mientras que en la de los machos variaron entre los 10 y los 100 kDa. Estos patrones de bandas mostraron una buena reproducibilidad entre las muestras del mismo sexo y anticipan algunas diferencias en la composición proteica de la saliva de machos y hembras.

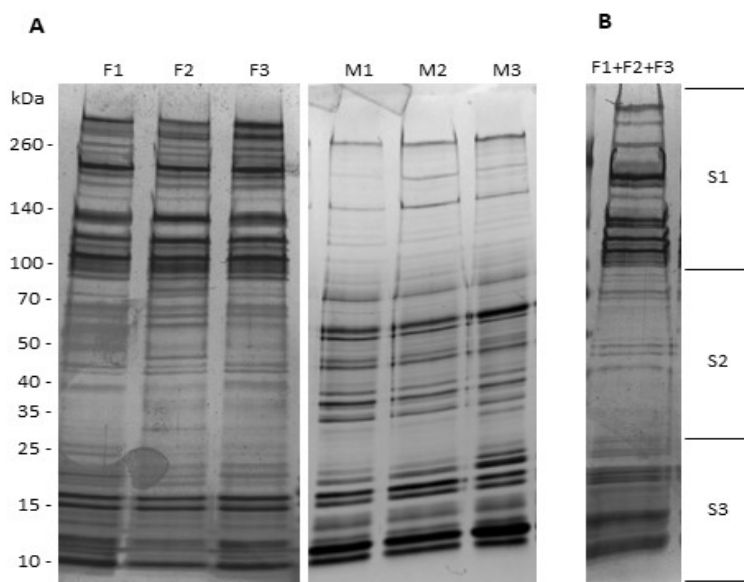


Figura 3.7. A. Gel de acrilamida en gradiente 5-20% de las muestras de saliva (4 µg/pocillo) de hembras (F1, F2, F3) y machos (M1, M2, M3) de *O. erraticus* teñido con nitrato de plata. **B.** Gel de acrilamida en gradiente 5-20% teñido con Coomassie Blue. El carril del gel se cortó en tres fragmentos y los fragmentos resultantes (S1, S2, S3) fueron digeridos con tripsina y analizados mediante LC-MS/MS.

2.2. Proteínas identificadas por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en modo de adquisición dependiente de datos (DDA)

Las muestras de saliva de machos y hembras fueron digeridas y analizadas por separado mediante LC-MS/MS en modo DDA. Con esta técnica se detectaron hasta 469 proteínas en la saliva de los machos (Tabla suplementaria 3.8), pero sólo 332 proteínas en la saliva de las hembras (datos no mostrados). Esta diferencia estaría reflejando los diferentes patrones de bandas observados entre la saliva de hembras y machos, en los geles de acrilamida (Figura 3.7). En hembras, las proteínas de más de 100 kDa son claramente más abundantes que el resto y podrían, en consecuencia, enmascarar la identificación de otras menos abundantes (Figura 3.7a).

Con el fin de conseguir una mejor caracterización del proteoma de la saliva de las hembras, las 3 réplicas de saliva de hembras se mezclaron y se separaron en un gel de acrilamida, que se dividió en 3 partes, cada una de la cuales se analizó mediante LC-MS/MS en modo DDA (Figura 3.7b). Este análisis permitió la identificación de 470 proteínas en la saliva de hembras (Tabla suplementaria 3.8). Estos resultados, significativamente mejores, son los que se utilizaron para la anotación de las proteínas de hembras en la biblioteca espectral de referencia (ver más adelante). Los correspondientes informes generados por ProteinPilot para machos y hembras, que contienen los datos de espectros, péptidos y proteínas, pueden ser consultados en los Archivos de datos suplementarios 3.1 y 3.2.

La información obtenida de la saliva de los machos, procesada en solución, y la de la saliva de hembras, procesada en gel, se combinaron para generar la biblioteca espectral de referencia utilizada en el análisis de los datos adquiridos por SWATH-MS (Archivo de datos suplementario 3.3).

Los datos espectrométricos y de identificación extraídos de estas librerías se resumen en la Figura 3.8 y en la Tabla suplementaria 3.8. En la saliva de hembras y machos se han detectado 470 y 469 proteínas respectivamente. Tras eliminar las secuencias no anotadas y las identificaciones redundantes, obtuvimos, en hembras y machos dos listados de 274 y 263 proteínas respectivamente. De estas, 152 proteínas eran comunes en ambos sexos y 122 y 111 proteínas fueron exclusivas de machos o hembras, respectivamente (Figura 3.8a). Este resultado indica que la saliva de machos y hembras tiene distinta composición proteica, ya que aparentemente sólo el 39,5% de las proteínas identificadas son expresadas por ambos sexos. Con respecto a la biblioteca espectral de referencia, se identificaron 639 proteínas. Tras eliminar las proteínas no anotadas y las identificaciones redundantes, se obtuvo una lista depurada de 380 proteínas únicas anotadas (Tabla suplementaria 3.8). Esta biblioteca de espectros se empleó como referencia para el análisis de los datos adquiridos mediante SWATH-MS. En conjunto, agrupando estas tres listas (machos, hembras, biblioteca de espectros) se identifican un total de 387 proteínas únicas.

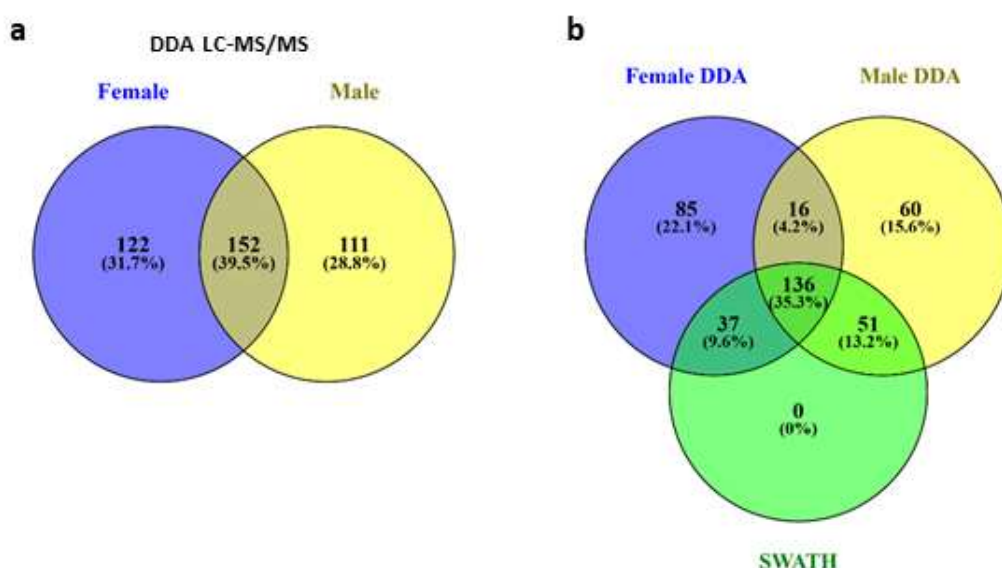


Figura 3.8. Diagramas de Venn que muestran el número de proteínas salivales de hembras y machos detectadas por DDA LC-MS/MS (a) y por DDA y SWATH-MS (b).

La Tabla suplementaria 3.9 muestra las 387 proteínas identificadas, su cuantificación mediante el método SWATH-MS, así como su anotación y clasificación funcional. El número de proteínas identificadas en la saliva de *O. erraticus* es comparable con aquellas encontradas en otros estudios proteómicos recientes de la saliva de otros argásidos y refleja un nivel de complejidad y redundancia funcional similar al de éstos (Mans et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Martins et al., 2021; Oleaga et al., 2021b). Estos resultados mejoran significativamente los estudios proteómicos de la saliva en *O. erraticus* realizados anteriormente utilizando SDS-PAGE bidimensional y MALDI-TOF/TOF, en los que únicamente se llegaron a identificar 6 proteínas (Oleaga et al., 2007).

2.3. Proteínas detectadas mediante SWATH-MS

Mientras que los métodos de adquisición dependientes de datos (DDA) se basan en la selección aleatoria y posterior fragmentación de un número fijo de precursores peptídicos, generalmente los más intensos, en la adquisición de datos SWATH-MS todos los péptidos ionizados de una muestra dada que caen dentro de un rango determinado de masa/carga (m/z) se fragmentan de manera sistemática utilizando ventanas de aislamiento de precursores bastante grandes (Ludwig et al., 2018). Varios estudios han demostrado que SWATH-MS puede conseguir mejores resultados que el método LC-MS/MS, al aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad de la identificación de proteínas y péptidos en múltiples réplicas (Collins et al., 2017; Krasny et al., 2018; Oleaga et al., 2021b).

Teniendo en cuenta lo anterior, nos propusimos comprobar si SWATH-MS podría detectar y cuantificar un mayor número de proteínas en la saliva de machos y hembras de *O. erraticus* que LC-MS/MS, lo que también permitiría comparar los niveles de expresión de proteínas entre sexos. Por lo tanto, las muestras individuales de saliva de hembras y de machos fueron

analizadas mediante SWATH-MS y los resultados se compararon con los obtenidos por LC-MS/MS.

En la saliva de las hembras, se identificaron 274 proteínas por el LC-MS/MS y 224 proteínas fueron cuantificadas por el método SWATH (Tablas suplementarias 3.8 y 3.9). Hasta 173 de estas proteínas fueron detectadas por ambos métodos, identificándose 101 proteínas exclusivamente por LC-MS/MS y ninguna exclusivamente por el método SWATH-MS (Figura 3.8b). En la saliva de los machos, 263 proteínas fueron identificadas por LC-MS/MS y 224 fueron cuantificadas mediante SWATH-MS (Tabla suplementaria 3.9). Hasta 187 proteínas salivales de machos fueron detectadas por ambos métodos, 76 exclusivamente por LC-MS/MS y ninguna exclusivamente mediante SWATH-MS.

Aunque SWATH-MS no superó a LC-MS/MS en cuanto al número total de proteínas identificadas (224 frente a 387), cabe señalar que SWATH-MS detectó más proteínas comunes en ambos sexos que LC-MS/MS, es decir, 224 frente a 152 (Figura 3.8a). Esto representa un incremento del 47,4% en la identificación de proteínas comunes e indica que al menos el 57,9% (224/387) de todas las proteínas identificadas en la saliva de *O. erraticus* se expresan en ambos sexos, lo cual reduce las diferencias cualitativas observadas mediante LC-MS/MS y sugiere que se trataría más bien de diferencias cuantitativas.

En Ixódidos, las diferencias en la composición proteica de la saliva de hembras y machos son bien conocidas desde hace tiempo (Tan et al., 2015; Bensaoud et al., 2019). Estas diferencias estarían relacionadas con las diferencias entre los sexos en términos de comportamiento alimenticio, anatomía y funciones de sus glándulas salivales, teniendo en cuenta que los machos toman mucha menos sangre y en algunas especies no se alimentan (Bior et al., 2002; Bowman et al., 2008; Aljamali et al., 2009).

A diferencia de los ixódidos, los argásidos no presentan diferencias anatómicas o funcionales aparentes en las glándulas salivales entre sexos. También muestran una estrategia alimenticia similar, puesto que ingieren cantidades de sangre equivalentes en relación a su peso corporal y lo hacen durante un periodo de tiempo similar. Esto significa que las hembras y machos de los argásidos se enfrentan a las mismas repuestas defensivas del hospedador durante el mismo periodo de tiempo. En consecuencia, cabe suponer que ambos sexos utilizarán el mismo repertorio de proteínas salivales para neutralizar las defensas del hospedador y completar la alimentación (Díaz-Martín et al., 2013a).

En contraste con esta hipótesis, los diferentes patrones de banda que se muestran en la Figura 3.7 y los diferentes grupos de proteínas identificadas por el método LC-MS/MS en la saliva de machos y hembras sugiere diferencias cualitativas entre sexos en la composición proteica de la saliva de *O. erraticus*. Sin embargo, es importante señalar que el sialotranscriptoma de *O. erraticus* utilizado en este estudio como base de datos para la identificación de proteínas fue obtenido solamente de las glándulas salivales de las hembras, lo cual nos hace suponer que:

1. Es muy probable que la mayoría de las proteínas identificadas en el presente estudio, incluyendo las detectadas solamente en machos, también se expresen en la saliva de las hembras.

2. Las proteínas detectadas exclusivamente en las hembras en este estudio, muy probablemente se encuentren expresadas únicamente en las hembras.
3. Las proteínas salivales que realmente sean expresadas exclusivamente por los machos, si es que hay alguna, no se habrían detectado en el presente estudio.

En consecuencia, es probable que la mayoría de las diferencias observadas entre los sexos se deban principalmente a diferencias cuantitativas en la expresión, y en menor medida a la genuina ausencia o presencia de proteínas concretas en uno u otro sexo. Los resultados cuantitativos obtenidos por SWATH-MS también respaldan esta hipótesis, como se muestra en apartados posteriores.

La diferente composición proteica de la saliva de machos y hembras ya se había observado en otras especies, concretamente en *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2013a; Oleaga et al., 2021b). Los motivos de estas diferencias en la composición salival de esta especie siguen siendo desconocidas, pero es posible que estén relacionados con el procesamiento de la sangre ingerida y/o con los procesos de atracción entre sexos y apareamiento (Horigane et al., 2010; Díaz-Martín et al., 2013a).

2.4. Anotación funcional y clasificación de las proteínas identificadas en la saliva de *O. erraticus*

Las 387 proteínas identificadas en la saliva de adultos de *O. erraticus* fueron anotadas funcionalmente y caracterizadas empleando la base de datos “Gene Ontology (GO)” y las bases de datos InterPro, Pfam y Panther asociadas con los códigos IDs de UniProt (Tabla suplementaria 3.9).

Se asignaron términos GO a 223 proteínas; estos incluyeron 121 componentes celulares, 114 funciones moleculares y 208 procesos biológicos, los cuales fueron visualizados empleando la “Web Gene Ontology Annotation Plot” (WEGO) (Ye et al., 2018) (Figura 3.9).

Los componentes celulares se clasificaron en 13 categorías, de los cuales los más abundantemente representados fueron: células y partes celulares (n= 136), orgánulos y partes de orgánulos (n= 59), membranas y las partes que la componen (n= 58) y regiones extracelulares y sus partes (n= 48). En la clasificación por función molecular se obtuvieron ocho categorías, siendo las categorías más abundantemente representadas aquellas relacionadas con la actividad catalítica (n= 112) y las relacionadas con la unión (n= 107). La clasificación de los procesos biológicos resultó en 18 categorías. Las dos más abundantes fueron los procesos celulares (n= 82) y los procesos metabólicos (n= 78).

Esta distribución de términos GO es similar a la de los sialotranscriptomas de hembras de *O. erraticus* (Objetivo 1) y de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a) (Figura 3.9).

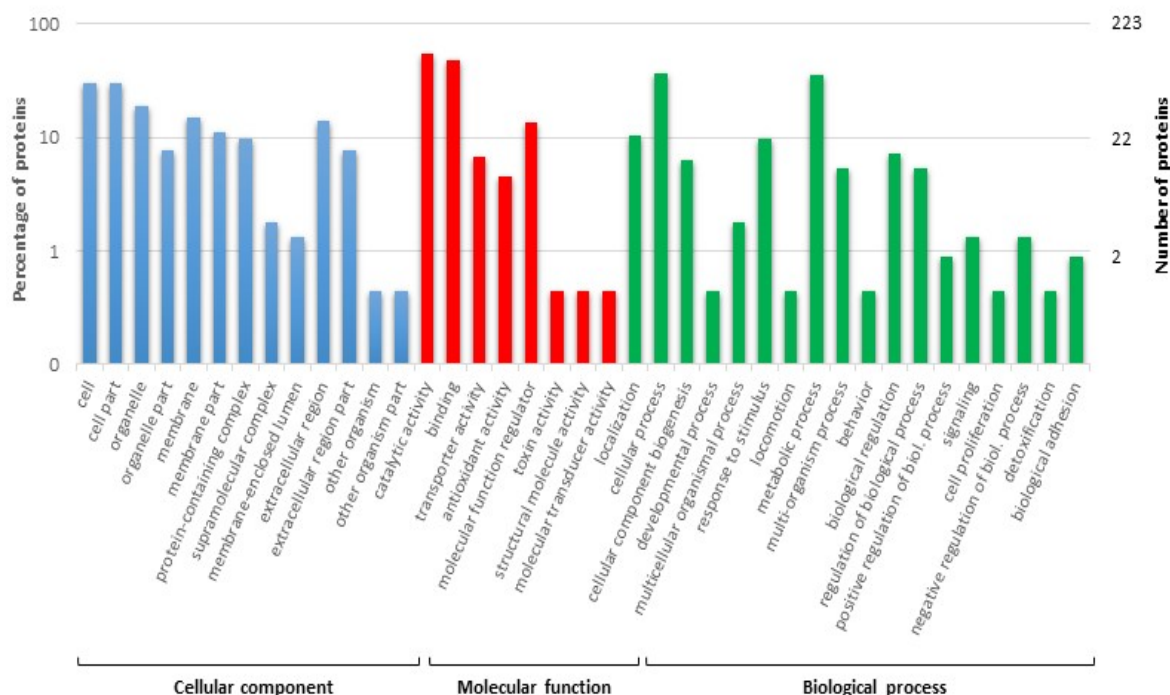


Figura 3.9. Distribución de ontología génica (GO) del proteoma salival de *O. erraticus*. Los términos GO de nivel 2 de componente celular, función molecular y proceso biológico fueron visualizados utilizando WEGO.

La clasificación de las 387 proteínas identificadas utilizando las categorías descritas por Kim et al. (2020) resultó en 24 grupos y familias funcionales (Tabla 3.7 y Tabla suplementaria 3.9). Entre estas, las más numerosas fueron las proteínas involucradas en los procesos metabólicos ($n=71$), proteasas ($n=44$), inhibidores de las proteasas ($n=32$), lipocalinas ($n=25$), antioxidantes ($n=22$) y proteínas con funciones desconocidas ($n=59$) que representan hasta el 15,2% de las proteínas identificadas.

La comparación entre machos y hembras mostró que las lipocalinas, los antioxidantes y las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, energía y ácidos nucleicos fueron más numerosas en machos que en hembras (Tabla 3.7). Típicamente, estos grupos funcionales y familias de proteínas también son los más abundantes en los sialomas de otras especies de garrapatas duras y blandas (Mans et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Martins et al., 2021).

Tabla 3.7. Número de proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos de *O. erraticus* por LC-MS/MS y SWATH-MS clasificadas en 24 grupos/familias funcionales diferentes. Detalles adicionales en la Tabla suplementaria 3.9.

Classification	LC-MS/MS			SWATH (female + male)
	Spectral library (Adult poo)I	Female	Male	
antimicrobial	2	2	2	2
antioxidant/ detoxification*	22	12	19*	16
cytoskeletal	17	14	11	10
extracellular matrix	13	11	5	6
glycine rich	3	3	3	3
heme/ iron binding	11	10	9	10
immune related	12	10	8	7
Lipocalin*	25	18	20*	16
metabolism, amino acids	1	1	1	1
metabolism, carbohydrates*	22	8	20*	19
metabolism, energy*	16	5	14*	7
metabolism, lipids	14	10	10	10
metabolism, nucleic acids*	18	11	15*	6
nuclear regulation	16	13	7	4
protease	44	31	29	24
protease inhibitor	32	28	23	26
proteasome machinery	8	4	4	1
protein modification	9	5	5	5
protein synthesis	5	4	1	1
signal transduction	11	9	4	5
transcription machinery	2	1	1	-
transporter/ receptors	22	16	14	11
transposon element	3	2	2	1
unknown function	59	46	36	33
TOTAL	387	274	263	224

* Grupos y familias funcionales que contienen un mayor número de proteínas en la saliva de machos que en la de hembras.

2.5. Cuantificación de las proteínas identificadas en la saliva de hembras y machos por el método SWATH-MS

Como ya se ha mencionado, el método SWATH-MS es un tipo de análisis que opera en modo de adquisición independiente de datos (DIA) y que se emplea para analizar cuantitativamente muestras complejas con alta reproducibilidad (Ludwig et al., 2018).

Utilizando esta técnica, detectamos y cuantificamos 224 proteínas en la saliva de hembras y machos, las cuales fueron posteriormente clasificadas en 23 grupos y familias funcionales (Tabla 3.7 y Tabla suplementaria 3.9).

Los niveles de expresión de estos grupos de proteínas en ambos sexos, se calcularon como el área media de la señal espectral máxima en las muestras F1, F2, y F3 o M1, M2, y M3 (Tabla suplementaria 3.10 y Figura 3.10).

Las diferencias en la composición proteica a nivel cuantitativo entre la saliva de hembras y machos se muestran en la Figura 3.10. En esta figura se han excluido 33 proteínas con funciones desconocidas y, por su parte, los grupos que contenían menos de 6 proteínas han sido combinados en un único grupo denominado “Other”, que incluye los grupos metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos, modificación proteica, proteínas ricas en glicina, antimicrobianas, matriz extracelular, regulación nuclear, señalización de la traducción, maquinaria del proteasoma, elementos del transposón y síntesis de proteínas.

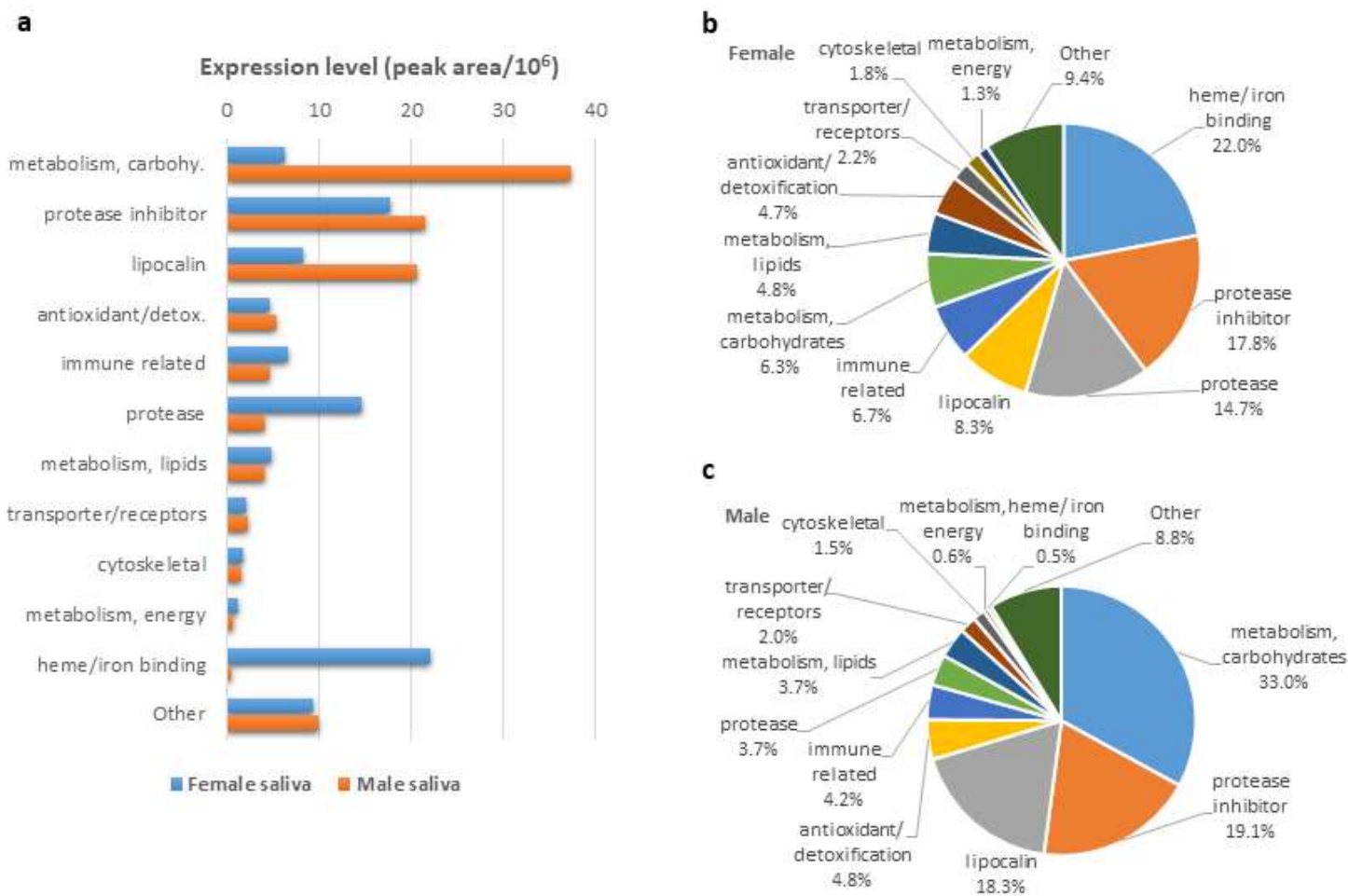


Figura 3.10. Niveles de expresión de las proteínas identificadas, clasificadas por grupos y familias funcionales. **a** Nivel de expresión de la saliva de hembras y machos. **b, c** Gráficos circulares que muestran la abundancia (en porcentaje) de cada grupo/familia funcional en la saliva de hembras (**b**) y machos (**c**).

En la saliva de las hembras las categorías funcionales más abundantemente expresadas fueron las proteínas de unión al grupo hemo que representan el 22% de la masa proteica salival (Figura 3.10 a, b). Las siguientes categorías funcionales en términos de abundancia son los inhibidores de proteasa (17,8%), las proteasas (14,7%), las lipocalinas (8,3%), y las relacionadas con la respuesta inmune (6,7%). Por el contrario, **en la saliva de los machos** las proteínas que participaban en el metabolismo de carbohidratos fueron la categoría funcional más abundante (33,0%), seguida por la de inhibidores de la proteasa (19,1%) y las lipocalinas (18,3%) (Figura 3.10 a, c).

Estos grupos y familias proteicas son comentados en los apartados siguientes.

2.5.1. Proteínas de unión al grupo hemo.

El grupo de proteínas con capacidad para unirse al grupo hemo incluye 5 vitelogeninas (Vgs) y 5 hemolipoglycoproteínas (CPs), siendo las Vgs las más abundantes, ya que suponían el 73,6% de la masa proteica de este grupo (Tabla 3.7, Figura 3.10 y Tabla suplementaria 3.10). El grupo hemo es necesario para el normal desarrollo de diversos procesos de la fisiología de la garrapata, como la embriogénesis de los huevos y la reproducción.

Como se ha indicado en el Objetivo 1, las garrapatas carecen de las enzimas necesarias para la síntesis de hemo y deben obtenerlo de la sangre del hospedador. Las proteínas de unión al hemo, como las Vgs y CPs, participan en la eliminación y detoxificación del exceso de hemo libre, así como en el transporte y almacenamiento de lípidos (Donohue et al., 2009; Koreny et al., 2013; Perner et al., 2016b). Además, las Vgs son precursores de la vitelina, una proteína esencial para el desarrollo de los huevos y la oviposición (Boldbaatar et al., 2010), lo que podría explicar la abundancia de las Vgs en la saliva de las hembras en comparación la de los machos, donde solo representan el 0,45% de su masa proteica total (Tabla suplementaria 3.10).

El mRNA de la Vg ha sido identificado en las glándulas salivales de *Rhipicephalus bursa*, (Antunes et al., 2018), *O. moubata* (Oleaga et al., 2021a) y *O. erraticus* (ver resultados del objetivo 1), y la proteína Vg se detectó abundantemente en la saliva de *A. americanum* (Kim et al., 2020) y *O. moubata* (Oleaga et al., 2021b), lo que coincide con nuestros resultados actuales.

Estos hallazgos coinciden con lo observado en el objetivo 1 y confirman que en las glándulas salivales de las garrapatas se sintetizan proteínas transportadoras de grupo hemo similares a Vgs, las cuales son abundantemente secretadas con la saliva, donde muy probablemente desempeñan funciones importantes que facilitan la alimentación de la garrapata: por ejemplo, como agentes antiinflamatorios, al reducir la concentración de hemo libre en la lesión de alimentación, disminuyendo así su potencial proinflamatorio y citotoxicidad (Antunes et al 2018; Kim et al., 2020), o incluso como antioxidantes y transportadores de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos (Maya-Monteiro et al., 2004).

2.5.2. Inhibidores de proteasas.

Mediante SWATH-MS se han detectado y cuantificado hasta 26 inhibidores de proteasas que representan el 17,8% y el 19,1% de la masa proteica salival de hembras y machos respectivamente, siendo la segunda categoría funcional más abundante en ambos sexos: 23

fueron inhibidores de serina proteasa y los tres restantes inhibidores de cisteína proteasa o cistatinas (Tabla 3.7; Figura 3.10 y Tabla suplementaria 3.10).

La hemocytina fue el inhibidor de proteasas más abundante de la saliva de las hembras, representando el 44,3% de la masa proteica en esta categoría (Tabla suplementaria 3.10). Se trata de una glicoproteína de gran tamaño, ortóloga del factor de von Willebrand humano, y contiene varios dominios TIL y varios dominios homólogos al factor de la coagulación VIII. La hemocytina fue descrita por primera vez en el gusano de seda, *Bombyx mori*, y está relacionada funcionalmente con la respuesta inmune del insecto a los patógenos invasores a través de mecanismos como la coagulación de la hemolinfa, la agregación de los hemocitos y la formación de nódulos (Kotani et al., 1995; Arai et al., 2013). La hemocytina también ha sido detectada en los genomas de las garrapatas (Jia et al., 2020) y, aunque sus funciones aún no se conocen con exactitud, es posible que participe en la defensa contra los patógenos ingeridos con la sangre.

Por otro lado, una thyropina fue el inhibidor de proteasas más abundante de la saliva de los machos (hasta el 20,5% de la masa proteica en esta categoría) y la segunda más abundante en la saliva de las hembras (13,9%) (Tabla suplementaria 3.10). Las thyropinas contienen dominios de tiroglobulina tipo 1 (Thyr-1) y son inhibidoras de cisteína proteasas, pero también de proteasas dependientes de cationes (Lenarcic et al., 1998). Las thyropinas se han identificado en los sialomas y mialomas de varias especies de garrapatas (García et al., 2014; Araujo et al., 2019; Ribeiro et al., 2020). Sus funciones en las garrapatas aún no se conocen, aunque hay indicios de que podrían actuar como inmunomoduladores regulando a las catepsinas endosomales, que son cisteína proteasas que participan en el procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígenos (García et al., 2014).

2.5.3. Proteasas.

Mediante SWATH-MS se identificaron hasta 24 proteasas, incluyendo serina, cisteína, metalo y aspártico proteasas, que representan el 15% y el 4% de la masa proteica salival de hembras y machos, respectivamente (Tabla 3.7 y Figura 3.10).

En la saliva de hembras, las serina-proteasas fueron las proteasas más abundantes, y representaron el 51,1% de la masa proteica de este grupo, seguido por las cisteína-proteasas (37%), las metaloproteasas (10%) y las aspártico-proteasas (1,8%). Por el contrario, en la saliva de los machos, las proteasas más abundantes fueron las cisteína-proteasas (46,9%), seguidas por las serina proteasas (40,1%), metaloproteasas (12,9%) y aspártico proteasas (0,2%) (Tabla suplementaria 3.10).

Se piensa que la función de las serina-proteasas en la saliva es la de facilitar la ingesta de sangre regulando la coagulación de la sangre y la fibrinólisis, la restauración de la matriz extracelular, la inflamación y la inmunidad innata (Francischetti et al., 2009; García et al., 2014; Bensaoud et al., 2018).

En relación con las cisteína-proteasas, se sabe que las catepsinas L y B, junto con la longipaina, se expresan en el tubo digestivo y participan en la digestión de la sangre, la embriogénesis y la transmisión de patógenos (Tsuji et al., 2008; Sojka et al., 2011; Sun et al., 2019). Sin embargo, la abundancia de cisteína-proteasas en la saliva de *O. erraticus* sugiere que también podrían desempeñar alguna función en la alimentación. Como se ha comentado

anteriormente, la catepsina L de *Rhipicephalus microplus* presenta actividad fibrinógenolítica (Xavier et al., 2019), en consecuencia, es posible que las cisteína-proteasas identificadas en la saliva de *O. erraticus* tengan una función anticoagulante similar, contribuyendo a mantener la fluidez de la sangre y, de este modo, facilitar el proceso de alimentación de las garrapatas.

Particularmente, la cisteína-proteasa más abundante de la saliva de *O. erraticus* fue una gamma-glutamyl hidrolasa (GGH). La abundancia de estas enzimas lisosomales en la saliva de *O. erraticus* sugiere que podrían tener una función extracelular en la interrelación garrapata-hospedador, como ya se ha observado en otras enzimas intracelulares, como la fosfolipasa A2 y la enolasa salivales de *O. moubata* que también ejercen funciones extracelulares como agentes antiinflamatorios y antihemostáticos (García-Varas et al., 2010; Manzano-Román et al., 2012c; Díaz-Martín et al., 2013a). Estas proteínas intracelulares con funciones “housekeeping” se identifican con frecuencia en la saliva de las garrapatas duras y blandas, donde son secretadas por mecanismos no clásicos como la secreción apocrina y/o la secreción en microvesículas (exosomas) (Díaz-Martín et al., 2013a; Bensaoud et al., 2019; Oleaga et al., 2021b).

Las metaloproteasas se expresan en el intestino medio, ovario, glándulas salivales y saliva (Ali et al., 2015a; Chmelar et al., 2019; Ribeiro et al., 2020). Las metaloproteasas salivales son bastante abundantes y diversas, y desempeñan funciones variadas relacionadas con la modulación de las respuestas defensivas del hospedador (Ali et al., 2015a; Araujo et al., 2019; Bensaoud et al., 2019). El análisis del potencial inmunoprotector de una metaloproteasa de *R. microplus*, demostró que es un buen candidato para el desarrollo de vacunas anti-garrapata tras proporcionar una protección del 60% (Ali et al., 2015b). Las metaloproteasas son las proteasas más abundantes en el sialotranscriptoma de *O. erraticus* (objetivo 1) así como en el sialoma de otras especies de garrapatas (Araujo et al., 2019; Bensaoud et al., 2018, 2019; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a). Sin embargo, en el proteoma salival de *O. erraticus*, las metaloproteasas son la tercera familia de proteasas más abundantes por detrás de las cisteína y serina proteasas, lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales de regulación post-transcripcional (Tabla suplementaria 3.10).

2.5.4. Lipocalinas.

Como ya se ha mencionado en objetivo 1, las lipocalinas son muy abundantes en el sialoma de las garrapatas, donde contribuyen a evadir las respuestas hemostática, inflamatoria e inmune del hospedador, mediante el secuestro de aminas biogénicas y eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) (Díaz-Martín et al., 2013a; Araujo et al., 2019; Kim et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a).

En este estudio, se observó que las lipocalinas fueron la cuarta familia de proteínas más abundantes en la saliva de las hembras (8,3% de la masa proteica) y la tercera más abundante en la saliva de los machos (18,3% de la masa proteica) (Figura 3.10). Hasta 16 lipocalinas fueron cuantificadas por la técnica SWATH-MS en ambos sexos (Tabla suplementaria 3.10), de las cuales seis pertenecen al grupo que secuestra aminas biogénicas (histamina y serotonina) (Mans et al., 2008c) y otras cuatro pertenecen al grupo de las moubatinas (Mans et al., 2008b). Entre las lipocalinas restantes, la savicalina (AD160053) destacó especialmente por su gran abundancia.

Las lipocalinas secuestradoras de aminas biogénicas fueron más abundantes en la saliva de las hembras, representando hasta el 50,4% de la masa proteica en este grupo (Tabla

suplementaria 3.10). Esta abundancia refleja que, para las hembras de *O. erraticus*, es importante prevenir la reacción inflamatoria inducida por la liberación de histamina en el lugar de la picadura.

Por el contrario, las lipocalinas del grupo de la moubatina fueron las más abundantes en la saliva de los machos con el 60,8% de la masa proteica en el grupo de las lipocalinas (Tabla suplementaria 3.10). Como se ha señalado, el grupo de las moubatinas incluye a inhibidores de la agregación plaquetaria y neutrofílica, que actúan secuestrando el tromboxano A₂ (TXA₂) y el leukotrieno B₄ (LTB₄), así como a inhibidores de la activación del complemento (Roversi et al., 2007; Beaufays et al., 2008; Mans et al., 2008b). La gran abundancia de estas lipocalinas similares a la moubatina en la saliva de los machos sugiere que el bloqueo de la hemostasia y de la respuesta inmune del hospedador sería más importante para los machos que prevenir la reacción inflamatoria mediada por la histamina en el lugar de la picadura.

La savicalina fue también bastante abundante en la saliva de *O. erraticus*, representando el 32,9% y el 11,5% de la masa proteica del grupo de las lipocalinas en hembras y machos, respectivamente. Como se ha indicado en el objetivo 1, una posible función de la savicalina en las glándulas salivales y la saliva de las garrapatas podría estar relacionada con la protección frente a los patógenos adquiridos durante la alimentación.

En contraste con nuestros resultados en *O. erraticus*, las lipocalinas son, con diferencia, las proteínas más abundantes en el proteoma salival de *O. moubata* y *R. microplus* (Díaz-Martín et al., 2013a; Tirloni et al., 2014; Oleaga et al., 2021b), mientras que en el proteoma de las glándulas salivales de ambos sexos de *Hyalomma dromedarii* son completamente marginales, ya que sólo representan el 0,8% de las proteínas secretadas (Bensaoud et al., 2019).

2.5.5. Proteínas relacionadas con la respuesta inmune.

Se han cuantificado siete proteínas relacionadas con la respuesta inmune, que representan en conjunto el 6,7% y 4,2% de la masa proteica salival en hembras y machos, respectivamente (Tabla 3.7 y Figura 3.10). Las más abundantes fueron una “proteína A” unidora de inmunoglobulina G, una proteína de veneno rica en cisteína y sendos ortólogos de savignygrina e ixodegrina (Tabla suplementaria 3.10).

Las proteínas de unión a inmunoglobulinas (IGBPs) son empleadas por las garrapatas para evadir el sistema inmune y el daño causado por los anticuerpos del hospedador ingeridos con la sangre. Estos anticuerpos llegan al intestino medio, pasan a la hemolinfa, y de esta forma alcanzan a sus dianas en los órganos internos. Para prevenir este mecanismo inmune, las inmunoglobulinas del hospedador son capturadas, transportadas y finalmente excretadas en el punto de picadura por las IGBPs de la hemolinfa y las glándulas salivales (Wang et al., 1999). En los ixódidos, las IGBPs son expresadas principalmente por los machos y secretadas en el lugar de la picadura para ayudar a las hembras adyacentes a alimentarse y expulsar de su cuerpo los anticuerpos ingeridos por la garrapata. Nuestros resultados mostraron que las IGBPs eran aproximadamente 5 veces más abundantes en la saliva de las hembras que en la de los machos (Tabla suplementaria 3.10). Este es un hallazgo interesante, porque a diferencia de los ixódidos, los adultos de *O. erraticus* no se alimentan en cooperación (Oleaga et al., 1990) y no hay evidencias de que los machos asistan a las hembras durante la alimentación o de que las hembras hayan adquirido proteínas de la saliva de los machos. De acuerdo con esto, las hembras

y los machos de *O. erraticus* habrían expresado y secretado sus propias IGBPs salivales. En este contexto, parece lógico que las IGBPs deberían ser más abundantes en la saliva de las hembras que en la de los machos ya que las hembras ingieren una mayor cantidad de sangre (12 mg de sangre por hembra frente a los 3,5 mg por macho) y, por lo tanto, mayor cantidad de anticuerpos del hospedador, que deben ser neutralizados. En argásidos, las IGBPs también han sido detectadas en machos y hembras de *O. moubata* (Oleaga et al., 2021b), indicando que estos mecanismos antidefensivos están conservados en garrapatas duras y en blandas. A la vista de sus funciones, las IGBPs fueron estudiadas como potenciales candidatos vacunales frente ixódidos, aunque con escaso éxito (Gong et al., 2014).

La “proteína de veneno rica en cisteína” pertenece a la superfamilia de proteínas venenosas CAP (que incluye a proteínas como las “proteínas secretoras ricas en cisteína” (CRISPs), el antígeno 5 (Ag5) y la “proteína relacionada con la patogénesis 1” (PR-1)) y que se encuentran en metazoos, incluyendo las garrapatas (Fry et al., 2009; Cabezas-Cruz et al., 2014). Las CRISPs del veneno de serpiente son las CAPs más conocidas y algunas de ellas han sido caracterizadas funcionalmente: inhiben los canales iónicos y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, actuando como agentes anti-angiogénicos y vasodilatadores (Tadokoro et al., 2020). Las CRISPs de las secreciones de las glándulas bucales de la lamprea también actúan como inhibidores de los canales iónicos y como vasodilatadores, ayudando a este pez hematófago a alimentarse (Ito et al., 2007), lo que sugiere una conservación evolutiva de esta función en las CRISPs que facilitaría la hematofagia también en las garrapatas.

La savignygrina y la ixodegrina son inhibidores de la agregación plaquetaria similares a las desintegrinas de *O. kalaharensis* (Mans et al., 2002) y de *Ixodes pacificus* (Francischetti et al., 2005). Las desintegrinas son péptidos con un dominio RGD (Arg-GLy-Asp) o KGD (Lys-Arg-Asp), que puede unirse a las integrinas e impedir la interacción de éstas con sus ligandos, bloqueando así eventos posteriores. De este modo, la unión de las desintegrinas a la integrina $\alpha IIb\beta 3$ en la superficie de las plaquetas activadas evita la unión de esta integrina al fibrinógeno e inhibe la agregación plaquetaria (Assumpção et al., 2012). La agregación plaquetaria es el primer paso en la respuesta hemostática del hospedador y debe ser abolida por las garrapatas para poder alimentarse. Los agentes anti-agregantes plaquetarios, incluyendo a las desintegrinas, son frecuentes en el sialoma de las garrapatas (Ribeiro et al., 2020). Por tanto, las desintegrinas pueden ser dianas interesantes para desarrollar vacunas anti-garrapata y, de hecho, algunos estudios ya han explorado el valor vacunal de la mougrina de *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2015a) y de la ixodegrina de *Ixodes ricinus* (Trentelman et al., 2020).

2.5.6. Metabolismo de carbohidratos.

Diecinueve proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos fueron cuantificadas mediante la técnica SWATH-MS (Tabla 3.7 y Tabla suplementaria 3.10). Estas proteínas constituyen la categoría funcional más abundante en la saliva de los machos, representando el 33,0% de la masa proteica. Por el contrario, sólo representaron el 6,3% de la masa proteica salival en las hembras (Figura 3.10). La mayoría de estas proteínas (n= 14) son enzimas de la glicólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

Estas enzimas se consideran proteínas intracelulares “housekeeping”, de modo que las funciones extracelulares que tal vez puedan desempeñar en la saliva de la garrapata y en la

interfase garrapata-hospedador siguen siendo desconocidas para la mayoría, con algunas excepciones, como la enolasa. La enolasa salival de *O. moubata* puede unirse al plasminógeno del hospedador y estimular su transformación en plasmina activa en el lugar de la picadura, promoviendo la fibrinólisis y evitando la formación de coágulos sanguíneos (Díaz-Martín et al., 2013a). Podría asumirse una función similar para la enolasa salival de *O. erraticus*, aunque es preciso demostrarlo experimentalmente.

Se desconoce por qué estas enzimas glicolíticas son mucho más abundantes en la saliva de los machos que en la de las hembras (Figura 3.10). Puede que esta diferencia sea consecuencia de que estas enzimas desempeñen funciones adicionales en la saliva de los machos. Dichas funciones no se conocen, pero podrían estar relacionadas con la atracción sexual, el apareamiento y la transferencia del espermátforo (Feldman-Muhsam et al., 1973; Horigane et al., 2010). Cabe señalar que en otras especies de argásidos como *O. moubata*, las enzimas de la glucólisis son también más abundantes en la saliva de los machos que en la de las hembras (Díaz-Martín et al., 2013a; Oleaga et al., 2021b), lo que sugiere que podría ser una tendencia conservada en el género *Ornithodoros* o incluso en la familia Argasidae.

2.6. Proteínas diferencialmente expresadas en la saliva de machos y hembras

De las 224 proteínas comunes cuantificadas mediante la técnica SWATH-MS en la saliva de hembras y machos, 97 se expresaron diferencialmente ($P < 0,05$) entre ambos sexos. De ellas, 37 se sobreexpresaron en hembras y 60 se sobreexpresaron en machos.

La Tabla 3.8 muestra estas 97 proteínas clasificadas por categoría funcionales según Kim et al. (2020), junto con su valor de área bajo la curva promedio en cada sexo y el correspondiente “fold-change”.

Tabla 3.8. Proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0.05$) en la saliva de machos y hembras.

Functional category	Accession	Description	Mean signal peak area $\times 10^3$ (n = 3) female	Mean signal peak area $\times 10^3$ (n = 3) male	Fold Change (female/male)	p-value
antimicrobial	ACB70385	hebreain-like protein	95.60	313.28	0.31	1.31E-02
antioxidant/ detoxification	B7PHC3	Carbon-nitrogen hydrolase, putative	2,086.45	320.63	6.51	3.10E-02
	PRD32710	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	755.23	160.62	4.70	2.83E-03
	B7PQF4	Sulfotransferase, putative	30.34	73.69	0.41	1.86E-02
	B7QGH2	Glutathione S-transferase, putative	161.86	495.61	0.33	6.81E-03
	ABI52820	superoxide-dismutase	99.49	325.97	0.31	1.88E-02
	AWM72026	catalase 1	716.85	2,616.34	0.27	2.61E-02
	RZF47230	hypothetical protein LSTR_LSTR004939	84.68	684.44	0.12	3.09E-06
cytoskeletal	ABP01547	beta-actin	631.00	966.00	0.65	4.54E-02

extracellular matrix	AA01023	mucin/peritrophin-like protein precursor	81.49	0.05	1,644.20	4.72E-02
	XP_015907551	laminin subunit beta-1 isoform X1	123.26	0.24	524.48	4.34E-02
	B7Q2R9	Cell adhesion molecule, putative	14.83	51.41	0.29	2.66E-03
glycine rich	B7Q6J2	Glycine proline-rich secreted protein, putative	2,406.02	748.22	3.22	3.30E-02
heme/ iron binding	AXP34687	vitellogenin-1	6,447.77	4.84	1,333.20	3.47E-02
	AJR36491	hemelipoglyco-carrier protein CP3	3,552.23	8.50	418.01	2.25E-03
	ISCW021710-PA	CP3	866.12	25.82	33.54	8.62E-05
	AXP34690	vitellogenin-B	1,595.72	357.35	4.47	3.18E-02
immune related	B7Q4R4	Double sized immunoglobulin G binding protein A	3,993.51	779.57	5.12	1.32E-02
	DAA34752	ixodegrin	44.01	135.43	0.32	3.96E-02
	AAM54048	savignygrin	92.22	1,021.83	0.09	4.38E-06
lipocalin	ABI52661	lipocalin	785.86	196.68	4.00	1.10E-04
	ACB70384	salivary lipocalin	2,161.01	667.58	3.24	3.86E-02
	ACB70386	salivary lipocalin, partial	94.71	31.31	3.03	2.93E-02
	ADI60053	savicalin	2,749.89	2,389.58	1.15	1.60E-04
	ABR23414	moubatin-like 3	203.26	406.82	0.50	6.81E-03
	ABI52654	monotonin	1,149.91	2,585.77	0.44	7.50E-04
	B7QAQ5	Putative uncharacterized protein (Fragment)	28.73	99.58	0.29	2.29E-03
	ABR23394	truncated salivary lipocalin, partial	15.89	84.78	0.19	2.24E-03
	ABR23399	moubatin 1-like 2	466.29	6,239.00	0.07	2.10E-03
	ABR23443	salivary secreted lipocalin	35.76	1,031.18	0.03	2.63E-03
	ABR23457	moubatin-like 5	12.16	5,932.07	0.00	1.12E-03
metabolism, amino acids	TDG38496	hypothetical protein AWZ03_015082	486.14	3,401.02	0.14	1.70E-04
metabolism, carbohydrates	B7QBY6	Glyoxalase, putative	41.51	96.62	0.43	1.22E-02
	XP_013777447	glucose-6-phosphate isomerase	271.80	808.75	0.34	7.15E-03
	DAA34560	malate dehydrogenase	81.64	330.49	0.25	7.34E-06
	B7PLL4	Fructose-1,6-bisphosphatase, putative	128.30	534.11	0.24	1.21E-03
	B7Q0R0	Phosphoglycerate mutase, putative	238.67	1,208.54	0.20	2.08E-03
	AIW65719	phosphoglucomutase, partial	15.03	89.67	0.17	3.46E-05
	ADD91327	enolase	474.65	2,936.96	0.16	2.40E-04
	ISCW015616-PA	3-phosphoglycerate kinase, putative	437.28	2,707.91	0.16	1.70E-04

	B7Q3K7	Tpi description	240.42	1,591.72	0.15	3.25E-05
	ISCW020197-PA	pyruvate kinase, putative	273.95	3,468.12	0.08	1.74E-03
	ASV64058	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	917.27	15,028.55	0.06	1.20E-04
metabolism, energy	KDR16306	Glycogen debranching enzyme, partial	109.61	280.36	0.39	7.04E-03
	ISCW018700-PA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	659.81	5,964.82	0.11	1.30E-03
metabolism, lipids	KFM77310	Apolipoprotein B-100, partial	314.75	3.03	103.96	1.56E-02
	ACB70350	phospholipase A2, partial	264.73	67.48	3.92	1.39E-02
	AGJ90343	phospholipase A2	3,359.95	3,070.84	1.09	2.13E-03
	ABI52805	phospholipase A2, partial	328.61	812.17	0.40	3.45E-02
	ABR23453	phospholipase A2	7.81	21.19	0.37	1.15E-02
	CAX51408	hypothetical protein, partial	39.25	113.37	0.35	2.93E-02
	XP_015915960	phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	2.92	45.86	0.06	4.20E-03
metabolism, nucleic acids	B7PCV9	Lysosomal acid phosphatase, putative	2,148.64	1,148.01	1.87	5.67E-03
	ABS30897	5'-nucleotidase/putative apyrase isoform 2 precursor	270.86	191.26	1.42	4.18E-03
	AGJ90350	apyrase	232.08	234.82	0.99	3.72E-02
	B7PJJ3	Adenosine deaminase, putative	95.83	391.27	0.24	6.30E-04
nuclear regulation	AHN53412	histone H2B	7.83	22.10	0.35	3.12E-02
	XP_017008549	histone H4-like, partial	2.16	33.42	0.06	4.00E-04
protease	B7PF28	Longipain, putative	63.26	0.13	500.99	2.57E-02
	AMO02552	carboxypeptidase Q	86.22	1.90	45.40	4.53E-02
	ABO26562	cathepsin L-like cysteine protease	659.14	131.99	4.99	1.26E-02
	ISCW004835-PA	coagulation factor precursor, putative	294.51	60.38	4.88	2.15E-02
	XP_013774340	carboxypeptidase E-like	270.53	117.03	2.31	3.47E-02
	B7PJ51	Serine carboxypeptidase, putative (Fragment)	1,492.78	648.27	2.30	1.90E-03
	XP_019696599	neprilysin-1	97.36	43.48	2.24	2.21E-02
	ABI52714	metalloprotease, partial	450.02	211.19	2.13	3.26E-02

	B7QLA0	Riddle, putative (Fragment)	1,308.48	3,209.73	0.41	4.00E-03
protease inhibitor	ABI94058	serpin-8 precursor	49.66	2.44	20.35	2.89E-03
	XP_015907865	hemocytin	7,161.53	1,838.73	3.89	4.29E-02
	B7P6X9	Hemolentin, putative (Fragment)	1,431.00	1,045.88	1.37	3.44E-02
	KFM64508	Hemocytin, partial	631.61	667.75	0.95	4.25E-02
	AA01022	putative thyroperin precursor	2,472.52	4,434.56	0.56	1.26E-02
	P83516	Chymotrypsin-elastase inhibitor ixodidin	382.07	759.34	0.50	2.26E-03
	XP_022121224	hemocytin	70.57	173.91	0.41	4.28E-02
	XP_023217368	leukocyte elastase inhibitor A-like isoform X2	19.51	52.26	0.37	4.18E-03
	XP_022255312	hemocytin-like	22.22	62.06	0.36	7.08E-03
	ACB70299	ixodidin	16.77	89.06	0.19	1.88E-03
	AA01021	cystatin precursor	167.09	1,216.49	0.14	1.15E-03
	XP_020288964	chymotrypsin inhibitor-like	195.85	1,493.56	0.13	1.73E-02
	ACF57858	chymotrypsin inhibitor precursor	233.56	3,678.45	0.06	1.37E-03
protein modification	B7PWF5	Heat shock protein 20.5, putative	113.92	5.08	22.43	4.59E-02
	B7PAR6	Heat shock protein, putative	222.48	1,285.43	0.17	2.46E-03
signal transduction	XP_021001474	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1	158.76	8.41	18.89	7.25E-03
transporter/receptors	AGQ57038	vitellogenin receptor	651.87	25.70	25.37	3.94E-06
	XP_015908566	low-density lipoprotein receptor-related protein 2	107.78	53.93	2.00	1.88E-03
	XP_018014210	very low-density lipoprotein receptor-like	783.98	924.47	0.85	1.22E-02
	B7PL51	ML domain-containing protein, putative	93.47	491.13	0.19	4.30E-04
unknown function	XP_023240426	synaptogenesis protein syg-2-like	137.70	1.41	97.65	3.88E-03
	ACB70374	putative salivary secreted protein, partial	1,704.00	91.42	18.64	2.08E-02
	ABI52697	7 cysteine domain	213.20	134.32	1.59	1.96E-03
	ABR23379	salivary basic tailless protein	1,124.06	1,987.85	0.57	9.02E-05
	XP_023213207	transmembrane protein 241-like	70.75	178.42	0.40	9.99E-03

	AA94230	unknown secreted protein PK-26 precursor	13,381.20	43,089.64	0.31	2.25E-02
	ABR23361	acid tail salivary protein	14.64	53.69	0.27	3.47E-03
	B7PLB9	Secreted protein, putative	502.91	4,091.22	0.12	6.10E-04
	ACB70369	acid tail salivary protein	11.20	151.34	0.07	9.36E-05
	XP_022900755	S-phase kinase-associated protein 1	189.20	5,274.83	0.04	2.50E-04

Esta Figura 3.11 muestra que 14 y 17 categorías contenían proteínas sobreexpresadas en hembras y machos, respectivamente. Once de estas categorías contenían proteínas sobreexpresadas en ambos sexos, tres categorías (unión al grupo hemo, transducción de señales y proteínas ricas en glicina) contenían proteínas sobreexpresadas solamente en las hembras; y seis categorías (citoesqueleto, antimicrobianos, regulación nuclear y metabolismo de aminoácidos, energía y carbohidratos) contenían proteínas sobreexpresadas únicamente en los machos.

En las hembras, las categorías sobreexpresadas que mostraron un “fold change” más elevado fueron las proteínas de la matriz extracelular y las de unión al grupo hemo, mientras que en los machos las categorías que mostraron el “fold change” más acusado son las proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos y las lipocalinas, en paralelo con las categorías funcionales más abundantes que se muestran en la anterior Figura 3.10.

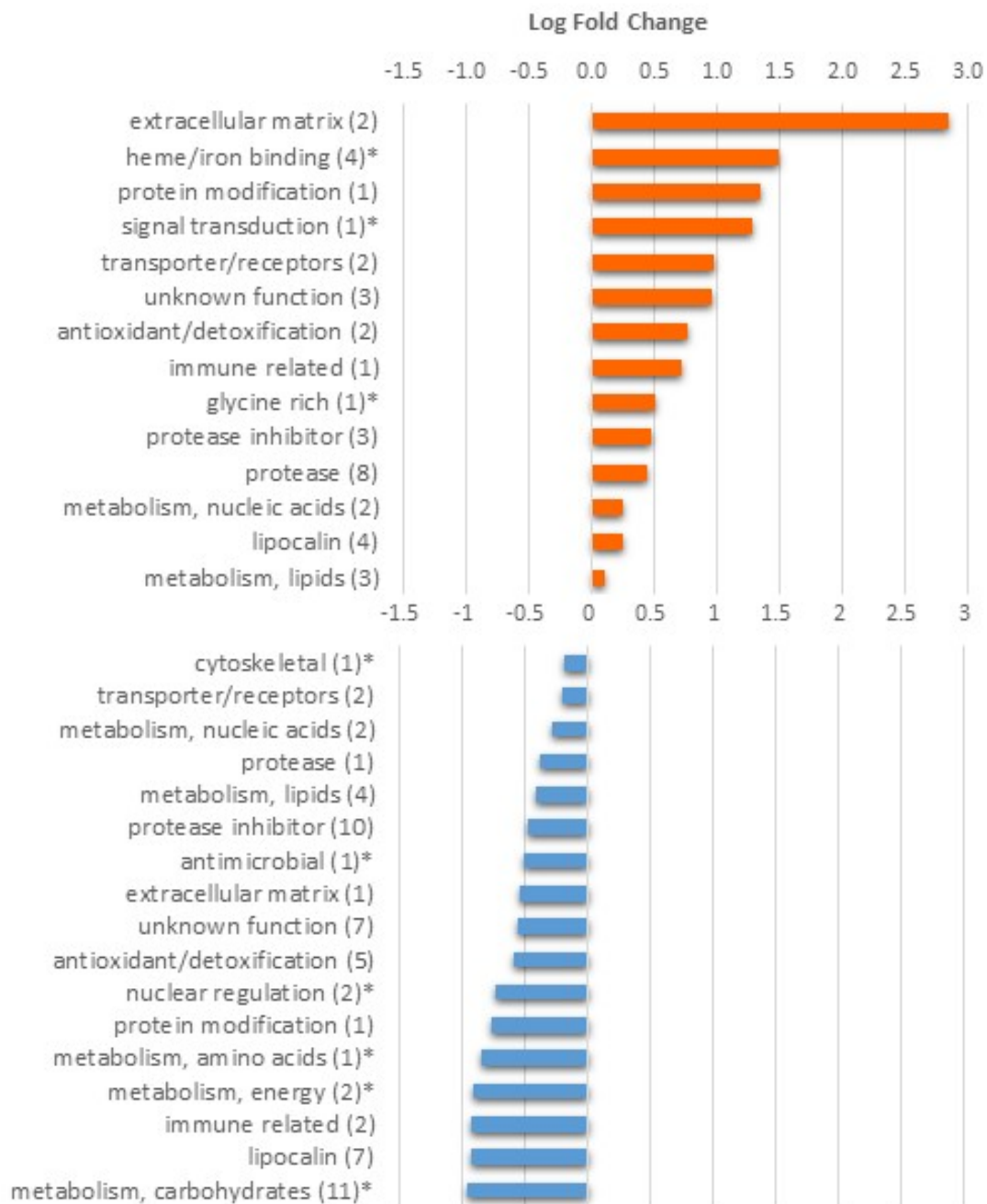


Figura 3.11. Categorías funcionales de las proteínas expresadas diferencialmente ($P < 0,05$) en la saliva de hembras y machos. Catorce y 17 categorías contenían proteínas sobreexpresadas en las hembras (naranja) y en los machos (azul), respectivamente. Los números entre paréntesis indican el número de proteínas en cada categoría. Los asteriscos indican categorías funcionales sobreexpresadas solamente en las hembras ($n=3$) o en los machos ($n=6$).

Adicionalmente, la Figura suplementaria 3.1 representa las 10 proteínas principales sobreexpresadas diferencialmente ($P < 0,05$) en la saliva de hembras y de machos.

En concordancia con los resultados anteriores, en hembras, las 10 proteínas sobreexpresadas incluían tres proteínas de unión al grupo hemo (2 proteínas transportadoras y

una vitelogenina), dos proteasas (longipaina y carboxipeptidasa Q), dos proteínas de la matriz extracelular (mucina/proteína similar a la peritrofina y laminina subunidad beta-1), una apolipoproteína B-100 que participa en el metabolismo de los lípidos, un receptor de la vitelogenina y una proteína con función desconocida (Tabla 3.8).

En los machos, las 10 proteínas más sobreexpresadas incluyen tres lipocalinas (dos de ellas son moubatinas), dos enzimas glicolíticas (piruvato quinasa y fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa), un inhibidor de la quimotripsina, una histona que participa en la regulación nuclear, una fosfatidil-inositol transferasa que participa en el metabolismo de lípidos y dos proteínas de función desconocida, una de las cuales es una proteína de cola ácida (Tabla 3.8).

Las mucinas son glicoproteínas que se encuentran habitualmente en los sialomas de ixódidos y argásidos, aunque sus funciones en garrapatas aún no han sido estudiadas (Araujo et al., 2019; Kim et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a, 2021b). Las mucinas son secretadas en la saliva y podrían realizar funciones relacionadas con la alimentación protegiendo las partes bucales quitinosas de la garrapata e interactuando con proteínas de la matriz extracelular del hospedador (Francischetti et al., 2009). Así mismo, evidencias indirectas en humanos sugieren que las mucinas podrían participar en la defensa antimicrobiana, ya que algunas mucinas humanas han mostrado la capacidad de encapsular microorganismos (Petrout et al., 2018).

Como ya se ha mencionado en el objetivo 1 las proteínas “acid tail”, “basic tail” y “basic tailless”, constituyen una superfamilia de proteínas específicas de garrapata abundantemente encontradas en los sialomas tanto de ixódidos como de argásidos (Araujo et al., 2019; Kim et al., 2020; Ribeiro et al., 2020; Oleaga et al., 2021a, 2021b). Se asume que estas proteínas juegan un papel importante y específico en la interacción garrapata-hospedador durante el proceso de alimentación, pero sólo unos pocos miembros de esta familia han sido caracterizados funcionalmente como anticoagulantes (Narasimhan et al., 2002; Narasimhan et al., 2004; Assumpção et al., 2018) o inhibidores del complemento (Schuijt et al., 2011).

En conjunto, los resultados obtenidos mediante SWATH-MS muestran que al menos 224 de 387 de las proteínas salivales identificadas en el presente estudio son compartidas por ambos sexos, lo cual mejora significativamente el número de proteínas identificadas en machos y hembras mediante LC-MS/MS (DDA) (152 de 387). Por otro lado, estos resultados también muestran diferencias importantes en las proporciones/cantidades de determinadas proteínas que los machos y las hembras segregan en su saliva, lo cual nos plantea cuál es el significado biológico de estas diferencias. Se ha propuesto que estas diferencias pudieran estar relacionadas con el procesamiento de la sangre tras la alimentación o con los procesos de atracción y apareamiento (Horigane et al., 2010; Díaz-Martín et al., 2013a; Oleaga et al., 2021b), pero esta cuestión aún no ha sido resuelta.

Los resultados de este objetivo han sido publicados en el siguiente artículo (ver ANEXO):

Pérez-Sánchez R, Carnero-Morán A, Luz Valero M, Oleaga A. A proteomics informed by transcriptomics insight into the proteome of *Ornithodoros erraticus* adult tick saliva. *Parasit Vectors*. 2022 Jan 3;15(1):1. doi: 10.1186/s13071-021-05118-1.

OBJETIVO 3.

SELECCIÓN Y ANÁLISIS *IN SILICO* DE ANTÍGENOS SALIVALES POTENCIALMENTE PROTECTORES Y PRODUCCIÓN COMO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Como se ha mencionado previamente, nuestra hipótesis propone que los genes salivales cuya expresión aumenta a lo largo del ciclo trofogónico, es decir, entre una alimentación y otra, codifican proteínas bioactivas esenciales para la ingesta de sangre y, por tanto, son candidatas prometedoras como dianas vacunales.

En este capítulo, se seleccionaron varios antígenos con potencial protector basándose en criterios como la sobreexpresión tras la alimentación, su presencia en el proteoma salival, inmunogenicidad y anotación funcional relevante. Estos antígenos se produjeron en forma recombinante para posteriormente evaluar su eficacia protectora mediante ensayos de vacunación en animales.

3.1. Selección de proteínas salivales, sobreexpresadas y antigénicas.

El análisis del transcriptoma de las glándulas salivales de *Ornithodoros erraticus* (BioProject PRJNA666995), realizado en el marco del objetivo 1, reveló la presencia de 18.961 transcritos anotados, de los cuales 2.088 presentaron una sobreexpresión diferencial a los siete días posteriores a la alimentación. Entre las proteínas codificadas por estos transcritos, se identificaron 69 en el proteoma salival (objetivo 2), de las cuales 23 mostraron una predicción de antigenicidad (puntuación VaxiJen > 0.5), junto con señales de secreción clásica (SignalP). Estas proteínas carecían de dominios transmembrana (TM) y sitios de anclaje de GPI, según lo indicado en la Tabla Suplementaria 11.

Tras una inspección manual de estos 23 candidatos, se priorizaron aquellos que presentaban secuencias codificantes completas, niveles elevados de expresión, un incremento significativo en la expresión a los 7 días posteriores a la alimentación y anotaciones funcionales relacionadas con la ingesta de sangre. Finalmente, se seleccionaron cuatro de estos candidatos para análisis adicionales, incluyendo su producción como proteínas recombinantes y la evaluación de su capacidad protectora en ensayos de vacunación en animales (objetivo 4). Los antígenos seleccionados fueron: OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like (Tabla Suplementaria 3.11).

3.2. Características, filogenia y predicción de epítomos B y T para cada proteína.

3.2.1. Proteína salival “acid tail” (OeATSP)

El transcrito OE_8323 (GenBank GIXX02003429.1) codifica una proteína de 176 aminoácidos (aa) y 19,1 kDa (GenBank MBZ3998647.1), con un péptido señal que comprende los primeros 20 aa, sin dominios transmembrana ni anclajes GPI, y que está anotada como “acid tail salivary protein” (OeATSP). Las ATSPs, junto con las “basic tail proteins” y las “basic tailless proteins”, constituyen una superfamilia de proteínas específicas de garrapatas que se encuentran abundantemente en los sialomas de distintas especies, tanto ixódidos como argásidos (Chmelar et al., 2019; Ribeiro y Mans, 2020; Oleaga et al., 2021a, 2021b) y se supone que desempeñan importantes funciones en la interfase garrapata-hospedador. Creemos que las

vacunas dirigidas frente a las ATSPs específicas de garrapatas podrían ser útiles, pero hasta la fecha no se han realizado estudios sobre su eficacia protectora.

Las búsquedas mediante Blast en las bases de datos NCBI y UniProt para ortólogos de la OeATSP en garrapatas recuperaron 11 secuencias ortólogas, 10 pertenecientes a especies de argásidos y una de ixódido. Todas ellas presentan valores de $E < 10^{-7}$ y una identidad de secuencia con la OeATSP entre el 34% y el 47%. El alineamiento múltiple de las secuencias de estos 12 miembros de la familia ATSP no mostró motivos conservados, excepto los seis residuos de cisteína en la parte central del alineamiento (Figura 3.12).

XP_040069874_IXOSC	-----MKLVLFACAILFFAVISKADGEEKCGKRRRQSGD--TSCNYFCRNAANNGWDEG	53
ABI52637_ARGMO	MKPMsAVKALLTFALLVAVTDADIEGLKKTCPDKDQPDAGD--AGCMYYCDDKGN---HYG	55
ACB70321_ORNCO	---MSTMKILLCLAVLVAAYVYAEIPGMKKACADKKQPDAGD--TGCMMYYCDDSDT---NYG	52
ABR23478_ORNPA	-----MNAFISL-VFLAIVALA-YANQFPCTGKSRDPNKVPATCNFWCKMNGN--WAMG	50
OeATSP	---MKVVSAFALSALFMAVSG-EDLEIVC-RKDRPAHE--RSCAFWCDRSGV--WKLG	51
ACB70369_ORNCO	-----MKAAILLALASLALVAG---QEYPCERKNRPSGQ--KDCSYCQLNGK--WELG	47
ABR23429_ORNPA	-----MKAVILLAVFVVAVAE-SELRFPCPKKNRPSDK--TDCSYCCKKAGK--WELG	49
7NE8_A_ORNSA	-----DSEFPCKPRKQPPAGN--SECSYYCEMNGQ--WKLG	31
ACB70371_ORNCO	-----MKAVVLLALFVAVVVAE--ELQFPCPKKDRPAGQ--NDCSYCQIKGQ--WELG	48
ABR23361_ORNPA	-----MKAVILLALFVAVAAD---SEFPCPKKNRPGGK--TDCSYCQMGQ--WKLG	47
ABR23355_ORNPA	-----MKAVILLALFVAVAE--SLDFPCPKKDRPSGK--TDCSYCELNGQ--WQLG	48
ABR23360_ORNPA	-----MKAVILLALFVAVAE--SLDFPCPKKDRPSGK--TDCSYCELNGQ--WQLG	48
	* : : . * : : *	
XP_040069874_IXOSC	HLEDGEKCNNG--IDDGVCKDGLCYLRSDEASPPPTRDETSSSEDEPA--PP-TKKPKKK	108
ABI52637_ARGMO	IYPDGSTCDYTG--SRDGKQDGLCYPGPNSVTPTAVP-----	91
ACB70321_ORNCO	IYHDGTTCDYTG--SLDGTCKGGLCYAGPNSKYPDQIP-----	88
ABR23478_ORNPA	KHTDGISCDGSGPNMGGGICKEGLCTYVQKKSSAP-----AYKQTENE--DQGEDWDK--	101
OeATSP	SYQDGLRCDYAG--YLDGVCKNALCHYNEPTATGDYRTRGYGASSDDRGFGFRITRAY	109
ACB70369_ORNCO	KYQNNIPCDYSS--SNDGICLEGLCYNKDVTVPKPG---SNPGGRNQPADEGGD--EEWDRK-	100
ABR23429_ORNPA	KYQNDIPCDYNS--QGDGVCKEGLCVTTTNRVQPTLEAQEALRTQDMST--KK-TKRKRKS	105
7NE8_A_ORNSA	KFQNGARCDYNA--VKDGVCKNEGLCYASGDSASN-TQNGGSRQENEDQGD--DEWDRK-	86
ACB70371_ORNCO	KYQNNIPCDYNS--QGDGICKEGLCHYNEKGSSGSDRNTGGSQNHPEE--EE--EEWDRK-	102
ABR23361_ORNPA	KYQNGLSCDYNS--RGDGVCKEGLCYNEKGSSS-TQNRGSSRNQPEE--DE--EEWDRK-	100
ABR23355_ORNPA	KYQSGLPDYNs--QGDGICREGLCYNEKGSSS-TQNRGSSRNQPEE--D--EEWDRK-	100
ABR23360_ORNPA	KYQSGLPDYNs--QGDGICREGLCYNEKGSSS-TQNRGSSRNQPEE--DA--EEWDRK-	101
	.. * : : . . * * . *	
XP_040069874_IXOSC	QKN--KH-----	113
ABI52637_ARGMO	-----	91
ACB70321_ORNCO	-----	88
ABR23478_ORNPA	-----	101
OeATSP	GASRNEDAGGYGAAVTYGASSDDKDYGGHHPVGAYPATHEDKDLGDYGPTEYASSTDHT	169
ACB70369_ORNCO	-----	100
ABR23429_ORNPA	GTE-----SRCVINLAFGE-----	119
7NE8_A_ORNSA	-----	86
ACB70371_ORNCO	-----	102
ABR23361_ORNPA	-----	100
ABR23355_ORNPA	-----	100
ABR23360_ORNPA	-----	101
	% identity	
XP_040069874_IXOSC	----- 113 45.45	
ABI52637_ARGMO	----- 91 42.35	
ACB70321_ORNCO	----- 88 42.35	
ABR23478_ORNPA	----- 101 41.18	
OeATSP	EETFELK 176 -	
ACB70369_ORNCO	----- 100 47.27	
ABR23429_ORNPA	----- 119 37.50	
7NE8_A_ORNSA	----- 86 43.48	
ACB70371_ORNCO	----- 102 38.75	
ABR23361_ORNPA	----- 100 34.12	
ABR23355_ORNPA	----- 100 35.53	
ABR23360_ORNPA	----- 101 29.35	

Figura 3.12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la OeATSP y las de los 11 ortólogos de garrapatas. Se muestran los códigos de acceso de GeneBank. ARGMO, *Argas monolakensis*; IXOSC, *Ixodes scapularis*; ORNCO, *Ornithodoros coriaceus*; ORNPA, *Ornithodoros parkeri*; ORNSA, *Ornithodoros savignyi*. Los aminoácidos conservados están indicados con asteriscos (*); las sustituciones conservativas y semi-

conservativas con dos puntos (:) y un punto (.), respectivamente. Los 6 residuos de cisteína conservados están resaltados en amarillo.

El análisis filogenético de estas secuencias agrupó a la mayoría de las secuencias de *Ornithodoros* sp. junto con OeATSP en un clado principal, respaldado por un valor de bootstrap del 89%. Las secuencias de *Argas monolakensis*, *Ixodes scapularis* y *Ornithodoros coriaceus* quedaron fuera de este clado (Figura 3.13).

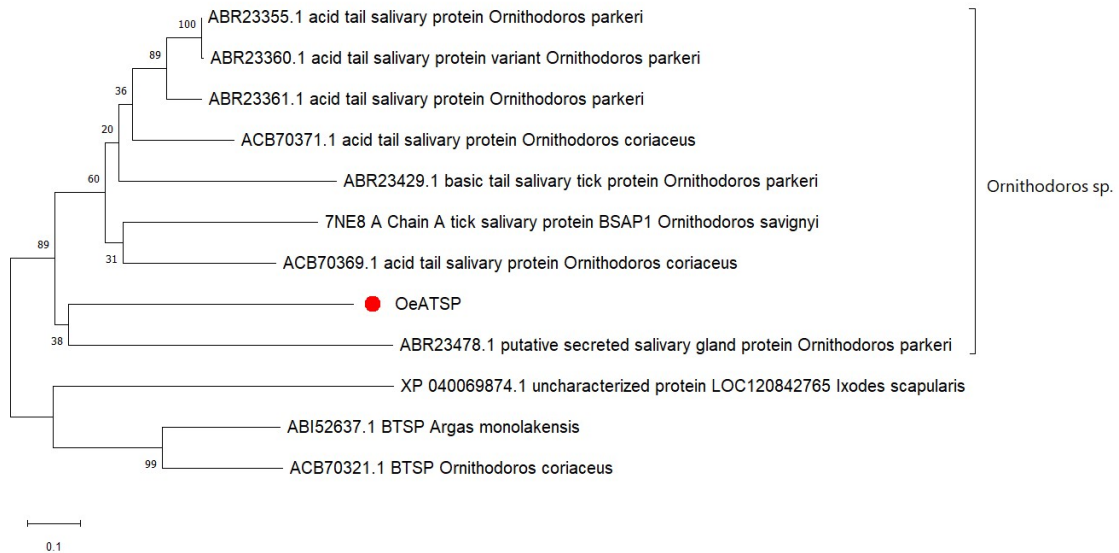


Figura 3.13. Relación filogenética de OeATSP (punto rojo) y sus ortólogos en garrapatas. Se muestran el código de acceso de GenBank, la descripción de la proteína y el nombre de la especie para los ortólogos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson.

La predicción de epítomos B se muestran en la Figura 3.14. Cada herramienta bioinformática predijo un conjunto de epítomos B similares. Las secuencias solapantes en estas predicciones se consideraron epítomos B consenso, los cuales cubrían prácticamente la secuencia completa de la proteína, excepto el péptido señal (1-20 aa).



Figura 3.14. Predicción de epítomos B lineales en la proteína OeATSP. La secuencia de la proteína se representa por triplicado mostrando las predicciones ABCpred (amarillo), BCEpred (azul) y BepiPred-2.0 (verde). Los aminoácidos que se solapan en los epítomos predichos por al menos dos algoritmos aparecen resaltados en recuadros. El péptido señal se representa en rojo.

La predicción de epítomos T detectó la presencia de 8 péptidos de unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y 7 péptidos de unión a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MCH-II). Estos péptidos se distribuyen a lo largo de la secuencia de OeATSP y la mayoría coinciden con los epítomos B (Figura 3.15).

```
>OeATSP
001 MKVVSALFSALEFASAVSGEDLEIVCRKDRPAHERSCAFWCDRSGVWKLGSYQDGLRCDYAGYLDGVCKNALCHYNEPTATGDYRRTRGYGASDDDRGF
    MKVVSALFSALEFASAVSGEDLEIVCRKDRPAHERSCAFWCDRSGVWKLGSYQDGLRCDYAGYLDGVCKNALCHYNEPTATGDYRRTRGYGASDDDRGF
101 GGFRTTRAYGASRNEDAGGYGAAVTYGASSDDKDYGGHHPVGAYPATHEDKDLGDYGTETETASSTDHTEETFEELK
    GGFRTTRAYGASRNEDAGGYGAAVTYGASSDDKDYGGHHPVGAYPATHEDKDLGDYGTETETASSTDHTEETFEELK
```

Figura 3.15. Predicción de epítomos T en la proteína OeATSP. La secuencia se representa por duplicado mostrando los péptidos predichos de unión a moléculas MHC-I de cerdo (amarillo) y MHC-II de ratón (azul). El péptido señal se representa en rojo.

La predicción de la estructura tridimensional (3D) de OeATSP modeló, con un 99,8% de confianza, un fragmento de 78 aminoácidos (22-99 aa), que corresponde al 44% de la secuencia total de la proteína (Figura 3.16). En este modelo 3D, la mayor parte de la secuencia se representa sin estructura definida, a excepción de dos láminas β cortas.

Además, los epítomos B lineales predichos dentro de la región modelada parecen estar expuestos en la superficie de la proteína, lo que indicaría una accesibilidad potencial a los anticuerpos del hospedador. Sin embargo, esta predicción debe interpretarse con cautela, ya que el modelo abarca menos de la mitad de la proteína.

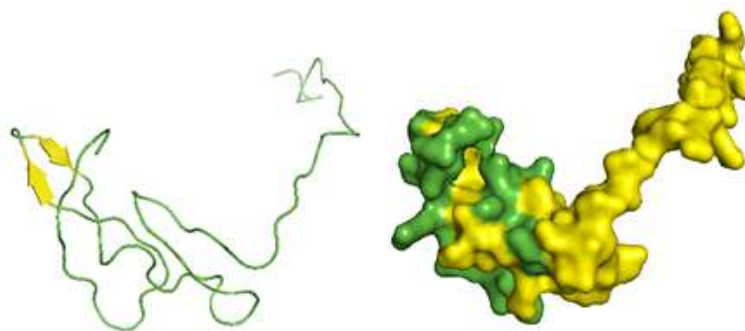


Figura 3.16. Modelo 3D de OeATSP. Izquierda: modelo que muestra la estructura secundaria. Derecha: modelo que muestra los epítomos B expuestos en la superficie de la molécula (amarillo).

3.2.2. Proteína tipo 2 de deficiencia de múltiples factores de coagulación (OeMCFD2).

El transcrito OE_5173 (GenBank GIXX02002475.1) codifica una proteína de 139 aa y 15,9 kDa (GenBank MBZ3997693.1), con un péptido señal que abarca los aminoácidos 1 al 25, sin dominios transmembrana ni anclajes GPI, anotada como “putative EF-hand domain-containing protein (MCFD2)” (Tabla suplementaria 3.11).

Figura 3.17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de OeMCFD2 y sus 10 principales ortólogos. Se muestran los códigos de acceso en GeneBank/Uniprot para los ortólogos: DERSI, *Dermacentor silvarium*; HYAA, *Hyalomma asiaticum*; IXOSC, *Ixodes scapularis*; RHIMI, *Rhipicephalus microplus*; RHISA, *Rhipicephalus sanguineus*. Los aminoácidos conservados están marcados con asteriscos (*); las sustituciones conservadoras y semiconservadoras están marcadas con dos puntos (:) y un punto (.)

respectivamente. Los 6 residuos implicados en la unión al calcio en cada uno de los dos dominios EF-hand están resaltados en amarillo.

La búsqueda de ortólogos de esta proteína en las bases de datos NCBI y UniProt encontró más de 60 secuencias anotadas como MCFD2, todas ellas pertenecientes a especies de ixódidos. Las 10 secuencias con un valor de $E < 10^{-33}$, una identidad de secuencia entre el 44 y el 54% y una cobertura de secuencia entre el 79 y el 99% se seleccionaron para realizar los análisis posteriores. El alineamiento de estas 11 secuencias MCFD2 mostró una elevada conservación en su región central y carboxiterminal, donde se localizan los dos dominios EF-hand característicos de esta familia de proteínas (Figura 3.17).

El motivo de unión a calcio en cada dominio EF-hand está formado por 6 aminoácidos que en garrapatas están muy conservados (Guy et al., 2008). Los aminoácidos del primer dominio fueron Asp79, Asp81, Asn83, Leu85, Asp87 y Glu90, y los del segundo Asp123, Asp125, Asp127, Tyr129, Asn131 y Glu134 (Figura 3.17).

El análisis filogenético de estas proteínas muestra 2 clados bien definidos respaldados por valores de bootstrap del 99% y 95%, con OeMCFD2 justo entre ambos clados, sin pertenecer a ninguno de ellos (Figura 3.18).

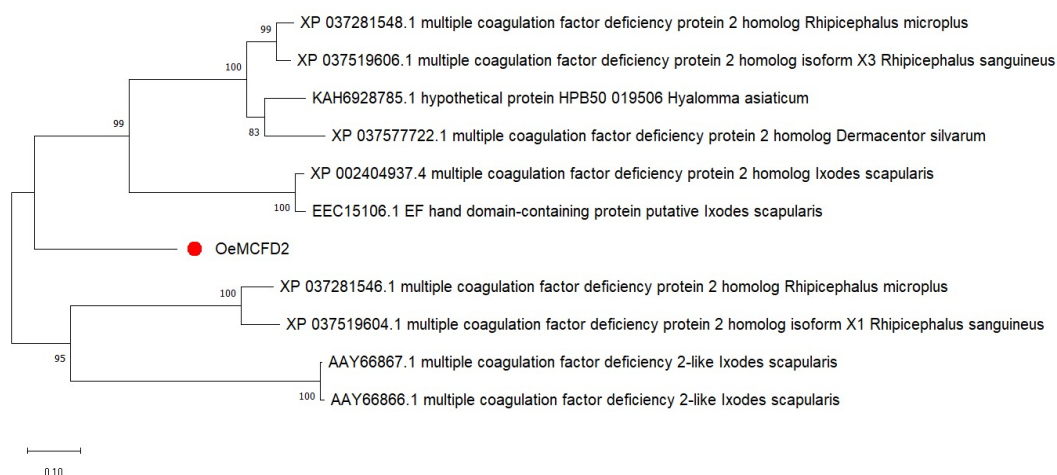


Figura 3.18. Análisis filogenético de OeMCFD2 (punto rojo) y sus ortólogos en garrapatas. Se muestra el código de acceso de GenBank, la descripción de las proteínas y las especies. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson.

La predicción de epítomos B lineales identificó 4 epítomos en la secuencia de OeMCFD2. Un epítomo largo que abarca prácticamente la mitad N-terminal de la proteína y otros 3 más cortos localizados en el extremo carboxilo, donde se solapan con los motivos de unión al calcio (Figura 3.19).

```

>OeMCFD2
001 MAAQQQLLCVALIVLCYPPFACIADDSAAEQIKAKYGAKNFVRDMEHLKEDLAKITELQMEGKLTDEEMVYFFRMHDFDDNNLLDGIELLAAMKHTEY
    MAAQQQLLCVALIVLCYPPFACIADDSAAEQIKAKYGAKNFVRDMEHLKEDLAKITELQMEGKLTDEEMVYFFRMHDFDDNNLLDGIELLAAMKHTEY
    MAAQQQLLCVALIVLCYPPFACIADDSAAEQIKAKYGAKNFVRDMEHLKEDLAKITELQMEGKLTDEEMVYFFRMHDFDDNNLLDGIELLAAMKHTEY

100 HPGLPTPLDQLISAVDSMMELDKDNDGYLNYFEMRSAM
    HPGLPTPLDQLISAVDSMMELDKDNDGYLNYFEMRSAM
    HPGLPTPLDQLISAVDSMMELDKDNDGYLNYFEMRSAM

```

Figura 3.19. Predicciones de epítomos B lineales en la secuencia de OeMCFD2. La secuencia de la proteína se representa por triplicado y se muestran las predicciones de ABCpred (amarillo), BCEpred (azul) y BepiPred-2.0 (verde). Los aminoácidos de los epítomos predichos por al menos dos algoritmos se resaltan en recuadros. El péptido señal se representa en rojo, y los residuos de aminoácidos implicados en la unión al calcio se destacan en rojo negrita.

La predicción de epítomos T detectó 6 péptidos MCH-I y 3 péptidos MCH-II, cuyas secuencias se solapan con los péptidos MHC-I. Todos estos epítomos T cubren la mayor parte de la secuencia de la proteína (Figura 3.20).

```

>OeMCFD2
001 MAAQQQLLCVALIVLCYPPFACIADDSAAEQIKAKYGAKNFVRDMEHLKEDLAKITELQMEGKLTDEEMVYFFRMHDFDDNNLLDGIELLAAMKHTEY
    MAAQQQLLCVALIVLCYPPFACIADDSAAEQIKAKYGAKNFVRDMEHLKEDLAKITELQMEGKLTDEEMVYFFRMHDFDDNNLLDGIELLAAMKHTEY

100 HPGLPTPLDQLISAVDSMMELDKDNDGYLNYFEMRSAM
    HPGLPTPLDQLISAVDSMMELDKDNDGYLNYFEMRSAM

```

Figura 3.20. Predicción de epítomos de células T en la secuencia de OeMCFD2. La secuencia de la proteína se representa por duplicado mostrando los péptidos predichos de unión a moléculas MHC-I de cerdo (amarillo) y MHC-II de ratón (azul). El péptido señal se representa en rojo, y los residuos de aminoácidos implicados en la unión al calcio se destacan en rojo negrita.

El modelado tridimensional (3D) de OeMCFD2 incluyó 72 residuos (64-136 aa), que representan el 51,8% de la secuencia de aminoácidos, con una confianza del 99,8% (Figura 3.21).

El modelo 3D resultante reveló la presencia de dos dominios consecutivos tipo 'EF-hand calcium-binding', cada uno compuesto por dos hélices α conectadas por un bucle, en el que se localizan los seis aminoácidos responsables de la unión al ion Ca^{2+} .

Según este modelo 3D, los epítomos B lineales identificados en el extremo carboxilo-terminal de la secuencia de OeMCFD2 se encuentran expuestos en la superficie de la proteína, lo que sugiere que serían fácilmente accesibles a los anticuerpos del hospedador

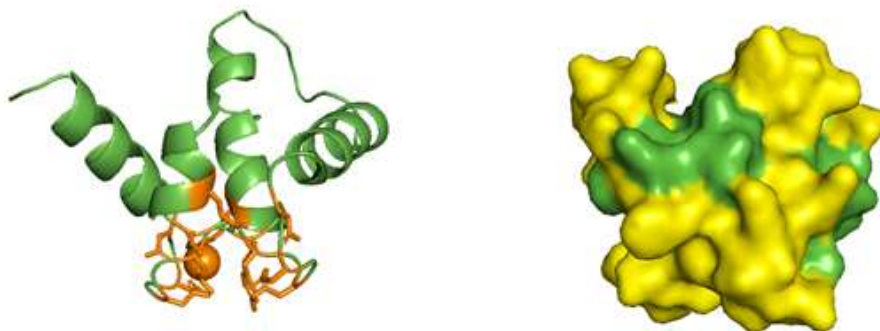


Figura 3.21. Modelos tridimensionales de OeMCFD2. Izquierda: modelo que muestra la estructura secundaria conservada de OeMCFD2. Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la unión del calcio, situadas en los bucles de conexión, se han resaltado en naranja. El modelo incluye un ligando de ión Ca^{2+} (esfera naranja). Derecha: modelo de superficie con los epítopos B lineales expuestos en la superficie de la proteína (amarillo).

3.2.3. Cu/Zn-Superóxido dismutasa (OeSOD)

El transcrito OE_57782 (GenBank GIXX02013702.1) codifica una proteína de 185 aminoácidos con un peso molecular de 19,3 kDa (GenBank MBZ4008920.1). Presenta un péptido señal comprendido entre el aminoácido 1 y el 25, sin dominios transmembrana ni anclajes GPI, y está anotada como superóxido dismutasa [Cu-Zn]-like isoforma X4 (OeSOD) (Tabla suplementaria 3.11). Este transcrito también se había detectado previamente en el transcriptoma del intestino medio de *O. erraticus* (Bioproject PRJNA401392, GenBank accession GFWV01010682.1), donde se observó que su nivel de expresión aumentaba en respuesta a la ingesta de sangre (Oleaga et al., 2018).

Las SODs son metaloenzimas antioxidantes presentes en organismos aeróbicos y anaeróbicos, que protegen a las células del estrés oxidativo producido por los niveles elevados de anión superóxido (O_2^-). Para evitar daños celulares, las SODs catalizan la conversión del anión superóxido en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que posteriormente es descompuesto por la catalasa en agua y oxígeno. Las SODs se clasifican según el metal presente en el sitio activo en cuatro grupos. Entre estas, las Cu/Zn-SODs están presentes en el citoplasma de organismos eucarióticos y también se secretan al medio extracelular. La digestión de la sangre por parte de las garrapatas genera altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluido el anión superóxido. Las ROS ayudan a mantener el equilibrio entre la microbiota de las garrapatas y los potenciales patógenos, y participan en la lucha contra los patógenos invasores. Por otra parte, las ROS también pueden interactuar con las proteínas, lípidos y ADN de las garrapatas, causando efectos perjudiciales severos (Hernández et al., 2022). Por lo tanto, a través de la regulación de los niveles del anión superóxido, las SODs desempeñan funciones importantes en la fisiología de las garrapatas, como (i) la regulación del microbioma bacteriano de las garrapatas, (ii) la protección de los tejidos contra el estrés oxidativo y (iii) la regulación de la competencia vectorial de las garrapatas al promover la colonización de sus tejidos por los patógenos que transmiten (Crispell et al., 2016; Hernández et al., 2022). Estas funciones

convierten a las SODs de garrapata en dianas atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas destinados al control de las garrapatas y los patógenos que transmiten.

La búsqueda en las bases de datos NCBI y UniProt de ortólogos de esta proteína encontró hasta 80 secuencias de Cu/Zn-SODs, pertenecientes en su mayoría a especies de ixódidos. Seleccionamos las 18 secuencias más próximas a OeSOD para los estudios comparativos adicionales (17 de ixódidos y 1 de argásido, *Argas monolakensis*). Estas secuencias mostraron valores de $E < 10^{-45}$ y una identidad de secuencia con la OeSOD entre el 46% y 62%.

Estas 19 secuencias de Cu/Zn-SODs están muy conservadas en sus regiones centrales y los extremos carboxilo. Particularmente bien conservados se encuentran los residuos His77, His79, His94 y la His151, implicados en la unión al ion Cu^{2+} , y los residuos His102, His111 y Asp8114, implicados en la unión al ion Zn^{2+} (Figura 3.22). También están muy conservados los aminoácidos Cys88 y Cys177 de OeSOD, que son equivalentes a los aminoácidos Cys57 y Cys156 de la Cu/Zn-SOD citoplasmática humana, los cuales forman puentes disulfuro que aportan mayor estabilidad a la estructura secundaria de la proteína (Miller, 2004; Culotta et al., 2006) (Figura 3.22).

```
OeSOD -----MATPAGWLVRLLTTAILFAVTARVSGQQEEVVTRAVAEIN-VGSA 43
XP_029839113_IXOSC -----MLVPS--LLLLALTAVTCQ-----THDAKPIYRGVAVLN-GGPV 36
XP_037577588_DERSEI -----MHHLVLSSL-VAAVTFATIKCQ--AHYPTDPPVLRVAALLT-TGTI 43
XP_050025840_DERAN -----MHHLVFSSL-MAVVTLTVMCQ--VHYPTDPPVLRVAVLT-TGTI 43
KAH7947603_RHISA -----MLVRS-SYF-AYKD 12
XP_037282087_RHIMI -----MHQLLFSSL-VVSLTFATVRCQIKGHYPTDDPPVLRVAALT-TGSI 45
XP_037520261_RHISA -----RSRQLSVKSKLAILHRDPPVLRVAALT-TGTI 32
ABI52820_ARGMO -----MPVKAVCVLKGTEV 15
XP_037269269_RHIMI -----MKECF-LMSLIVSI----SLGATKEEE-SVIHAVCVLQ-NGTP 36
XP_037504817_RHISA -----MKEYL-LLPLLVSF----VLGATTEGEQFVTRAVCALE-NGTP 37
XP_049516335_DERSEI -----MMTEPL-LLFLLVSA----FLGVNAEGEQFVTDVAVCFE-VGTP 38
XP_050052657_DERAN -----MITAFF-LLSLLLSA----FVGVTNTEGEQLITDAVCFE-TGTP 38
XP_037560209_DERSEI -----MKKESL-LVSLLLAT----VVDAAETKQNSTDAICVFQ-VGNA 38
XP_050052655_DERAN -----MQKEPL-LLPLLAT----VLGAAREREQNVTDICVFQ-AGNA 38
XP_037269266_RHIMI -----MQTLLL-ILHLLAA---AAKVEDSEKKNVSDAICVFN-VGNV 39
XP_037504822_RHISA -----MQPLPL-LLSLLAT----AAEENSPEQHVSDAICVFN-IGNV 38
XP_037269268_RHIMI MNNSALALRPPTTLVVMHRPPV-LLPILLAT----VLSAARRRRAYVSDAICVFQ-VGNA 54
XP_049267983_RHISA MNNSALALRSPATLVVHRQPL-LFPILLAT----LFGAARRRRTYVSDAICVFQ-VGNA 54
XP_037504820_RHISA MNNSALALRSPATLVVHRQPL-LFPILLAT----LFGAARRRRTYVSDAICVFQ-VGNA 54
```

```
OeSOD RGFVTFKLCKDEGYEQVLVSGNVTGLCPGKHGFHIMYGDISTGCGGAGSHFNPTGDKHG 103
XP_029839113_IXOSC RGRV--EFIKENPYVQVQVLGNVTGLSPGHGHFHVHFRGDLGAGCPSAGPHFNPGNTVHG 94
XP_037577588_DERSEI KGTV--QFIKENPYAQVQVHGNVTGLNPGRHGFHVHFRGDLTGCGCKSAAAHYNPANADHG 101
XP_050025840_DERAN KGTV--QFIKENPFAQVQVHGNVTGLNPGRHGFHVHFRGDLTGCGCKSAAAHYNPANADHG 101
KAH7947603_RHISA LRRY--RALAQNPYAQVQVHGNVTGLSPGRHGFHVHFRGDLTGCGCKSAAAHYNPANADHG 70
XP_037282087_RHIMI TGTI--QFIKENPYAQVQVHGNVTGLSPGRHGFHVHFRGDLGSGGCKSAAAHYNPANADHG 103
XP_037520261_RHISA TGTV--QFIKENPYAQVQVHGNVTGLSPGRHGFHVHFRGDLTGCGCKSAAAHYNPANADHG 90
ABI52820_ARGMO TGTV--HFTQDSPNSPVKVTGEITGLAKGKHGFHIEFGDNTNGCISAGAHFNPHGKEHG 73
XP_037269269_RHIMI QGYV--EFHQEPG-QHVTVQGNISHLTPGLHGFHVHEYGDLTDGCTSGASHYNPFPGKNHG 93
XP_037504817_RHISA QGYV--EFHQEPG-QRVAVQGNITHTLTPGLHGFHVHEYGDLTDGCTSGASHYNPFPGKDHG 94
XP_049516335_DERSEI QGYV--EFHQKPG-QRVTVQGNITQLAPGLHGFHVHEYGDLTDGCTSGASHYNPFPGKNHG 95
XP_050052657_DERAN QGYV--QFHQKPG-QRVTVQGNISQLAPGLHGFHVHGYGDLTDGCTSGASHYNPFPGKNHG 95
XP_037560209_DERSEI SGYV--SFHQDLDGKNVTVFGNITNLPQKGKHGFHVHEYGDLGSKGCSSTGSHYNPNKRNHG 96
XP_050052655_DERAN SGYV--SFHQDPSKNTVTFGNITNIPDGKHGFHVHEYGDLGSKGCLSTGSHYNPNKRNHG 96
XP_037269266_RHIMI SGHV--MFHQSTG-GNVTVQGNITNLPKKGKHGFHVHGYGDLGSKGCASTGPHFNPGYGMNHG 96
XP_037504822_RHISA SGYV--TFHENPG-ENVTVQGNITNLPNGTHGFHVHGYGDLGSKGCLSTGPHFNPGYGMNHG 95
XP_037269268_RHIMI SGYV--KFHQKPF-SFVKLHGNTNLPKKGKHGFHVHEYGDLGSKGCASTGAHYNPLRMPHG 111
XP_049267983_RHISA SGSV--TFHQDPF-SFVRLHGNTNLPQKGKHGFHVHEYGDLSDGCLSTGPHFNPGYGMNHG 111
XP_037504820_RHISA SGSV--TFHQDPF-SFVRLHGNTNLPQKGKHGFHVHEYGDLSDGCASTGAHYNPLGTMHG 111
. * : * : : : * * * * : * : * : * : * : * : * : *
```

El análisis filogenético agrupó a estas proteínas en 2 clados bien definidos, apoyados en los valores bootstrap del 97 y 96%, respectivamente. El clado 1 está formado por isoformas de los géneros *Dermacentor* y *Rhipicephalus*, mientras que el clado 2 agrupó OeSOD con varias isoformas de los géneros *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*. La única secuencia SOD de *A. monolakensis* que se incluyó en este análisis quedó situada entre ambos clados, sin pertenecer a ninguno (Figura 3.23).

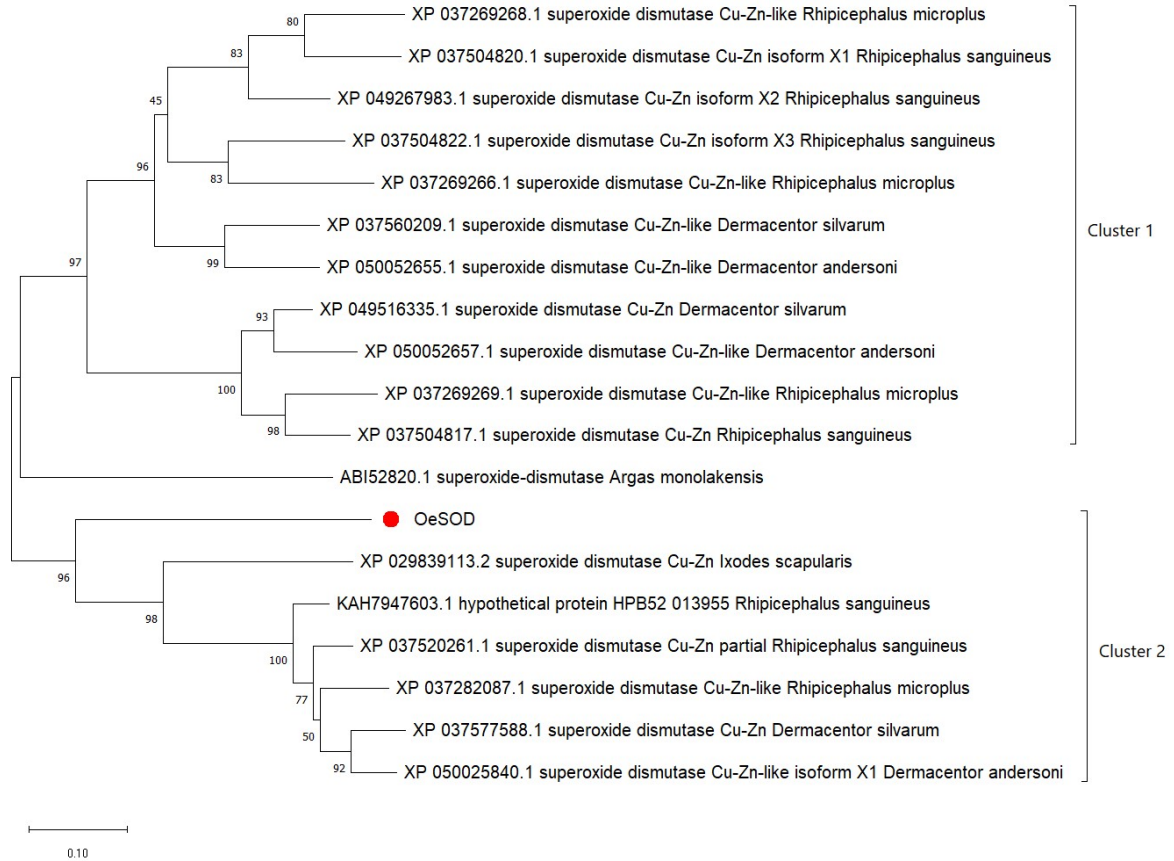


Figura 3.23. Análisis filogenético de OeSOD (punto rojo) y sus ortólogos en garrapatas. Se muestran el código de acceso GenBank, la descripción de la proteína y el nombre de la especie para los ortólogos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson.

La predicción de epítomos B detectó dos epítomos en el extremo amino terminal a continuación del péptido señal, y tres epítomos adicionales en la mitad carboxiterminal de la secuencia de OeSOD, solapándose con el dominio de unión al grupo Cu/Zn (Figura 3.24).



Figura 3.24. Predicciones de epítomos B lineales en la secuencia de OeSOD. La secuencia de la proteína se representa por triplicado mostrando las predicciones ABCpred (amarillo), BCEpred (azul) y BepiPred-2.0 (verde). Los aminoácidos de los epítomos predichos por al menos dos algoritmos aparecen resaltados en recuadros. El péptido señal está representado en rojo, los residuos de aminoácidos implicados en la unión a Cu²⁺ y Zn²⁺ están resaltados en rojo negrita, y los residuos de cisteína implicados en los puentes disulfuro están marcados en negrita y con asteriscos.

La predicción de epítopos T detectó hasta 5 péptidos de unión a moléculas MHC-I distribuidos en el extremo amino-terminal y la parte central de la proteína y 4 péptidos de unión a moléculas MHC-II que se solapan con los péptidos MHC-I (Figura 3.25).

```
>OeSOD
001 MATPAGWLVRLTTAILEAVTARVSGQQEEVVTRAVAEINVGSGARGFVTFKLCDEGYEQVLVSGNVTGLCPGKHGFIHMYGDISTGCGGAGSHFNPTGD
    MATPAGWLVRLTTAILEAVTARVSGQQEEVVTRAVAEINVGSGARGFVTFKLCDEGYEQVLVSGNVTGLCPGKHGFIHMYGDISTGCGGAGSHFNPTGD
101 KHGAPEDPERHVGD LGNIVADEDTATFAFYDPLLKFTGTNCILGRAVVVHEKEDDLGRGDHPDSLKTGNAGGRVACGIIAIAAP
    KHGAPEDPERHVGD LGNIVADEDTATFAFYDPLLKFTGTNCILGRAVVVHEKEDDLGRGDHPDSLKTGNAGGRVACGIIAIAAP
```

Figura 3.25. Predicción de epítopos de células T en la secuencia de OeSOD. La secuencia de la proteína se representa por duplicado mostrando los péptidos de unión a moléculas MHC-I de cerdo (amarillo) y MHC-II de ratón (azul). El péptido señal está representado en rojo, los residuos de aminoácidos implicados en la unión a Cu^{2+} y Zn^{2+} están resaltados en rojo negrita, y los residuos de cisteína implicados en los puentes disulfuro están marcados en negrita y con asteriscos.

La predicción de estructura 3D de OeSOD modeló 152 aminoácidos (aa 32-182), el 82,2% de la secuencia, con un 100% de confianza (Figura 3.26).

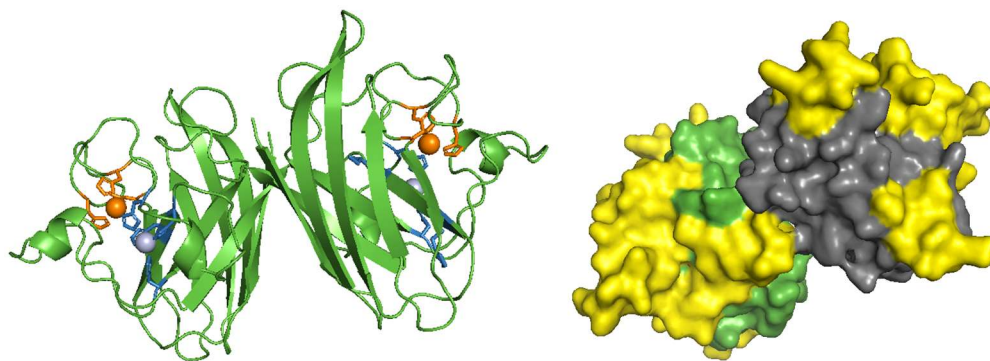


Figura 3.26. Modelo tridimensional de OeSOD que muestra la estructura conservada del dímero de la OeSOD, con cada monómero coloreado de forma diferente (verde y gris). Izquierda: Las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la unión al Cu y al Zn están resaltadas en azul y naranja, respectivamente. Derecha: modelo de superficie que muestra la exposición de los epítopos B lineales predichos en la superficie de la proteína (amarillo), cubriendo los bucles electrostáticos y de unión a metales

El modelo tridimensional (3D) resultante corresponde a un homodímero con la estructura conservada típica de las Cu/Zn-SODs. Cada monómero está compuesto por un barril de 8 láminas β y dos bucles prominentes: el 'bucle electrostático' y el 'bucle de unión a metales'. En la formación del dímero, los monómeros orientan sus sitios activos (bucles de unión a metales) hacia lados opuestos, interactuando entre sí a través de la cara contraria, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones reducen la superficie accesible al solvente, lo que incrementa significativamente la estabilidad del dímero (Rakhit y Chakrabarty, 2006). De acuerdo con este modelo 3D, todos los epítopos B lineales identificados en la Figura 3.24 se encuentran expuestos en la superficie del dímero, abarcando tanto el bucle electrostático como el de unión a metales, donde serían fácilmente accesibles a los anticuerpos del hospedador (Figura 3.26).

3.2.4. Sulfotransferasa (OeSULT-like)

El transcrito OE_39965 (GIXX02011269.1) codifica una proteína de 218 aminoácidos con un peso molecular de 23,7 kDa (GenBank MBZ4006487.1). Posee un péptido señal de 18 aa, sin dominios transmembrana ni sitios de anclaje GPI, y está anotada como “putative secreted protein 1669” (Tabla suplementaria 3.11).

A pesar de no tener una anotación funcional, esta proteína nos interesó por estar fuertemente sobreexpresada tras la alimentación, por su abundancia en la saliva y porque mostró similitud de secuencia con las sulfotransferasas de garrapatas (SULT), todo lo cual nos estimuló para llevar a cabo su caracterización molecular tras denominarla OeSULT-like.

Las sulfotransferasas catalizan la transferencia de un grupo sulfonilo (SO_3^-) desde el donante universal 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) a los grupos hidroxilo o amino en las moléculas sustrato, que pueden ser tanto macromoléculas como pequeñas moléculas, regulando su actividad. Las sulfotransferasas se han clasificado según su localización subcelular en (i) sulfotransferasas unidas a membrana, que típicamente actúan sobre macromoléculas, y (ii) sulfotransferasas citosólicas, que sulfonan muchas moléculas pequeñas, como hormonas endógenas, neurotransmisores y xenobióticos tales como fármacos, productos químicos ambientales y productos naturales (James y Ambapadi, 2013; Esposito Verza et al., 2022).

De acuerdo con las funciones conocidas de las SULTs en otras especies, se supone que las SULTs de garrapatas están involucradas en el control de la coagulación sanguínea en el hospedador, en la secreción de proteínas en la garrapata y en la regulación de la actividad de los esteroides en el hospedador y de los neurotransmisores en la garrapata (Yalcin et al., 2011). Recientemente se ha demostrado que dos SULTs citosólicas de *Ixodes scapularis* sulfonan los neurotransmisores dopamina y octopamina. Puesto que la dopamina estimula la salivación en garrapatas, las SULTs de *I. scapularis* podrían estar involucradas en la regulación de la secreción salival mediante la inactivación de la señal de salivación (Pichu et al., 2011).

La búsqueda de ortólogos de OeSULT-like en las bases de datos NCBI y UniProt recuperó numerosas secuencias relacionadas, de las cuales se seleccionaron 13. Estas incluían 4 secuencias de argásidos y 1 de ixódido anotadas como sulfotransferasas, y 8 secuencias de ixódidos anotadas como proteínas sin caracterizar. Todas ellas mostraron valores de $E < 10^{-32}$, porcentajes de identidad con la OeSULT-like del 30-40% y una cobertura de secuencia de entre 92 y 100%.

El alineamiento múltiple de OeSULT-like con los 13 ortólogos de garrapatas mostró que todas ellas se alineaban en el dominio carboxilo terminal de la sulfotransferasa EEC08826 de *I. scapularis* (Figura 3.27). Esta sulfotransferasa de *I. scapularis* presenta una longitud de 503 aa y está compuesta por dos dominios: un dominio sulfotransferasa amino-terminal y un dominio carboxilo-terminal sin ninguna función anotada (UniProt B7PQF4). Por su parte, OeSULT-like y los otros 12 ortólogos son proteínas más cortas, con una longitud cercana a los 220 aminoácidos lo que sugiere que podrían tratarse de proteínas incompletas carentes del dominio N terminal.

OeSULT-like	-----	0
XP_040069038_IXOSC	-----	0
XP_029827026_IXOSC	-----	0
XP_037288202_RHIMI	-----	0
XP_037527009_RHISA	-----	0
XP_037557248_DERSE	-----	0
XP_049514946_DERSE	-----	0
XP_040070765_IXOSC	-----	0
XP_029838795_IXOSC	-----	0
EEC08826_IXOSC	MSADIYRDVNGVFVGKHPEDAVLSVMAYQPQPGDIFIVSYPKCGTTWMQHIVYNILMDG	60
A0A293LLC8_ORNER	-----	0
A0A293N283_ORNER	-----	0
A0A293LPI5_ORNER	-----	0
A0A293N0C3_ORNER	-----	0
OeSULT-like	-----	0
XP_040069038_IXOSC	-----	0
XP_029827026_IXOSC	-----	0
XP_037288202_RHIMI	-----	0
XP_037527009_RHISA	-----	0
XP_037557248_DERSE	-----	0
XP_049514946_DERSE	-----	0
XP_040070765_IXOSC	-----	0
XP_029838795_IXOSC	-----	0
EEC08826_IXOSC	SPPPNKLDPIFRMPFLELQGADAARHGLKPGALKTHLPFDKHPYSEDAKYIYVTRNPFDC	120
A0A293LLC8_ORNER	-----	0
A0A293N283_ORNER	-----	0
A0A293LPI5_ORNER	-----	0
A0A293N0C3_ORNER	-----	0
OeSULT-like	-----	0
XP_040069038_IXOSC	-----	0
XP_029827026_IXOSC	-----	0
XP_037288202_RHIMI	-----	0
XP_037527009_RHISA	-----	0
XP_037557248_DERSE	-----	0
XP_049514946_DERSE	-----	0
XP_040070765_IXOSC	-----	0
XP_029838795_IXOSC	-----	0
EEC08826_IXOSC	CVSFYHHTKHFFPMYHFQDGTDFEFLDMFLAGKVDFGDYFEHLLSWYDHKDDANVFLTYE	180
A0A293LLC8_ORNER	-----	0
A0A293N283_ORNER	-----	0
A0A293LPI5_ORNER	-----	0
A0A293N0C3_ORNER	-----	0
OeSULT-like	-----	0
XP_040069038_IXOSC	-----	0
XP_029827026_IXOSC	-----	0
XP_037288202_RHIMI	-----	0
XP_037527009_RHISA	-----	0
XP_037557248_DERSE	-----	0
XP_049514946_DERSE	-----	0
XP_040070765_IXOSC	-----	0
XP_029838795_IXOSC	-----	0
EEC08826_IXOSC	DLKKDTRSWLYRIADFLGEDYGTGLRGDDGLVEKVLKMSLEGMKKTVDANFKSTPGADA	240
A0A293LLC8_ORNER	-----	0
A0A293N283_ORNER	-----	0
A0A293LPI5_ORNER	-----	0
A0A293N0C3_ORNER	-----	0
OeSULT-like	-----MNIAPVLLCLVFALGA	16
XP_040069038_IXOSC	-----MGLLQLVLFCEGFIAGV	16
XP_029827026_IXOSC	-----MGLLQLVLFCEGFIAGV	16
XP_037288202_RHIMI	-----MYWYLYSLVTITCM-IQGS	18
XP_037527009_RHISA	-----MHWYLYSLVTITAYM-MKGS	18
XP_037557248_DERSE	-----MHLYLYCLVPLAYMLMQGS	19
XP_049514946_DERSE	-----MFAF-STRDSCTFA--ASVSKKMHLVLYCLVPLAYMLMQGS	38
XP_040070765_IXOSC	-----MAISSLFVCSLVIAGA	16
XP_029838795_IXOSC	-----MMTKYATFLLAFLVAGA	17
EEC08826_IXOSC	SPEEMEKVPELQKGLQNLNRNFLAKPMTGDFDDGLKSAHQRFIMTKYATFLLAFLVAGA	300
A0A293LLC8_ORNER	-----MVTYYVLLGFLATVV	15
A0A293N283_ORNER	-----MMFSSVFLGFLAAGC	16
A0A293LPI5_ORNER	-----MLFCVVLLGFLTTGC	15

A0A293N0C3_ORNER	-----MPACVKPRRG-----TLHTKLEMLFCVLLLGFLATGC	32
OeSULT-like	RAGGPLDSNRYLDHLLSDTFPRF---GGVTEGTVSGFKFKVLKTSV-SNRDLKVKKAENGR	72
XP_040069038_IXOSC	LAGSKYDSNVYIDSIYSTVL PANARSLGLDSVDVPSYAFIVNSTSL-TNRDLHVEFHGGK	75
XP_029827026_IXOSC	LAGSKYDSNVYIDSIYSTVLPTNARSLGLDSVDVPSYAFIVKSTSL-TNWDLHVEFHGGK	75
XP_037288202_RHIMI	DAGSPVDSNLYIDSLTTLVPLHARSLGLENVSLPNCAFKVPSTAV-TNRDVSVELHGGW	77
XP_037527009_RHISA	EAGSPVDSNLYVDSLTTTLVPLHARSLGLENISVPNCAFKVPSTAV-TNRDVTVELHSGR	77
XP_037557248_DERISI	EAGSPVDSNLYVDSLTTTLVPLHARSLGLENVSVPNCAFKVPSTAV-TNRDVCVELHGGR	78
XP_049514946_DERISI	EAGSPVDSNLYVDSLTTTLVPLHARSLGLENVSVPNCAFKVPSTAV-TNRDVCVELHGGR	97
XP_040070765_IXOSC	FAGSILDANMYMDAVLRDHLPGNVRSNLNDPVGVPAPFNVKVDSTGF-TNRDLKAEFRSGT	75
XP_029838795_IXOSC	LAGTPQDSNLYLDVSLRDHLPGNVRSNLNDPATLPELKVKVKSTFV-TNRELKAE LRNGA	76
EEC08826_IXOSC	LAGTPQDSNLYLDVSLRDHLPGNVRSNLNDPATLPELKVKVKSTFV-TNRELKAE LRNGA	359
A0A293LLC8_ORNER	LAGSKYESNHLYD TVLLNYPNNIRIRKLDPIKTPDFNVKVEGSTFQ--HDFKAKFRNGS	73
A0A293N283_ORNER	YGATKYEANSYIDAALRTYLPNHVRNLRLDPAKLPDFDVKLKSHLVGLQKFKGKFTTEGA	76
A0A293LP15_ORNER	FAGTKYDSNSYIDTVLSKHVPNNVRVLKLDPAPLPDVQLKVKGK-----ANLTRGH	66
A0A293N0C3_ORNER	SAGSKYEANAYIDTVLRNYVNNVRLKLDPAPLPDFQVKLKGELL--KKFKAKLSQGG	90
	.. : * * : * : . * : : : *	
OeSULT-like	VTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTLSICYVTLDALTAVYSGSYKGD TLLGR TKDFRIQ	132
XP_040069038_IXOSC	LVGLVS-PGLVRWGDCSAPGWQGFNVTLGCVLSLDNLHLSYVGSAGKDSVLNTNKTLSLN	134
XP_029827026_IXOSC	LVGLVS-PGLVRWGDCSAPGWQGFNVTLGCVLSLDNLHLSYVGSAGKDSVLNTNKTLSLN	134
XP_037288202_RHIMI	LLGLVS-PGLARRGDCSAPGWQGMNITVGCYVSLDNAHLSYAGSAKGD SLLNTNRSIVLQ	136
XP_037527009_RHISA	LLGLVT-PGLARRGDCSAPGWLGMNITVGCYVSLDNAHLSYAGSAKGD SLLNTNRSIVLQ	136
XP_037557248_DERISI	LLGLVT-PGLARRGDCSAPGWLGMNITVGCYVSLDNAHLSYAGSAKGD SLLNTNRSIVLQ	137
XP_049514946_DERISI	LLGLVT-PGLARRGDCSAPGWLGMNITVGCYVSLDNAHLSYAGSAKGD SLLNTNRSIVLQ	156
XP_040070765_IXOSC	LYGLS--STLRRRGDCSAPGWQGMNITVGCYVSLDNAHLSYAGSAKGD SLLNTNRSIVLQ	133
XP_029838795_IXOSC	VHGLS--TALRRRGDCSAPGYQGPNTVTCGNVNL DGVSVSYEVKAKGHN FAGIKTKYNLD	134
EEC08826_IXOSC	VHGLS--TALRRRGDCSAPGYQGPNTVTCGNVNL DGVSVSYEVKAKGHN FAGIKTKYNLD	417
A0A293LLC8_ORNER	IYGLS--TVVRLRGDCGAPGWQAGNVTIGCYLT VNGLKAHYNVSSKGD TVLNKKKEYTAD	131
A0A293N283_ORNER	LYGLS--N-VARRGDCSAPGWQGTNVTIGCYI SLDGVR AHYHVT SKGDSLDFS KKKY GAD	133
A0A293LP15_ORNER	LYGLS--K-LQRRGDCSAPALKGKNVT LGCYVALDGLRSQFN FSAQGDPSFDS KKKY TVD	123
A0A293N0C3_ORNER	LYGLS--HVQRRGDCSPPGWQGRNVT LGCWLALDGLRSHF DVVSEGD SFLDKKKY TID	148
	: ** : * * : * . * : * . : : : : * . . :	
OeSULT-like	ADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRETFNRELEGNVKQ	192
XP_040069038_IXOSC	VVPVKSSAFIEVTS GSGGIPSLRTWLIRPLNFSVGVT KPLTNDQRKSAFQSEIAKHSQA	194
XP_029827026_IXOSC	VVPVKSSAFIEVTS GSGGIPSLRTWLIRPLNFSVGVT KPLTNDQRKSAFQSEIAKHSQA	194
XP_037288202_RHIMI	AAPFSANALLEVTSTPGGVPRVRTWALQPF TFVAVGTS PKLSLNT PRQATFDFKEASKCAYA	196
XP_037527009_RHISA	AAPFSANALLEVTSTPGGVPRVRTWALQPF TFVAVGTS PKLSLNT PRQATFDFKEASKCAYA	196
XP_037557248_DERISI	AAPFSANALLEVTSTPGGVPRVRTWALQPF TFVAVGTS PKLSLNT PRQATFDFKEASKCAYA	197
XP_049514946_DERISI	AAPFSANALLEVTSTPGGVPRVRTWALQPF TFVAVGTS PKLSLNT PRQATFDFKEASKCAYA	216
XP_040070765_IXOSC	LIVEKTNAFVEATSWSGRPAVLKTLTVTG VNFRI NMNKS LHLN SKRQKKFEKAI S QSVQN	193
XP_029838795_IXOSC	LYVQNTNVFVEVTSWPPQAGVLKTLTLGGVD FRIVHGKSLGLNKKRQQAYDEELKRSVQG	194
EEC08826_IXOSC	LYVQNTNVFVEVTSWPPQAGVLKTLTLGGVD FRIVHGKSLGLNKKRQQAYDEELKRSVQG	477
A0A293LLC8_ORNER	FVAANSTVFLEVTVRQPRAPSVKTL SVRKVAFKASLSKKLDLNRNMDAFLSKANETVHR	191
A0A293N283_ORNER	LTVRNTNAFVEVTVRQPRAPSVKTL SVDRILSLSVSKELKLNQDRQLQLED SVKETVER	193
A0A293LP15_ORNER	LIVKNTNLFVEVTVRQPKPSPFVKT VTKVDKIPFNVTASKPLDLSNKGWALDASVKGVEK	183
A0A293N0C3_ORNER	LAVKNSNIFVEVTVQLKPRFPFVKTVSVGNISFNLTASKTLDLNSKRWKAMDASVKEVVQE	208
	.. : * . * : : : : **	
OeSULT-like	SLNGFLYGPLQSANAVRVD SLPMP	218
XP_040069038_IXOSC	ALLNVLLVRFKEAVERS SVRSVKMPKP	220
XP_029827026_IXOSC	ALLNVLLVRFKEAVERS SVRSVKMPKP	220
XP_037288202_RHIMI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	222
XP_037527009_RHISA	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	222
XP_037557248_DERISI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	223
XP_049514946_DERISI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	242
XP_040070765_IXOSC	LFLGVLYGPFREALNRSVARVALPRA	219
XP_029838795_IXOSC	ALISLIYGKFRDALNLSVSRVAMPRV	220
EEC08826_IXOSC	ALISLIYGKFRDALNLSVSRVAMPRV	503
A0A293LLC8_ORNER	SVSDVLYTSFRKALDVS VKALPLPRP	217
A0A293N283_ORNER	SVRDVLYWQFRKALDLSFAGMPMPNV	219
A0A293LP15_ORNER	GVRNALYGDFFKALQLSVKALQLP--	207
A0A293N0C3_ORNER	GVRNILEYGPFRKALQLSAQVLQLPQA	234
	. . : : * : : : *	
		% identity
OeSULT-like	SLNGFLYGPLQSANAVRVD SLPMP	218
XP_040069038_IXOSC	ALLNVLLVRFKEAVERS SVRSVKMPKP	39.81
XP_029827026_IXOSC	ALLNVLLVRFKEAVERS SVRSVKMPKP	40.00
XP_037288202_RHIMI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	40.00
XP_037527009_RHISA	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	38.91
XP_037557248_DERISI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	38.46
XP_049514946_DERISI	SLSNVLLVAYREALERAVSATRLPLP	39.07
XP_040070765_IXOSC	LFLGVLYGPFREALNRSVARVALPRA	36.53
XP_029838795_IXOSC	ALISLIYGKFRDALNLSVSRVAMPRV	36.11
EEC08826_IXOSC	ALISLIYGKFRDALNLSVSRVAMPRV	36.11
A0A293LLC8_ORNER	SVSDVLYTSFRKALDVS VKALPLPRP	35.40
A0A293N283_ORNER	SVRDVLYWQFRKALDLSFAGMPMPNV	32.31
A0A293LP15_ORNER	GVRNALYGDFFKALQLSVKALQLP--	31.60
A0A293N0C3_ORNER	GVRNILEYGPFRKALQLSAQVLQLPQA	30.40
	. . : : * : : : *	

Figura 3.27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de OeSULT-like y de las secuencias ortólogas de garrapatas. Se muestran los códigos de acceso GeneBank/Uniprot para los ortólogos: DERISI, *Dermacentor silvarium*; IXOSC, *Ixodes scapularis*; ORNER, *Ornithodoros erraticus*; RHIMI, *Rhipicephalus microplus*; RHISA, *Rhipicephalus sanguineus*. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias están marcados con asteriscos (*); las sustituciones conservadoras y semiconservadoras están marcadas con dos puntos (:) y punto (.), respectivamente.

El análisis filogenético agrupó a las sulfotransferasas de garrapatas en 3 clados apoyados por valores bootstrap de 98%, 82% y 99%, respectivamente. El clado 1 incluye 4 sulfotransferasas identificadas previamente en el intestino de *O. erraticus* (Bioproject PRJNA401392; Oleaga et al., 2018). El clado 2 incluye únicamente secuencias del género *Ixodes*. El clado 3 incluye a la OeSULT-like junto con varios ortólogos sin caracterizar de los géneros *Ixodes*, *Rhipicephalus* y *Dermacentor* (Figura 3.28).

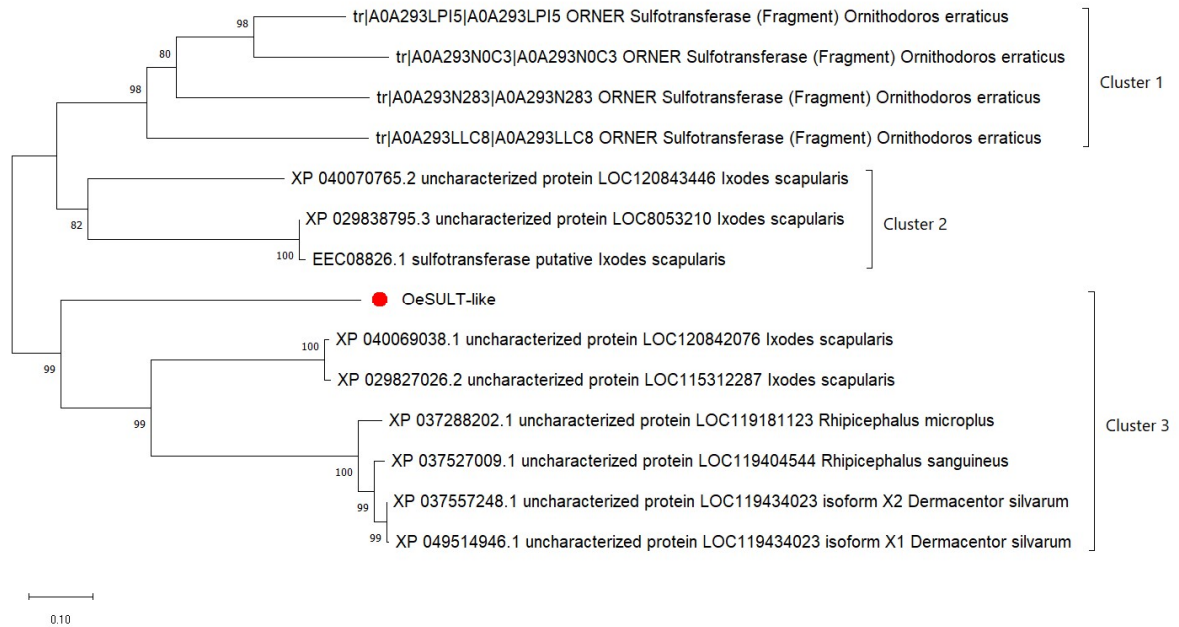


Figura 3.28. Análisis filogenético de OeSULT-like (punto rojo) y sus 13 ortólogos en garrapatas. Se muestran el código de acceso GenBank, la descripción de la proteína y el nombre de la especie para los ortólogos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson.

La Figura 3.29 compara los modelos 3D de la sulfotransferasa EEC08826 de *I. scapularis* y de OeSULT-like, mostrando que el dominio carboxilo terminal de las dos secuencias comparten la misma estructura tridimensional. El modelo 3D de OeSULT-like consta de 190 aminoácidos (aa 21-211), que representa el 87,2% de su secuencia y está modelado con un nivel de confianza del 100%.

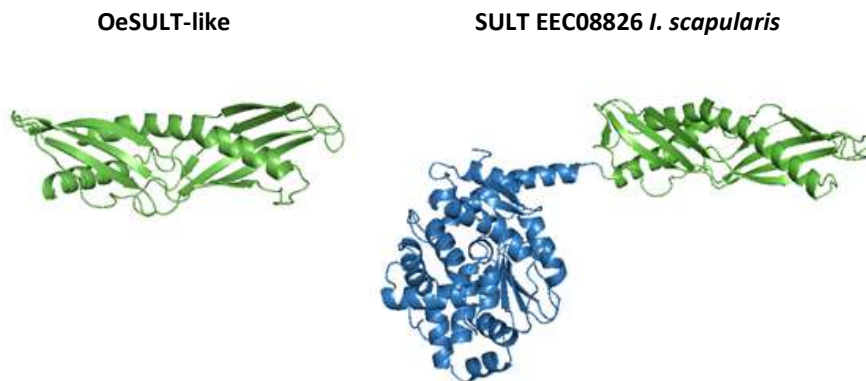


Figura 3.29. Modelos 3D de OeSULT-like (Swiss model) y de la sulfotransferasa EEC08826 de *I. scapularis* (AlphaFold, tomado de Uniprot B7PQF4). El dominio OeSULT-like y el dominio C-terminal de EEC08826 comparten una estructura 3D conservada similar (verde).

En la Figura 3.30 se observa que el dominio N terminal de la sulfotransferasa EEC08826 de *I. scapularis* tiene una estructura 3D similar a una sulfotransferasa de artrópodos bien caracterizada, la sulfotransferasa citosólica AGAP001425-PA de *Anopheles gambiae* (Esposito Verza et al., 2022).

EEC08826 *I. scapularis*

AGAP001425-PA *A. gambiae*

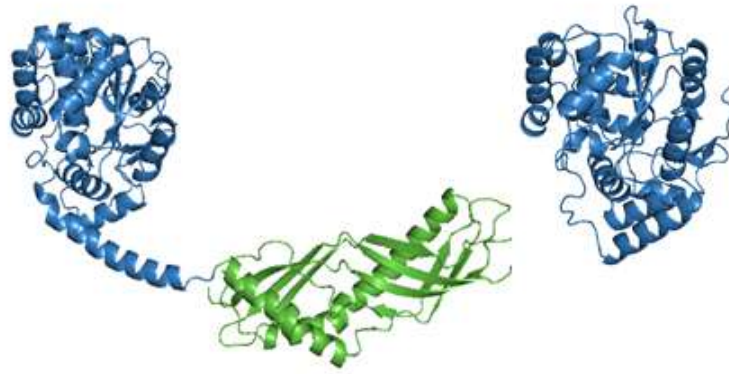


Figura 3.30. Modelos 3D de la sulfotransferasa EEC08826 de *I. scapularis* y de la sulfotransferasa citosólica AGAP001425-PA de *Anopheles gambiae* (AlphaFold, tomado de Uniprot Q7PXJ0). El dominio N-terminal de EEC08826 y la AGAP001425-PA comparten una estructura 3D conservada similar (azul).

La predicción de epítopos B en la secuencia de OeSULT-like detectó hasta 7 epítopos que cubren prácticamente la secuencia entera salvo el péptido señal (Figura 3.31).

```
>OeSULT-like
001 MNIAPVLLCLVFALGAGAGGGLDSNRYLDHLLSDTFPRFGGVTEGTVSGFKFKVLKTSVSNRDLKVKAEGRVTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTI
MNIAPVLLCLVFALGAGAGGGLDSNRYLDHLLSDTFPRFGGVTEGTVSGFKFKVLKTSVSNRDLKVKAEGRVTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTI
MNIAPVLLCLVFALGAGAGGGLDSNRYLDHLLSDTFPRFGGVTEGTVSGFKFKVLKTSVSNRDLKVKAEGRVTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTI
101 SCYVTLDAITAVYSGSYKGDITLLGRTKDFRIQADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRETFNRELEGNVKQSLNGFLY
SCYVTLDAITAVYSGSYKGDITLLGRTKDFRIQADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRETFNRELEGNVKQSLNGFLY
SCYVTLDAITAVYSGSYKGDITLLGRTKDFRIQADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRETFNRELEGNVKQSLNGFLY
201 PLQSALANAVRVDSLMP
PLQSALANAVRVDSLMP
PLQSALANAVRVDSLMP
```

Figura 3.31. Predicción de epítopos B lineales en la secuencia de OeSULT-like. La secuencia de la proteína se representa por triplicado mostrando las predicciones de ABCpred (amarillo), BCEpred (azul) y BepiPred-2.0 (verde). Los aminoácidos de los epítopos predichos por al menos dos algoritmos aparecen resaltados en recuadros. El péptido señal se representa en rojo, y los residuos de aminoácidos implicados en la unión al calcio se destacan en negrita.

La predicción de epítopos T detectó 7 péptidos MCH-I distribuidos a lo largo de toda la secuencia de la proteína y 5 péptidos MCH-II cuyas secuencias se solapan con los péptidos MHC-I (Figura 3.32).

```

>OeSULT-like
001 MNIAPVLLCLVFALGARAGGPLDSNRYLDHLLSDTFPRFGGVTEGTVSGFKFKVLKTSVSNRDLKVKAEENGRVTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTI
    MNIAPVLLCLVFALGARAGGPLDSNRYLDHLLSDTFPRFGGVTEGTVSGFKFKVLKTSVSNRDLKVKAEENGRVTGLQPPRGLRRLGDCSAPVWQGGNVTI
101 SCYVTLDDALTAVYSGSYKGDITLLGRKDFRIQADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRRTFNRELEGNVKQSLNGFLYG
    SCYVTLDDALTAVYSGSYKGDITLLGRKDFRIQADLRNSKAFIEVTAHPGNAPALRGWSVTPFNLHFTLSKTPDLNSQRRRTFNRELEGNVKQSLNGFLYG
201 PLQSALANAVRVDSTPMP
    PLQSALANAVRVDSTPMP

```

Figura 3.32. Predicciones de epítomos de células T en la secuencia de OeSULT-like. La secuencia de la proteína se representa por duplicado mostrando los péptidos de unión a moléculas MHC-I de cerdo (amarillo) y MHC-II de ratón (azul).

Según el modelo 3D de OeSULT-like, los epítomos B se encuentran expuestos en la superficie de la molécula, donde serían fácilmente accesibles a los anticuerpos del hospedador (Figura 3.33).

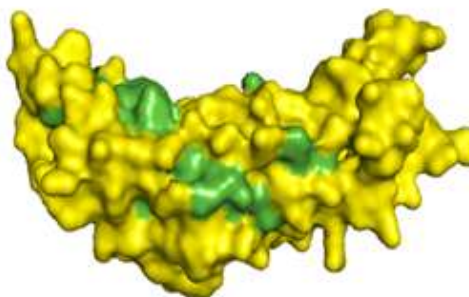


Figura 3.33. Modelo de superficie 3D de OeSULT-like que muestra la exposición de los epítomos B lineales en la superficie molecular (amarillo).

Como se describió anteriormente, el análisis topológico de los cuatro candidatos (OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like) evidenció que todos ellos poseen señales de secreción clásicas y carecen de estructuras de anclaje a la membrana, como sitios GPI o dominios transmembrana. Este hallazgo indica que estas proteínas son secretadas hacia la saliva de la garrapata mediante rutas de secreción clásicas (Díaz-Martín et al., 2013a). En este contexto, y de acuerdo con la definición propuesta por Nuttall et al. (2006), los cuatro candidatos pueden clasificarse como antígenos "expuestos" al sistema inmunológico del hospedador durante la picadura. Por lo tanto, es razonable anticipar que las formas nativas de estas proteínas podrían potenciar la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación con sus formas recombinantes en sucesivos contactos entre el hospedador vacunado y la garrapata.

Las predicciones de epítomos B lineales y epítomos T confirmaron la presencia de ambos tipos a lo largo de toda la secuencia de las proteínas maduras secretadas, lo que respalda su potencial antigenicidad. Adicionalmente, los modelos tridimensionales de los cuatro candidatos demuestran que los epítomos B lineales se localizan en la superficie de las proteínas, lo que los haría fácilmente accesibles a los anticuerpos generados por el hospedador.

Por otra parte, el alineamiento múltiple de cada candidato con sus ortólogos en otras especies de garrapatas mostró que, excepto para OeATSP, dichos ortólogos comparten motivos estructurales y de secuencia conservados, y que la mayoría de estos motivos están localizados en regiones antigénicas. Si se asume que los efectos protectores de la vacuna derivan de la pérdida de función de los antígenos diana tras la formación de complejos inmunes con los anticuerpos del hospedador, entonces la conservación de epítomos protectores en motivos antigénicos accesibles a los anticuerpos podría favorecer la inducción de respuestas protectoras frente a diferentes especies de garrapatas que presenten ortólogos conservados del antígeno diana. Todo lo anterior resalta el potencial de estas proteínas como candidatos a antígenos protectores y motivó la evaluación de su eficacia vacunal.

3.3. Producción de los candidatos como proteínas recombinantes.

Los cuatro candidatos seleccionados se expresaron satisfactoriamente en el vector PQE-30 como formas recombinantes truncadas (sin el péptido señal). Tras su purificación migraron en geles SDS-PAGE como bandas individuales, con una pureza estimada del 95,6%, 99,8%, 96,2% y 96,6% para rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y rtOeSULT-like, respectivamente (Figura 3.34).

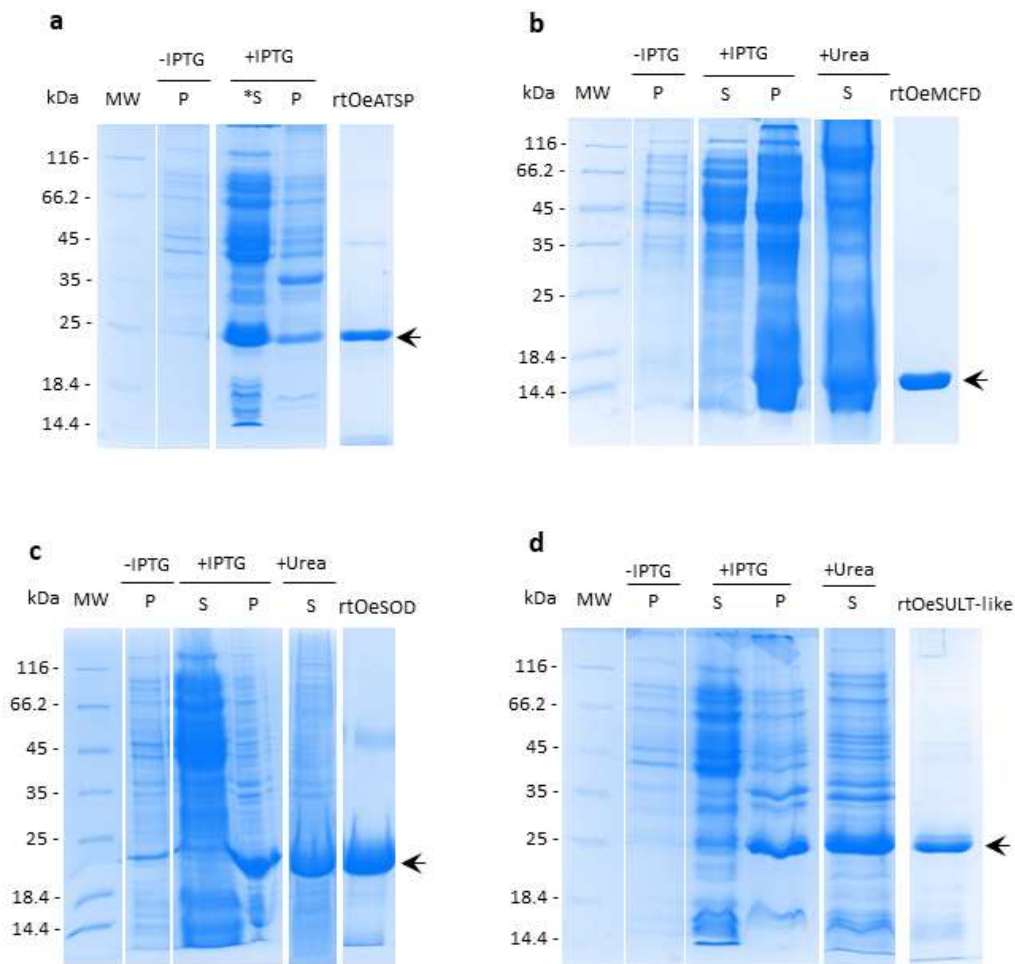


Figura 3.34. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes rtOeATSP (a), rtOeMCFD2 (b), rtOeSOD (c) y rtOeSULT-like (d). Geles SDS-PAGE 12% teñidos con azul Coomassie que muestran los lisados celulares completos antes de la inducción (-IPTG); los sobrenadantes (S), y los pellets (P) del lisado celular tras la inducción de la expresión proteica con IPTG (+IPTG); los sobrenadantes

tras la solubilización de los pellets con urea 8M (+Urea), y las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad en columna de níquel (flechas). MW. Patrones de peso molecular en kDa. *La rtOeATSP se expresó mayoritariamente en forma y no fue necesaria la solubilización con urea.

La proteína rtOeMCFD2 mostró un peso molecular experimental (MW) similar a su peso molecular teórico (14,5 kDa). Por el contrario, las formas recombinantes rtOeATSP, rtOeSOD y rtOeSULT-like mostraron unos pesos moleculares superiores a los calculados teóricamente (25, 22 y 26 kDa frente a 18, 18,5 y 23 kDa, respectivamente).

Por esta razón se consideró necesario conformar la identidad de estas tres proteínas recombinantes mediante análisis por espectrometría de masas (peptide mass fingerprint, PMF) de las bandas correspondientes cortadas de los geles de poliacrilamida.

Los resultados de este análisis verificaron la identidad de las tres proteínas recombinantes (no mostrados).

Los resultados de este objetivo 3, junto con los del objetivo 4, han sido publicados en el siguiente artículo (ver ANEXO):

Carnero-Morán, Á., Oleaga, A., Cano-Argüelles, A.L., Pérez-Sánchez, R. (2023). Function-guided selection of salivary antigens from *Ornithodoros erraticus* argasid ticks and assessment of their protective efficacy in rabbits. Ticks and Tick-borne Diseases 14(6),102218. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102218>

OBJETIVO 4.**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA PROTECTORA INDIVIDUAL Y CONJUNTA DE LOS CANDIDATOS SALIVALES EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.**

Una vez obtenidos los candidatos seleccionados en forma de proteínas recombinantes truncadas (rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y rtOeSULT-like), la fase final de esta tesis doctoral se centró en evaluar su capacidad protectora, o eficacia vacunal, mediante ensayos de vacunación en animales. Estas evaluaciones se llevaron a cabo en tres experimentos diferenciados: en el primero, las proteínas recombinantes se administraron de manera individual; en el segundo, las cuatro proteínas se administraron de forma conjunta en una formulación multiantigénica; y en el tercero, se utilizó una combinación de antígenos protectores salivales e intestinales de *O. erraticus*.

4.1. Ensayo 1. Inmunización con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD y rtOeSULT-like y evaluación de la respuesta protectora frente a *O. moubata* y *O. erraticus*.**4.1.1. Respuesta inmune humoral.**

Los cuatro antígenos recombinantes indujeron fuertes respuestas humorales en los conejos vacunados.

Frente a cada proteína recombinante homóloga, los sueros obtenidos 14 días después de la tercera dosis antigénica y justo antes de la infestación con garrapatas (14 dpi) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 1/12.800 y densidades ópticas (DO) superiores a 0,5 (Figura 3.35a). Adicionalmente, los sueros recolectados 2 semanas después de la infestación (28 dpi) mostraron DO ligeramente más altas que los sueros obtenidos a los 14 dpi. Este resultado sugiere que, como era de esperarse, la alimentación de las garrapatas sobre los animales inmunizados produjo un refuerzo de la respuesta inmune, evidenciado por un aumento en la reactividad de los sueros (Figura 3.35a).

Frente a la saliva de *O. erraticus* los sueros tomados a los 14 dpi reaccionaron en ELISA con media (anti-SOD, anti- SULT-like) o baja (anti-ATSP, anti-MCFD2) intensidad, revelando así la presencia de formas nativas de OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like en este fluido (Figura 3.35b).

Los anticuerpos anti-OeMCFD2 y anti-OeSULT-like también reaccionaron con la saliva de *O. moubata*, aunque con baja intensidad, sugiriendo la presencia de epítomos compartidos en las proteínas ortólogas de esta especie (Figura 3.35c).

Como era de esperar, los sueros tomados a los 28 dpi (obtenidos 14 días después de la alimentación de las garrapatas) reaccionaron con la saliva de ambos *Ornithodoros* con una intensidad media-alta (Figura 3.35b, 3.35c).

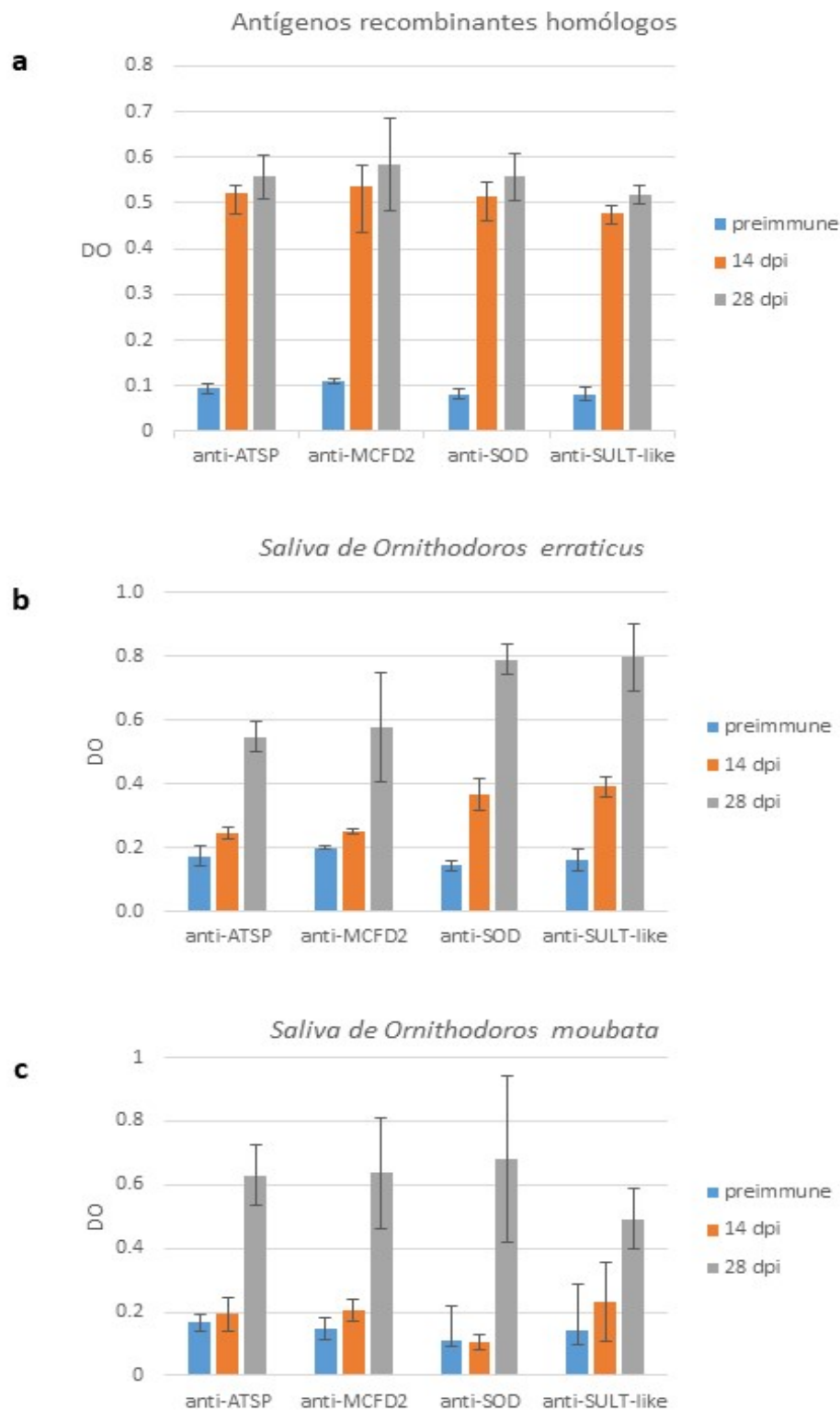


Figura 3.35. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD y rtOeSULT-like. Reactividad de los sueros frente a: **(a)** los antígenos recombinantes homólogos; **(b)** la saliva de *Ornithodoros erraticus* y **(c)** la saliva de *Ornithodoros moubata*. Los valores representados corresponden a la DO media $\pm$ DE (Desviación Estándar) de cada grupo de conejos. Los sueros se tomaron antes de la inmunización (preimmune), a los 14 días después de la inmunización (14 dpi), y a los 28 días después de la inmunización (28 dpi).

En western blot, los sueros obtenidos a los 14 dpi reconocieron en la saliva de *O. erraticus* varias bandas en el rango de 15–24 kDa, un tamaño compatible con el de las formas nativas de los antígenos (Figura 3.36b). Estos sueros también reconocieron unas bandas de tamaño similar en la saliva de *O. moubata* (Figura 3.36d), indicativo de la presencia de epítomos compartidos en las proteínas ortólogas de *O. moubata* que reaccionan con los anticuerpos inducidos.

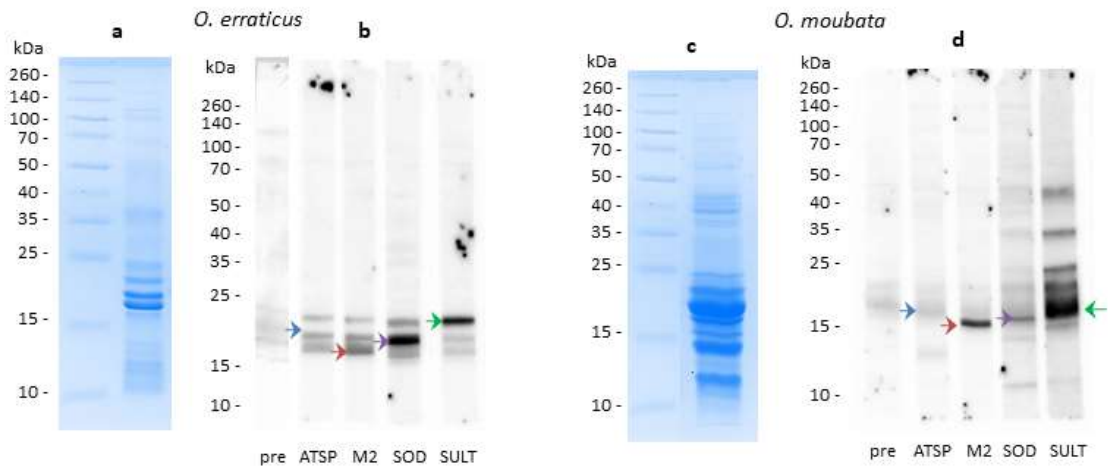


Figura 3.36. a, c Geles SDS-PAGE 12% teñidos con azul Coomassie de muestras de saliva de hembras de *Ornithodoros erraticus* (a) y de *Ornithodoros moubata* (c). b, d Western blots: antígenos revelados en la saliva de *O. erraticus* (b) y *O. moubata* (d) por los sueros de los conejos vacunados con los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y OeSULT-like. Los sueros se tomaron antes de la inmunización (preinmune, pre.) y 14 días tras la inmunización (dpi), inmediatamente antes de la infestación. Flechas: formas nativas de OeATSP (azul), OeMCFD2 (rojo), OeSOD (morado), and OeSULT-like (verde) reconocidos por los sueros.

De manera similar, la reactividad de sueros tomados a los 14 dpi frente a los extractos del intestino medio de *O. erraticus* y *O. moubata* se evaluó mediante ELISA (Figura 3.37) y western blot (Figura 3.38).

Ambos métodos revelaron una elevada reactividad de fondo causada por el reconocimiento inespecífico de la IgG ingerida con la sangre de los conejos, presente en todos los extractos del tubo digestivo.

Tras descontar esta reactividad inespecífica (es decir, la DO correspondiente a los sueros preinmunes), los resultados de ELISA mostraron una reactividad baja o muy baja frente al intestino medio de *O. erraticus* (DO alrededor de 0,1), salvo en el caso de los sueros anti-OeSOD, que presentaron reactividades medias (0,3-0,5 DO) frente al intestino de hembras no alimentadas (Figura 3.37a). La reactividad frente al intestino de *O. moubata* también fue baja, excepto para los sueros anti-OeSOD, que alcanzaron una DO cercana a 0,2 frente al intestino de hembras no alimentadas (Figura 3.37b).

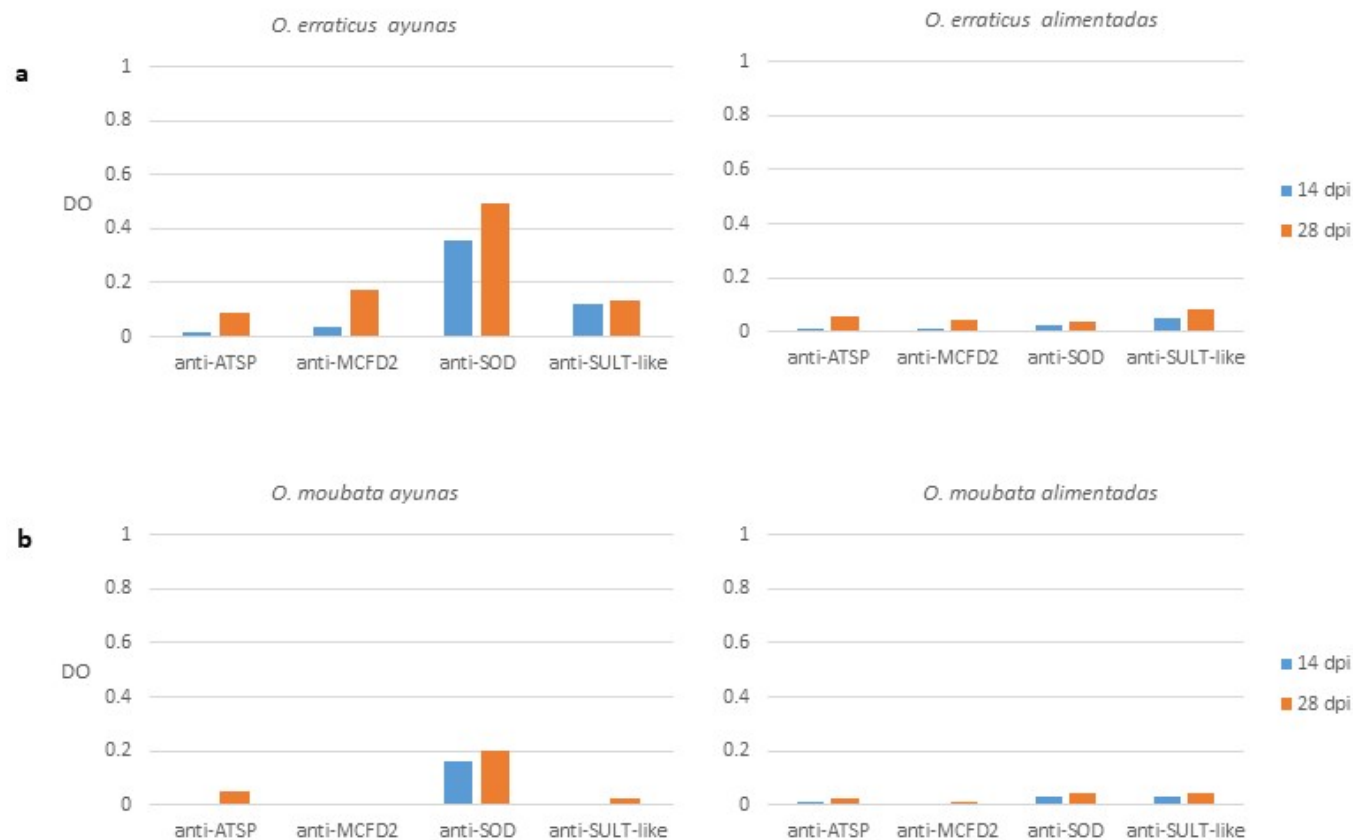


Figura 3.37. Niveles de anticuerpos (IgG) en los sueros de los conejos vacunados con los antígenos recombinantes OeATSP, OeMCFD2, OeSOD y OeSULT-like frente a extractos de proteínas del intestino medio de hembras de *Ornithodoros erraticus* (a) y *O. moubata* (b). Los intestinos se tomaron antes de la ingesta de sangre (en ayunas) y 48 horas después de la alimentación (alimentadas). Los valores representan la DO media $\pm$ DE a 492 nm (DO_{492} nm del suero inmune – DO_{492} nm del suero preinmune) de cada grupo de conejos. Los sueros fueron tomados antes de la inmunización (preinmune), 14 días tras la inmunización (14 dpi) y 28 días tras la inmunización (28 dpi).

En western blot (Figura 3.38), el suero anti-OeATSP reveló, en los extractos de ejemplares sin alimentar de ambas especies, una banda poco clara de 38 kDa que no fue revelada por el suero preinmune, lo que sugiere un reconocimiento específico y la existencia de epítomos compartidos entre la OeATSP y las proteínas intestinales de *O. erraticus* y *O. moubata*.

El suero anti-OeMCFD2 no reveló ninguna banda perceptible en el tubo digestivo, lo cual concordaba con la escasa o inexistente reactividad de este suero en el ELISA (Figuras 3.37 y 3.38).

El suero anti-OeSOD reconoció, en los extractos de intestino de ejemplares sin alimentar de ambas especies, dos bandas intensas de unos 15 y 40 kDa, compatibles con el tamaño de formas monoméricas y oligoméricas de la OeSOD nativa (Figura 3.38). Esta reactividad concuerda con la reactividad observada en el ELISA (Figura 3.37) e indica que OeSOD y su ortóloga en *O. moubata* comparten epítomos y que ambas se encuentran expresados en la saliva/glándulas salivales y en el tubo digestivo de estas garrapatas.

Finalmente, el suero anti-OeSULT-like reconoció, en el intestino de hembras sin alimentar de ambas especies y en el de hembras alimentadas de *O. moubata*, una banda de 30 kDa (Figuras 3.38b y 3.38d). Al igual que con OeATSP, este resultado sugiere que OeSULT-like comparte epítomos con las proteínas intestinales de *O. erraticus* y *O. moubata*.

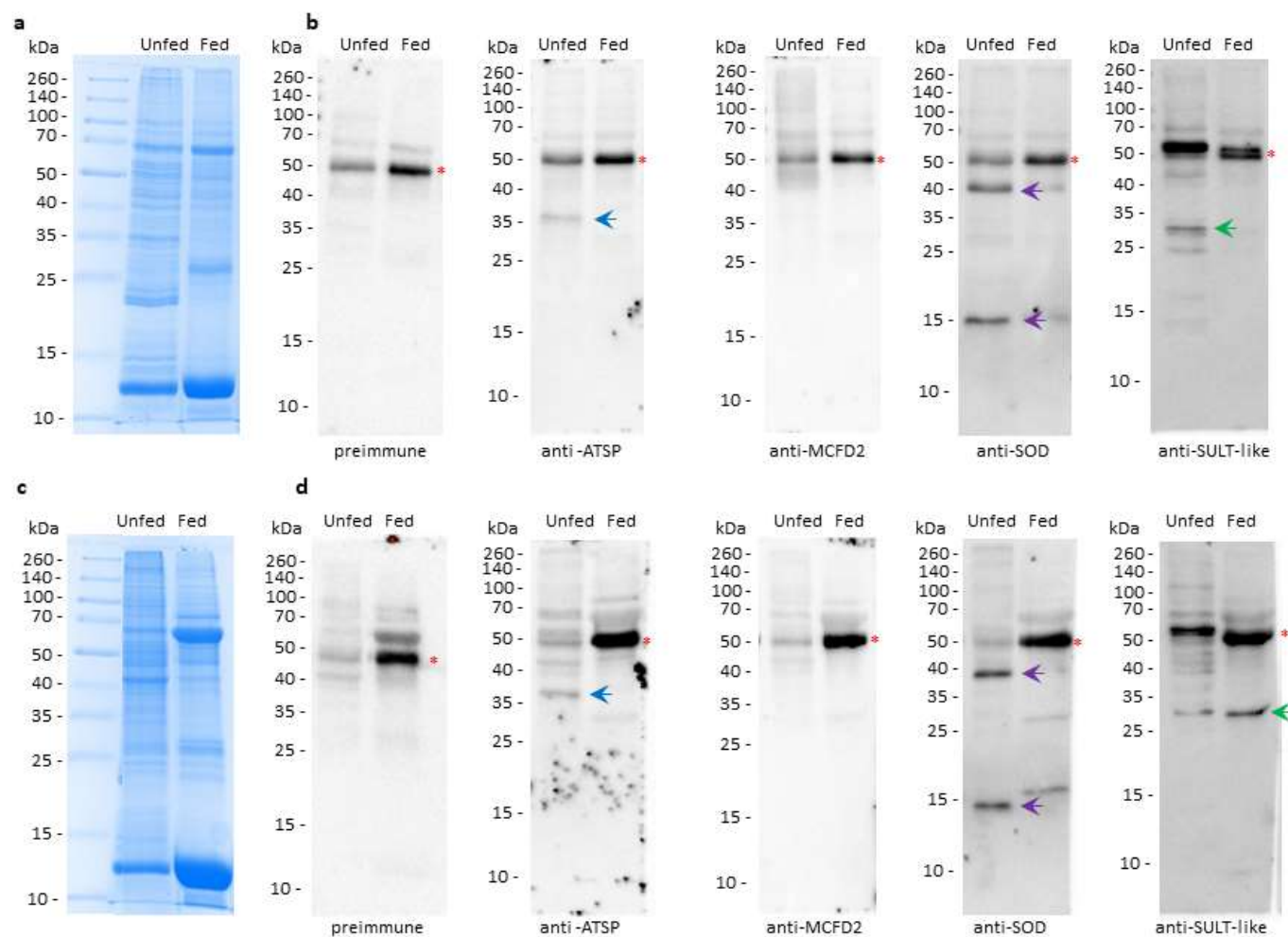


Figura. 3.38. a, c SDS-PAGE 12% teñidos con azul Coomassie que muestran los extractos de proteína del tubo digestivo de hembras de *O. erraticus* (a) y *O. moubata* (c) antes de la alimentación (unfed) y a las 48 horas de la alimentación (fed). b, d Western blots: antígenos revelados por los sueros de conejos vacunados con los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y OeSULT-like en los extractos de intestino de *O. erraticus* (b) y *O. moubata* (d). Los sueros se tomaron antes de la inmunización (preimmune) y 14 días tras la inmunización (14dpi). Asteriscos rojos: Cadena pesada de IgG. Flechas: formas nativas de OeATSP (38 kDa, azul), OeSOD (15 and 40 kDa, morado), y OeSULT-like (30 kDa, verde) reconocidas por los sueros tomados a los 14 dpi.

En resumen, todos los candidatos vacunales desencadenaron en los conejos respuestas inmunitarias robustas, demostrando una alta inmunogenicidad, en concordancia con la predicción de antigenicidad de VaxiJen y las predicciones de epítomos B lineales y epítomos T. Como era de esperar, estas respuestas reconocieron la proteína recombinante inductora, así como a las formas nativas de los candidatos expresadas en la saliva de *O. erraticus*. Por tanto, tampoco sorprende que dichas formas nativas hayan actuado como dosis de refuerzo antigénico durante la alimentación de las garrapatas, incrementando la respuesta humoral inducida por la vacuna. Este resultado permite esperar que se produzca un incremento en la protección frente a infestaciones posteriores, como, de hecho, se ha observado en estudios similares con *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2015a).

También se ha constatado que la mayoría de los sueros inmunes reconocieron formas nativas de los candidatos vacunales en el intestino de *O. erraticus* lo que podría indicar que estos candidatos se expresan tanto en las glándulas salivales como en el tubo digestivo. Este sería el caso de la OeSOD, como indica el hecho de que su mRNA fuese detectado en el transcriptoma intestinal de *O. erraticus* (Oleaga et al., 2015).

Otra posibilidad es que estos candidatos salivales compartan epítomos con determinados antígenos del tubo digestivo. Este es el caso de algunos antígenos salivales de garrapatas bien conocidos, como el antígeno 64P del cemento de *Rhipicephalus appendiculatus* (Trimnell et al., 2005).

Ambas posibilidades, es decir, la co-expresión de las proteínas en múltiples tejidos o la existencia de epítomos compartidos entre proteínas salivales e intestinales, hacen que estos candidatos sean interesantes antígenos de acción dual según la definición de Trimnell et al. (2002). Es decir, son antígenos que inducen la síntesis de anticuerpos capaces de reconocer tanto a antígenos salivales expuestos como a antígenos ocultos durante los contactos naturales garrapata-hospedador y, por tanto, tienen el potencial de afectar a varios órganos y procesos fisiológicos de la garrapata.

4.1.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.

En el caso de *O. erraticus*, la respuesta inmune inducida por cada antígeno recombinante tuvo los siguientes efectos:

- i. Reducciones generalizadas en la cantidad de sangre ingerida por la mayoría de las fases evolutivas, que fueron significativas en las hembras alimentadas sobre los conejos vacunados con las proteínas rtOeSOD y rtOeSULT-like
- ii. Reducciones significativas en la oviposición y fertilidad de las hembras en todos los grupos vacunados.

Además, todos los antígenos indujeron un aumento en la mortalidad de las ninfas, que fue significativo para rtOeATSP y rtOeMCFD2, mientras que rtOeATSP también indujo un aumento significativo en la mortalidad de las hembras. De acuerdo con estos resultados, la eficacia vacunal de los antígenos rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y rtOeSULT-like frente a las infestaciones de *O. erraticus* fue del 46.8%, 45.7%, 54.3% y 31.9%, respectivamente (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Efecto de la vacunación con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like en *O. erraticus*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ DE por grupo. En paréntesis, se indica el porcentaje de reducción de sangre ingerida, muda, oviposición y fertilidad, o el porcentaje de incremento de la mortalidad. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Parámetro	Fase evolutiva	Control	rtOeATSP (%)	rtOeMCFDs (%)	rtOeSOD (%)	rtOeSULT (%)
Sangre ingerida	Machos	4,6 $\pm$ 0,9	4,9 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 0,1 (19,6)	4,1 $\pm$ 0,9 (10,9)	4,8 $\pm$ 0,3
	Hembras	12,2 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 1,3 (7,4)	10,2 $\pm$ 1,9 (16,4)	10,0 $\pm$ 0,5 (18,0)*	8,6 $\pm$ 1,0 (29,5)**
	Ninfas-3	2,5 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3 (16,0)	2,3 $\pm$ 0,4 (8,0)	2,3 $\pm$ 0,2 (8,0)	2,3 $\pm$ 0,2 (8,0)
Mortalidad (%)	Machos	0	1,1 $\pm$ 1,5 (1,1)	1,1 $\pm$ 1,6 (1,1)	0	0
	Hembras	0	4,4 $\pm$ 3,1 (4,4)**	0	0	0
	Ninfas-3	1,3 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 8,2 (8,0)*	10,6 $\pm$ 2,7 (9,3)**	4,3 $\pm$ 3,4 (3,0)	3,3 $\pm$ 3,2 (2,0)
Muda (%)	Ninfas-3	91,6 $\pm$ 1,9	86,4 $\pm$ 19,7 (5,7)	91,5 $\pm$ 3,5	85,6 $\pm$ 12,4 (6,6)	94,0 $\pm$ 5,9
Oviposición ¹	Hembras	38,1 $\pm$ 2,8	24,3 $\pm$ 9,0 (36,2)*	20,1 $\pm$ 11,1 (47,2)**	19,3 $\pm$ 3,1 (49,3)**	22,3 $\pm$ 5,8 (41,5)**
Fertilidad ²	Hembras	31,9 $\pm$ 1,1	21,0 $\pm$ 8,9 (34,2)*	19,3 $\pm$ 9,9 (39,5)*	16,4 $\pm$ 3,0 (48,6)**	21,4 $\pm$ 5,3 (32,9)**
Eficacia (%)			46,8 $\pm$ 26,8	45,7 $\pm$ 28,6	54,3 $\pm$ 4,3	31,9 $\pm$ 20,2

¹ no. huevos/hembra; ² no. larvas/hembra

En suma, todos los candidatos indujeron respuestas inmunes que proporcionaron una protección significativa frente a *O. erraticus*, validándolos como antígenos protectores para el desarrollo de una vacuna frente a esta especie. Los principales efectos protectores consistieron en la reducción de la cantidad de sangre ingerida y, en consecuencia, en la oviposición y fertilidad de las hembras, mientras que otros parámetros como la muda y la mortalidad se vieron afectados en menor medida.

Las reducciones en la sangre ingerida confirman que los candidatos desempeñan funciones biológicas relacionadas con la alimentación de las garrapatas y la modulación de las respuestas defensivas del hospedador, de modo que una pérdida de su función -provocada por la unión de los anticuerpos- causa una alimentación deficiente. No obstante, los descensos que se observan en la cantidad de sangre ingerida (entre 7,4% y 29,5%) y, por consiguiente, en los nutrientes disponibles para la puesta de huevos, no explicarían por sí mismos los descensos en las tasas de reproducción, que fueron mucho más pronunciados (de 36,2% a 49,3%). Esto sugiere que la respuesta inmune inducida por la vacuna puede haber impactado no sólo en la ingestión de sangre, sino también en otros procesos fisiológicos como la digestión de la sangre, el transporte y metabolismo de nutrientes, o la gestión de los productos de desecho y el estrés oxidativo, los cuales son realizados principalmente por proteínas expresadas en el intestino medio (Chmelar et al., 2016; Sojka et al., 2016; Araujo et al., 2019). El reconocimiento de bandas antigénicas en los extractos del intestino medio de la garrapata por los sueros inmunes presta verosimilitud a esta hipótesis.

El candidato menos efectivo fue rtOeSULT-like (31,9%). Su caracterización molecular y modelado en 3D mostró que esta proteína estaba incompleta y carecía del dominio amino terminal, que es el que contiene el sitio activo de la sulfotransferasa. Por lo tanto, asumimos que los anticuerpos generados contra rtOeSULT-like no estaban dirigidos frente al sitio activo de la proteína y podrían haber sido poco efectivos a la hora de bloquear su función molecular. A pesar de esto, la respuesta inmune inducida por la proteína recombinante incompleta rtOeSULT-like proporcionó una protección significativa. En consecuencia, cabe suponer que la inmunización de los animales con la proteína rtOeSULT-like completa, incluyendo su dominio sulfotransferasa, podría aumentar significativamente la eficacia protectora de este antígeno.

En *O. moubata* no se registraron efectos protectores significativos (Tabla 3.10). En todos los grupos se produjeron reducciones en la ingesta de sangre y en la reproducción de las hembras, sin afectar o afectando de forma no significativa a la mortalidad y a la muda de las ninfas. Consecuentemente, las eficacias protectoras individuales de cada candidato frente a *O. moubata* fueron bajas: 0,7%, 3,9%, 3,1% y 8,7% en rtOeATSP, rtOeMCFD2, rtOeSOD y rtOeSULT-like, respectivamente.

Tabla 3.10. Efecto de la vacunación con las proteínas recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like en *O. moubata*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ DE por grupo. En paréntesis se indica el porcentaje de reducción de sangre ingerida, muda, oviposición y fertilidad, o el incremento del porcentaje en la mortalidad. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Parámetro	Fase evolutiva	Control	rtOeATSP (%)	rtOeMCFDs (%)	rtOeSOD (%)	rtOeSULT (%)
Sangre ingerida	Machos	24.0 $\pm$ 3.8	19.9 $\pm$ 1.6 (17.1)	21.9 $\pm$ 2.4 (8.8)	21.4 $\pm$ 2.3 (10.8)	26.2 $\pm$ 2.6
	Hembras	188.1 $\pm$ 18.4	180.3 $\pm$ 25.1 (4.1)	184.1 $\pm$ 37.9 (2.1)	156.5 $\pm$ 19.3 (17.8)	144.0 $\pm$ 28.4 (23.4)
	Ninfas-3	16.5 $\pm$ 0.04	16.4 $\pm$ 0.2	16.6 $\pm$ 0.7	17.4 $\pm$ 0.8	18.4 $\pm$ 0.4
Mortalidad (%)	Machos	12.2 $\pm$ 6.8	9.0 $\pm$ 1.6	3.3 $\pm$ 4.7	3.4 $\pm$ 2.8	0
	Hembras	6.6 $\pm$ 0	0	8.8 $\pm$ 3.1 (2.2)	6.6 $\pm$ 5.4	4.4 $\pm$ 6.2
	Ninfas-3	3.3 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 1.5 (2.7)	0.6 $\pm$ 0.9	0	2.0 $\pm$ 1.6
Muda (%)	Ninfas-3	99.3 $\pm$ 1.1	97.1 $\pm$ 5.0 (2.2)	95.2 $\pm$ 1.0 (4.2)	99.3 $\pm$ 1.2	96.6 $\pm$ 3.0 (2.7)
Oviposición ¹	Hembras	216.8 $\pm$ 24.3	211.1 $\pm$ 12.4 (2.62)	204.5 $\pm$ 30.7 (5.67)	201.7 $\pm$ 26.2 (6.9)	192.4 $\pm$ 35.4 (11.23)
Fertilidad ²	Females	203.8 $\pm$ 18.3	199.5 $\pm$ 8.4 (2.10)	202.4 $\pm$ 40.5 (0.68)	189.7 $\pm$ 29.9 (6.9)	182.3 $\pm$ 34.2 (10.5)
Eficacia (%)			0.7 $\pm$ 6.3	3.9 $\pm$ 17.7	3.1 $\pm$ 14	8.7 $\pm$ 19.3

¹ no. huevos/hembra; ² no. ninfas-1/hembra

4.2. Ensayo 2. Vacuna multiantigénica con antígenos salivales.

El objetivo de este ensayo fue doble: (i) evaluar la eficacia protectora conjunta de los 4 antígenos salivales anteriores formulados en una vacuna multiantigénica (tOeATSP+ tOeMCFD2+ tOeSOD+ tOeSULT-like) y (ii) comprobar si las infestaciones en los animales vacunados actuaban como dosis antigénicas de refuerzo aumentando la eficacia protectora.

4.2.1. Respuesta inmune humoral.

Todos los sueros inmunes tomados 14 dpi mostraron, frente a cada antígeno recombinante, títulos de anticuerpos IgG superiores a 1/12.800 y DO superiores a 0,5, lo que confirma que todos los animales desarrollaron fuertes respuestas humorales (Figura 3.39). El nivel de reactividad de los sueros se mantuvo prácticamente igual a los 28 dpi, 14 días después de la infestación, lo que sugiere que los niveles de anticuerpos podrían haber alcanzado su máximo nivel en los animales inmunizados.

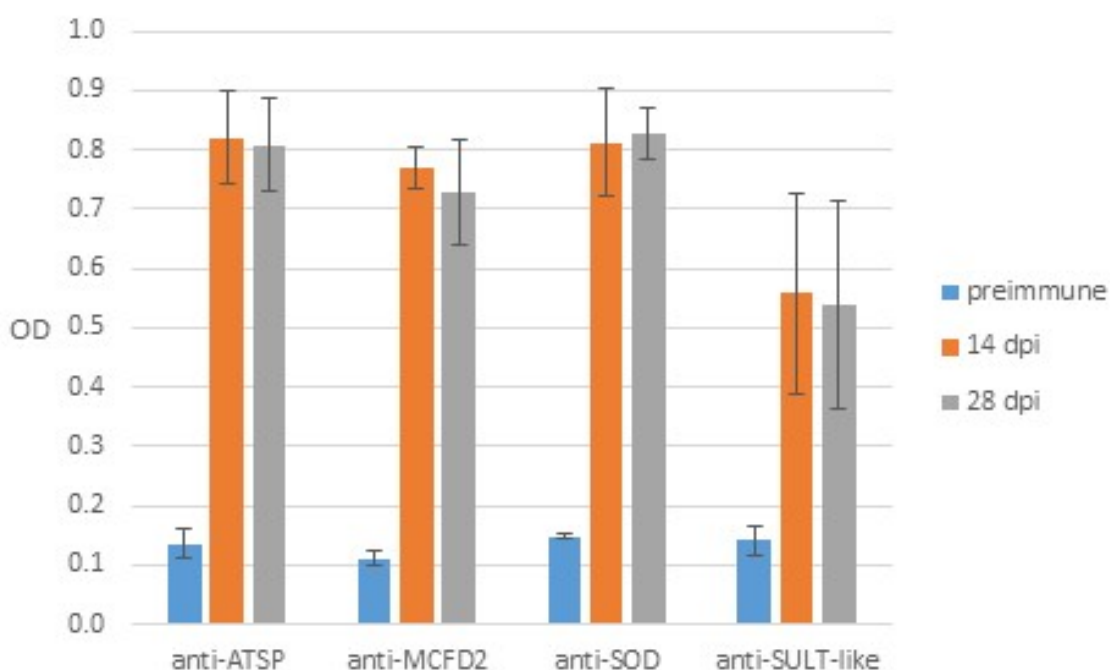


Figura 3.39. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con el cocktail antigénico que contiene los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD y rtOeSULT-like. Los valores representados corresponden a la DO media $\pm$ DE en cada grupo de conejos. Los sueros se tomaron antes de la inmunización (preimmune), a los 14 días tras la inmunización (14 dpi), y a los 28 días después de la inmunización (28 dpi).

4.2.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.

La Tabla 3.11 resume los efectos protectores inducidos por esta vacuna multiantigénica en *O. erraticus* y *O. moubata*.

En *O. erraticus*, la respuesta inmune redujo significativamente la cantidad de sangre ingerida y la fertilidad en las hembras, dando como resultado una eficacia protectora de 58,3% en la primera infestación, que fue un 7% más alta que la mejor eficacia protectora alcanzada con los candidatos administrados individualmente (Tabla 3.9). En la segunda infestación, de forma inesperada, la eficacia protectora se redujo a un 46,6%. No obstante, a pesar de esta disminución, esta protección es aún mayor que la protección media obtenida con los candidatos antigénicos administrados individualmente.

En *O. moubata*, los efectos protectores inducidos por la vacuna multiantigénica fueron cualitativamente similares a los observados en *O. erraticus*, aunque más débiles. Se obtuvieron unas reducciones bajas, pero significativas, en la ingesta de sangre, y unas reducciones bajas y no significativas en la reproducción de las hembras, lo que se tradujo en un 18,6% y un 16,4% de eficacia protectora en la primera y la segunda infestación, respectivamente.

Notablemente, a pesar de los bajos niveles de protección alcanzados frente a *O. moubata*, éstos fueron más del doble de la protección alcanzada con los candidatos administrados individualmente (Tabla 3.10).

Los resultados de este ensayo han demostrado que la administración conjunta de varios candidatos salivales dirigidos frente a diferentes funciones moleculares de la garrapata aumenta la eficacia de la vacuna contra *O. erraticus* en comparación con la administración individual de cada candidato. Incrementos similares en la eficacia vacunal también se han obtenido con otras vacunas multicomponente formuladas con antígenos salivales de *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2015a) o con antígenos del intestino medio de *O. erraticus* (Pérez-Sánchez et al., 2019b).

Sin embargo, en este ensayo la eficacia de la vacuna multiantigénica disminuyó en la segunda infestación. Esto fue inesperado, ya que el estudio de Díaz-Martín et al. (2015a) con antígenos salivales de *O. moubata* demostró que se producía un aumento en la eficacia de la vacuna con las sucesivas infestaciones de los conejos vacunados. Aunque desconocemos el porqué de lo observado en este ensayo, es posible que las tres dosis de la vacuna multicomponente hayan sido suficientes para elevar los niveles de anticuerpos a un máximo, como parecen sugerir los resultados en la Figura 3.39. En ese caso, el refuerzo antigénico proporcionado por la primera infestación no habría aumentado más ni los niveles de anticuerpos ni la consiguiente protección.

A pesar de esta observación, estos resultados demuestran que las vacunas multicomponentes proporcionan una mayor eficacia protectora que los antígenos individuales y respaldan la utilidad y conveniencia de desarrollar vacunas multiantigénicas para el control de garrapatas.

Tabla 3.11. Eficacia protectora del cocktail vacunal (rtOeATSP, rtOeMCFDs, rtOeSOD y rtOeSULT-like) en *O. erraticus* y *O. moubata*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ DE por grupo. En paréntesis, porcentaje de la reducción de sangre ingerida, muda, oviposición y fertilidad, o porcentaje del incremento en la mortalidad. Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Parámetros	Fase evolutiva	<i>Ornithodoros erraticus</i>				<i>Ornithodoros moubata</i>			
		Primera infestación		Segunda infestación		Primera infestación		Segunda infestación	
		Control	Vacunados (%)	Control	Vacunados (%)	Control	Vacunados (%)	Control	Vacunados (%)
Sangre ingerida	Machos	5.0 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 2.2 (14.7)	5.7 $\pm$ 1.6	4.6 $\pm$ 0.8 (19.1)	35.3 $\pm$ 2.3	32.4 $\pm$ 0.3 * (8.2)	33.0 $\pm$ 1.7	28.2 $\pm$ 2.4 * (14.6)
	Hembras	17.7 $\pm$ 2.2	12.9 $\pm$ 3 * (27.2)	14.8 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.4 ** (24.3)	264.7 $\pm$ 28	219.1 $\pm$ 26.4 * (17.3)	219.9 $\pm$ 43.1	218.4 $\pm$ 32.1 (0.7)
	Ninfas-3	4.4 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 1.7 (24.4)	4.4 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 1.6 * (37.9)	19.2 $\pm$ 1.4	19.0 $\pm$ 0.8 (0.9)	15.6 $\pm$ 1.1	15.3 $\pm$ 0.1 (1.8)
Mortalidad (%)	Machos	1.1 $\pm$ 1.9	0	0	0	4.4 $\pm$ 5.1	13.3 $\pm$ 3 * (8.9)	5.6 $\pm$ 2	10 $\pm$ 10.3 (4.4)
	Hembras	0	0	2.2 $\pm$ 3.9	2.2 $\pm$ 3.4	6.7 $\pm$ 0	6.7 $\pm$ 0	6.9 $\pm$ 7.1	9.2 $\pm$ 7.1 (2.3)
	Ninfas-3	0	2.4 $\pm$ 3.7 (2.4)	2.0 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.9 (0.5)	2.5 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 2.3 * (4.5)	4.2 $\pm$ 2.8	11.5 $\pm$ 9.2 (7.3)
Muda (%)	Ninfas-3	89.2 $\pm$ 6.7	91.7 $\pm$ 7.0	89.7 $\pm$ 6.8	85.1 $\pm$ 5.4 (5.1)	99.4 $\pm$ 1.1	97.9 $\pm$ 0.1 (1.5)	98.7 $\pm$ 2.2	97.3 $\pm$ 0.8 (1.4)
Oviposición (no. huevos/hembra)	Hembras	44.6 $\pm$ 2.6	37.6 $\pm$ 2.9 ** (15.7)	51.4 $\pm$ 2.2	33.0 $\pm$ 5.3 ** (35.8)	259.4 $\pm$ 55.4	233.2 $\pm$ 15.9 (10.1)	244.7 $\pm$ 24	232.3 $\pm$ 8.7 (5.1)
Fertilidad (no. larvas/hembra)	Hembras	33.3 $\pm$ 1.9	13.8 $\pm$ 1.7 ** (58.6)	28.9 $\pm$ 1.8	16.3 $\pm$ 5.2 ** (43.6)	241.5 $\pm$ 56	208.7 $\pm$ 21.2 (13.6)	225.5 $\pm$ 12.2	210.1 $\pm$ 5.8 * (6.8)
Eficacia (%)			58.3 $\pm$ 8		46.6 $\pm$ 18.4		18.6 $\pm$ 10		16.4 $\pm$ 17.1

4.3. Ensayo 3. Vacuna multiantigénica con antígenos salivales e intestinales.

El objetivo de este último ensayo fue evaluar la eficacia protectora de una vacuna multiantigénica formulada con una combinación de antígenos protectores salivales e intestinales de *O. erraticus* y comprobar la hipótesis de si este tipo de vacuna puede proporcionar una protección más completa frente a *O. erraticus* (y a *O. moubata*) al anular la función de varias proteínas diana en órganos y procesos biológicos distintos.

En concreto, los antígenos utilizados fueron los 3 salivales más eficaces validados en el ensayo 1 (OeATSP, OeMCFD2 y OeSOD) y los 4 intestinales más eficaces (OePK4, OeRPP0, OeTSP1, OeTSP2) validados en estudios previos (Pérez-Sánchez et al., 2019a, 2019b).

4.3.1. Respuesta inmune humoral.

Todos los sueros inmunes tomados a los 14 dpi mostraron, frente a cada antígeno recombinante, títulos de anticuerpos IgG superiores a 1/12.800 y DO superiores a 0,7, lo que confirma que todos los animales desarrollaron fuertes respuestas humorales (Figura 3.40). El nivel de reactividad de los sueros 28 dpi, tomados 14 días después de la infestación se mantuvo prácticamente invariable, lo que sugiere que los animales inmunizados podrían haber alcanzado su máximo nivel de anticuerpos.

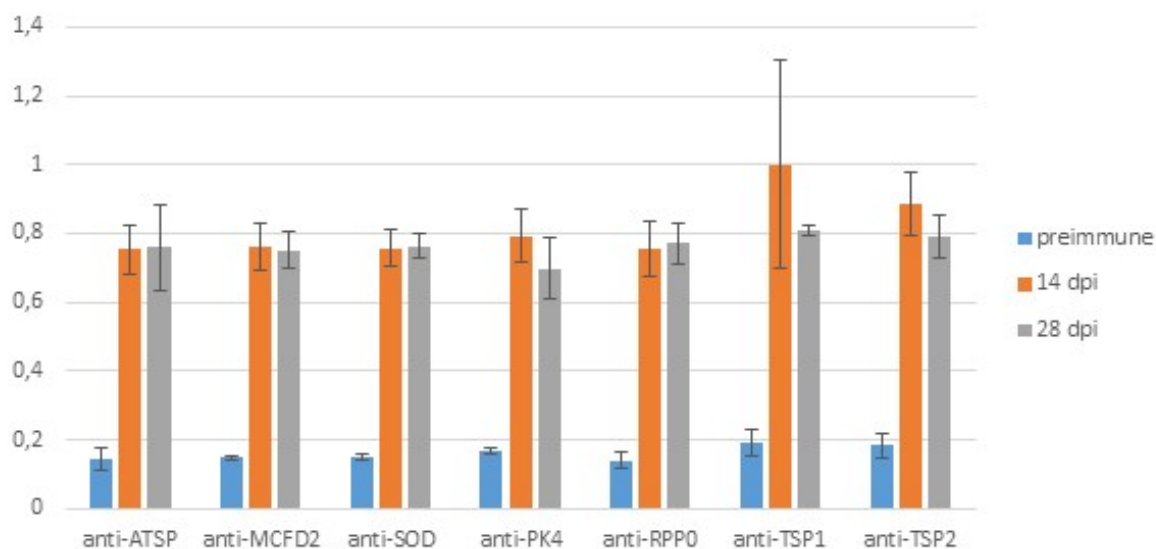


Figura 3.40. ELISA. Respuesta de anticuerpos (IgG) en los conejos vacunados con un cocktail antigénico formado por los antígenos recombinantes rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2. Los valores representados corresponden a la DO media $\pm$ DE de cada grupo de conejos. Los sueros se tomaron antes de la inmunización (preimmune), a los 14 días tras la inmunización (14 dpi), y a los 28 días después de la inmunización (28 dpi).

4.3.2. Efectos de la respuesta inmune sobre las garrapatas.

La Tabla 3.12 resume los efectos protectores inducidos por esta vacuna multiantigénica frente a la infestación con *O. erraticus* y *O. moubata*.

Tabla 3.12. Eficacia protectora del cocktail vacunal (rtOeATSP, rtOeMCFD, rtOeSOD, OePK4, OeRPP0, OeTSP1 y OeTSP2) en *O. erraticus* y *O. moubata*. Los resultados se muestran como la media $\pm$ DE para cada grupo de conejos. En paréntesis, porcentaje de la reducción de sangre ingerida, muda, oviposición, fertilidad y supervivencia. Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Parámetros	Fase evolutiva	<i>Ornithodoros erraticus</i>		<i>Ornithodoros moubata</i>	
		Control	Vacunados (%)	Control	Vacunados (%)
Sangre ingerida	Machos	4.0 $\pm$ 1.7	3.8 $\pm$ 1.1 (22.6)	35.3 $\pm$ 2.3 (7.7)	32 $\pm$ 6.9 (9.4)
	Hembras	17.7 $\pm$ 2.2	13.1 $\pm$ 1.2 (26.2)**	264.7 $\pm$ 28.2	208.1 $\pm$ 30.7 (21.4)*
	Ninfas-3	4.4 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 1.4 (17.9)	19.2 $\pm$ 1.4	18.7 $\pm$ 0.3 (2.4)
Supervivencia (%)	Machos	98.9 $\pm$ 1.9	93.3 $\pm$ 9.9 (5.6)	95.6 $\pm$ 5.1	91.1 $\pm$ 6.7 (4.5)
	Hembras	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 0	86.7 $\pm$ 5.8 (6.3)
	Ninfas-3	100 $\pm$ 0	97.4 $\pm$ 1.0 (2.6)*	97.5 $\pm$ 1.1	97.4 $\pm$ 1
Muda (%)	Ninfas-3	89.3 $\pm$ 6.7	78.9 $\pm$ 7.9 (10.4)	99.4 $\pm$ 1.1	94.1 $\pm$ 3.4 (5.3)*
Oviposición (no. huevos/hembra)	Hembras	44.6 $\pm$ 2.6	23.3 $\pm$ 1.9 (47.8)**	259.5 $\pm$ 55.4	202.8 $\pm$ 16.1 (21.8)*
Fertilidad (no. larvas/ hembra)	Hembras	33.2 $\pm$ 1.9	10.6 $\pm$ 0.8 (68.1)**	241.5 $\pm$ 56.3	182.4 $\pm$ 16.2 (24.5)**
Eficacia (%)			72.6		33.0

En *O. erraticus*, la respuesta inmune inducida por la vacuna redujo muy significativamente la cantidad de sangre ingerida y la fertilidad en las hembras y también, aunque menos significativamente, la supervivencia de las ninfas-3, proporcionando en conjunto una eficacia vacunal del 72,6% (Tabla 3.12).

En *O. moubata*, los efectos protectores inducidos por la vacuna multiantigénica fueron cualitativamente similares a los observados en *O. erraticus*, aunque de menor magnitud. En esta especie se obtuvieron reducciones significativas de la ingesta de sangre, y un bajo, pero significativo descenso en la tasa de muda de las ninfas-3, lo que se tradujo en un 33% de eficacia protectora.

Estos resultados confirman lo observado en el ensayo vacunal anterior, es decir, (i) que las vacunas multiantigénicas proporcionan una mayor eficacia protectora que los antígenos individuales que las componen y (ii) que ampliar la combinación de antígenos diana incluyendo antígenos expresados en otros órganos de la interfase garrapata-hospedador proporciona una protección más completa al anular la función de varias proteínas diana en órganos y procesos biológicos distintos.

Dado que *O. moubata* es el principal vector en África de PPA y TBRF, el desarrollo de vacunas para su control también es muy necesario (Obolo et al., 2018) y una vacuna que se dirija a estas dos especies de *Ornithodoros* sería muy conveniente. Por esta razón, probamos el efecto protector de los candidatos de *O. erraticus* frente a la especie africana. El reconocimiento de antígenos salivales e intestinales de *O. moubata* por los sueros inmunes generados frente a *O. erraticus* indicaba la compartición de epítomos conservados entre las proteínas de ambas especies y anticipaba la posibilidad de cierto grado de protección cruzada frente a *O. moubata*. Por el contrario, la falta de secuencias de *O. moubata* entre los ortólogos recuperados por BLASTp usando los candidatos de *O. erraticus* para interrogar a las bases de datos minoraba la probabilidad de protección cruzada.

De hecho, la protección cruzada proporcionada por los candidatos individuales fue baja o insignificante (Tabla 3.10), pero aumentó significativamente cuando los ejemplares de *O. moubata* se alimentaron en los conejos vacunados con las vacunas multiantigénicas, especialmente cuando la formulación incluyó también a los antígenos intestinales (Tablas 3.11 y 3.12). Estos resultados fomentan más estudios sobre protección cruzada entre especies y brindan apoyo adicional a la utilidad y conveniencia de desarrollar vacunas multiantigénicas para el control de garrapatas.

Las vacunas multiantigénicas pueden usarse para mejorar la eficacia protectora contra una especie particular de garrapata, aumentar el rango de protección del hospedador frente a varias especies de garrapatas o interferir con la infección y transmisión de patógenos (Ndawula y Tabor, 2020). El desarrollo de vacunas multiantigénicas eficientes requiere abordar y refinar cuidadosamente varias cuestiones, que incluyen, de entrada, la selección y combinación racional de los antígenos diana.

Como demuestran los resultados de este estudio, combinar antígenos protectores salivales e intestinales parece una forma muy prometedora de aumentar la eficacia de estas vacunas al dirigirse frente a un rango más amplio de órganos y procesos fisiológicos de las garrapatas. Incluir antígenos de varias especies de garrapatas y antígenos de los patógenos que transmiten parece el siguiente paso lógico para aumentar el rango de protección y prevenir la transmisión de enfermedades.

También es importante para el desarrollo de vacunas multiantigénicas perfeccionar el sistema de expresión y administración de los antígenos diana. Trabajos recientes han demostrado que las vacunas mRNA vehiculadas en nanopartículas lipídicas (mRNA-LNP) proporcionan respuestas inmunitarias más intensas y protectoras frente a las garrapatas que las vacunas basadas en DNA y proteínas recombinantes, abriendo así nuevas vías para el desarrollo de vacunas multiantigénicas anti-garrapata más eficaces (Matias et al., 2021; Sajid et al., 2021).

Los resultados de este objetivo 4 han sido publicados junto con los del objetivo 3 en el siguiente artículo (ver ANEXO):

Carnero-Morán, Á., Oleaga, A., Cano-Argüelles, A.L., Pérez-Sánchez, R. (2023). Function-guided selection of salivary antigens from *Ornithodoros erraticus* argasid ticks and assessment of their protective efficacy in rabbits. Ticks and Tick-borne Diseases 14(6),102218. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102218>

Conclusiones

Primera

Se ha ensamblado *de novo* el primer transcriptoma de las glándulas salivales de *Ornithodoros erraticus*. Este transcriptoma, que incluye casi veinte mil transcritos anotados, presenta una complejidad y redundancia funcional similares a las observadas en los sialotranscriptomas de otras especies de argásidos e ixódidos.

Segunda

En las glándulas salivales, la sobreexpresión diferencial máxima de genes ocurre durante los primeros 7 días tras la ingestión de sangre. Este fenómeno revela cuales son las principales familias proteicas empleadas por la garrapata para alimentarse y modular las respuestas defensivas del hospedador, identificándolas como posibles dianas antigénicas para el desarrollo de vacunas contra *O. erraticus*.

Tercera

El empleo del sialotranscriptoma como base de datos de referencia para obtener el proteoma salival de *O. erraticus* ha permitido identificar cientos de proteínas, demostrando su gran valor en análisis proteómicos de organismos sin genoma secuenciado, como *O. erraticus*. Este proteoma revela proteínas y funciones inéditas en la interfaz de alimentación *O. erraticus*-hospedador, ofreciendo una comprensión más profunda de la fisiología de la alimentación en esta especie.

Cuarta

La espectrometría de masas SWATH ha permitido cuantificar las proteínas compartidas en la saliva de hembras y machos, revelando diferencias cuantitativas importantes entre ambos sexos en varias categorías funcionales. Estas diferencias probablemente están relacionadas con variaciones en el procesamiento y uso de la sangre ingerida según el sexo.

Quinta

La integración de datos transcriptómicos y proteómicos ha permitido aplicar una estrategia vacunómica para la selección de cuatro antígenos salivales con potencial protector. Este enfoque se basó en criterios como la sobreexpresión diferencial postalimentación, la inmunogenicidad y la funcionalidad. La evaluación experimental de cada candidato confirmó su eficacia protectora media-alta frente a *O. erraticus* y demostró cierto nivel de protección cruzada frente a *O. moubata*, validándolos como antígenos protectores adecuados para el desarrollo de vacunas anti-*Ornithodoros*.

Sexta

La formulación y administración combinada de estos cuatro antígenos proporciona una protección más eficaz frente a *O. erraticus* y *O. moubata* que cada antígeno usado individualmente. Además, la inclusión de antígenos protectores procedentes de otros órganos de la interfaz garrapata-hospedador, como el intestino medio, potencia la protección al inhibir funciones clave en diversos órganos y procesos biológicos. Esto confirma la utilidad de desarrollar vacunas multiantigénicas para el control de garrapatas, incrementando así tanto la eficacia protectora frente a una especie particular como el rango de especies diana.

Bibliografia

- Abbas, M.N., Jmel, M.A., Mekki, I., Dijkgraaf, I., Kotsyfakis, M. (2023). Recent advances in tick antigen discovery and anti-tick vaccine development. *International Journal of Molecular Sciences*. 24, 4969. <https://doi.org/10.3390/ijms24054969>.
- Alarcón-Chaidez F.J. (2014). Salivary glands: structure, physiology, and molecular biology. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol I. Oxford University Press. pp. 163-205.
- Alarcón-Chaidez, F., Ryan, R., Wikel, S., Dardick, K., Lawler, C., Foppa, I.M., Tomas, P., Cushman, A., Hsieh, A., Spielman, A., Bouchard, K.R., Dias, F., Aslanzadeh, J., Krause, P.J. (2006). Confirmation of tick bite by detection of antibody to *Ixodes calreticulin* salivary protein. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 1217-1222.
- Ali A. A. B. (2022). Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) on eggs and eclosing larvae of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken). *Veterinary Parasitology*, 306, 109714. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109714>.
- Ali, A., Khan, S., Ali, I., Karim, S., da Silva Vaz Jr, I., Termignoni, C. (2015a). Probing the functional role of tick metalloproteases. *Physiological Entomology*, 40, 177-188. <https://doi.org/10.1111/phen.12104>
- Ali, A., Parizi, L. F., Guizzo, M. G., Tirloni, L., Seixas, A., da Silva Vaz Jr, I., Termignoni, C. (2015b). Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. *Veterinary Parasitology*, 207, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.007>.
- Aljamali, M. N., Ramakrishnan, V. G., Weng, H., Tucker, J. S., Sauer, J. R., Essenberg, R. C. (2009). Microarray analysis of gene expression changes in feeding female and male lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 71, 236-253. <https://doi.org/10.1002/arch.20318>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37, 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Almeida Martins, L., Kotal, J., Bensaoud, C., Chmelař, J., Kotsyfakis M. (2020). Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1868, 140336. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140336>
- Alonso-Díaz, M. A., Fernández-Salas, A. (2021). Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 657694. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.657694>.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, J. M., Sonenshine, D. E., Valenzuela, J. G. (2008). Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics*, 9, 1-37. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-552>

- Antunes, S., Couto, J., Ferrolho, J., Rodrigues, F., Nobre, J., Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., de la Fuente, J., Domingos, A. (2018). *Rhipicephalus bursa* sialotranscriptomic response to blood feeding and *Babesia ovis* infection: Identification of candidate protective antigens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00116>.
- Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., Kotsyfakis, M. (2020). Tick salivary compounds for targeted immunomodulatory therapy. *Frontiers in Immunology*, 11, 583845. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583845>
- Apanaskevich, D.A., Olivier, J.H. (2014). Life cycles and natural history of ticks. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol I. Oxford University Press. pp. 59-73.
- Arai, I., Ohta, M., Suzuki, A., Tanaka, S., Yoshizawa, Y., Sato, R. (2013). Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*, 13, 125. <https://doi.org/10.1673/031.013.12501>
- Araujo, R. N., Silva, N. C., Mendes-Sousa, A., Paim, R., Costa, G. et al. (2019). RNA-seq analysis of the salivary glands and midgut of the Argasid tick *Ornithodoros rostratus*. *Scientific Reports*, 9, 6764. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42899-z>
- Arias, M., Jurado, C., Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2018). Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 235-247. <https://doi.org/10.1111/tbed.12695>.
- Artigas-Jerónimo, S., Pastor Comín, J. J., Villar, M., Contreras, M., Alberdi, P., et al. (2020). A novel combined scientific and artistic approach for the advanced characterization of interactomes: the Akirin/Subolesin model. *Vaccines*, 8, 77. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010077>
- Assumpção, T. C., Mizurini, D. M., Ma, D., Monteiro, R. Q., Ahlstedt, S., et al. (2018). Ixonnexin from tick saliva promotes fibrinolysis by interacting with plasminogen and tissue-type plasminogen activator, and prevents arterial thrombosis. *Scientific reports*, 8, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22780-1>
- Assumpcao, T. C., Ribeiro, J., Francischetti, I. (2012). Disintegrins from hematophagous sources. *Toxins*, 4, 296-322. <https://doi.org/10.3390/toxins4050296>
- Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A. (1995). A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology*, 60, 133-147. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00772-5](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00772-5)
- Bakkes, D. K., De Klerk, D., Latif, A. A., Mans, B. J. (2018). Integrative taxonomy of Afrotropical *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) (Acari: Ixodida: Argasidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9, 1006-1037. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.024>
- Baños, J. V., Boklund, A., Gogin, A., Gortázar, C., Guberti, V., et al. (2022). Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union: (September 2020 to August 2021). *EFSA journal*, 20, e07290. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7290>.

- Baranda, J. A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A. (1997). Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *Journal of Parasitology*, 83, 831-838. <https://doi.org/10.2307/3284276>
- Baranda, J. A., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Manzano, R., Encinas-Grandes, A. (2000). Purification, N-terminal sequencing and diagnostic value of the major antigens of *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. *Veterinary Parasitology*, 87, 193-206. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00169-7)
- Barker, S.C., Murrell, A., (2008). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names, In: Bowman, A.S. y Nuttall, P. (Ed.) *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, pp. 1-39.
- Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., et al. (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PloS one*, 3, e3987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003987>
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*, 17, 349-356. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh037>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57, 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bensaoud, C., Aounallah, H., Sciani, J. M., Faria, F., Chudzinski-Tavassi, A. M., Bouattour, A., M'ghirbi, Y. (2019). Proteomic informed by transcriptomic for salivary glands components of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *BMC Genomics*, 20, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6042-1>
- Bensaoud, C., Martins, L. A., Aounallah, H., Hackenberg, M., Kotsyfakis, M. (2021). Emerging roles of non-coding RNAs in vector-borne infections. *Journal of Cell Science*, 134, jcs246744. <https://doi.org/10.1242/jcs.246744>
- Bensaoud, C., Nishiyama, M. Y., Ben Hamda, C., Lichtenstein, F., Castro de Oliveira, U., et al. (2018). *De novo* assembly and annotation of *Hyalomma dromedarii* tick (Acari: Ixodidae) sialotranscriptome with regard to gender differences in gene expression. *Parasites & Vectors*, 11, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2874-9>
- Ben-Yakir, D. (1989). Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology*, 26, 243-246. <https://doi.org/10.1093/jmedent/26.4.243>
- Bior, A. D., Essenberg, R. C., Sauer, J. R. (2002). Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 645-655. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00143-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00143-6)
- Bishop, L. J., Stutzer, C., Maritz-Olivier, C. (2023). More than three decades of Bm86: What we know and where to go. *Pathogens*, 12, 1071. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091071>
- Boinas, F., Ribeiro, R., Madeira, S., Palma, M., de Carvalho, I. L., Nuncio, S., Wilson, A. J. (2014). The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (Acari: Ixodida) on

- the Iberian Peninsula. *Journal of Vector Ecology*, 39, 238-248. <https://doi.org/10.1111/jvec.12098>
- Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Tanaka, T., Xuan, X., Fujisaki, K. (2010). Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1587-1598. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.019>
- Bourret, T. J., Boyle, W. K., Zalud, A. K., Valenzuela, J. G., Oliveira, F., Lopez, J. E. (2019). The relapsing fever spirochete *Borrelia turicatae* persists in the highly oxidative environment of its soft-bodied tick vector. *Cellular Microbiology*, 21, e12987. <https://doi.org/10.1111/cmi.12987>
- Bowman, A. S., Ball, A., Sauer, J. R. (2008). Tick salivary glands: The physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. In: Bowman A.S., Nuttall P., editors. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 73–91.
- Brake, D. K., Pérez de León, A. A. (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-38>
- Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Sojka, D., & Kopacek, P. (2009). IrAM—An α 2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: Characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33, 489-498. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.09.011>
- Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J. (2014). Are ticks venomous animals?. *Frontiers in Zoology*, 11, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-47>
- Cafarchia, C., Pellegrino, R., Romano, V., Friuli, M., Demitri, C., et al. (2022). Delivery and effectiveness of entomopathogenic fungi for mosquito and tick control: Current knowledge and research challenges. *Acta tropica*, 234, 106627. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106627>
- Canals, A., Oleaga, A., Pérez, R., Domínguez, J., Encinas, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (1990). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Veterinary Parasitology*, 37, 145-153. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90069-N](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90069-N)
- Charrier, N. P., Couton, M., Voordouw, M. J., Rais, O., Durand-Hermouet, A., et al. (2018). Whole body transcriptomes and new insights into the biology of the tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, 11, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2932-3>
- Chaudhary, N., Weissman, D., Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20, 817–838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chen, Z., Yang, X., Bu, F., Yang, X., Yang, X., Liu, J. (2010). Ticks (acari: ixodoidea: argasidae, ixodidae) of China. *Experimental & Applied Acarology*, 51, 393–404. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9335-2>.

- Cheng, P. H., Mans, B. J., Neitz, A. W., Gaspar, A. R. (2010). Savicalin, a lipocalin from hemocytes of the soft tick, *Ornithodoros savignyi*. Experimental and Applied Acarology, 52, 313-326. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9368-6>
- Chinzei, Y., Minoura, H. (1988). Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. Journal of Medical Entomology, 25, 26-31. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.1.26>
- Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J. H., Francischetti, I. M., Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. Journal of Proteomics, 75, 3842-3854. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.026>
- Chmelař, J., Kotál, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I. M., Pedra, J. H., Kotsyfakis, M. (2016). Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick-host interactions. Trends in parasitology, 32, 242-254. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.002>
- Chmelař, J., Kotál, J., Kovaříková, A., Kotsyfakis, M. (2019). The use of tick salivary proteins as novel therapeutics. Frontiers in Physiology, 10, 468009. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00812>
- Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M. (2017). Protease inhibitors in tick saliva: the role of serpins and cystatins in tick-host-pathogen interaction. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7, 216. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00216>
- Cleator, J. H., Zhu, W. Q., Vaughan, D. E., Hamm, H. E. (2006). Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. Blood, 107, 2736-2744. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2698>
- Collins, B. C., Hunter, C. L., Liu, Y., Schilling, B., Rosenberger, G., et al. (2017). Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. Nature Communications, 8, 291. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00249-5>
- Contreras, M., de la Fuente, J. (2016). Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. Vaccine, 34, 3010-3013. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.092>
- Contreras, M., Kasaija, P. D., Kabi, F., Mugerwa, S., De la Fuente, J. (2022). The correlation between subolesin-reactive epitopes and vaccine efficacy. Vaccines, 10, 1327. <https://doi.org/10.3390/vaccines10081327>
- Corral-Rodríguez, M. Á., Macedo-Ribeiro, S., Pereira, P. J. B., Fuentes-Prior, P. (2009). Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39, 579-595. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.07.003>
- Costa, G. C. A., Ribeiro, I. C. T., Melo-Junior, O., Gontijo, N. F., Sant'Anna, M. R., et al. (2021). *Amblyomma sculptum* salivary protease inhibitors as potential anti-tick vaccines. Frontiers in Immunology, 11, 611104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611104>
- Culotta, V. C., Yang, M., O'Halloran, T. V. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1763, 747-758. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.003>

- Cutler, S. J. (2010). Relapsing fever—a forgotten disease revealed. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1115-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04598.x>
- Cutler, S. J., Abdissa, A., Trape, J. F. (2009). New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 400-406. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02819.x>
- Cvirn, G., Gallistl, S., Muntean, W. (2001). Effects of α 2-macroglobulin and antithrombin on thrombin generation and inhibition in cord and adult plasma. *Thrombosis Research*, 101, 183-191. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00389-3)
- Davidson, N. M., Oshlack, A. (2014). Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome Biology*, 15, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0410-6>
- De Castro, M. H., De Klerk, D., Pienaar, R., Rees, D. J. G., Mans, B. J. (2017). Sialotranscriptomics of *Rhipicephalus zambeziensis* reveals intricate expression profiles of secretory proteins and suggests tight temporal transcriptional regulation during blood-feeding. *Parasites & Vectors*, 10, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2312-4>
- De la Fuente, J., Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Review of Vaccines*, 14, 1367-1376. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1076339>
- De la Fuente, J., Contreras, M. (2021). Vaccinomics: A future avenue for vaccine development against emerging pathogens. *Expert Review of Vaccines*, 20, 1561-1569. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1987222>
- De la Fuente, J., Contreras, M. (2022). Additional considerations for anti-tick vaccine research. *Expert Review of Vaccines*, 21, 1019-1021. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2071704>
- De la Fuente, J., Kopáček, P., Lew-Tabor, A., Maritz-Olivier, C. (2016). Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 38, 754-769. <https://doi.org/10.1111/pim.12339>
- De la Fuente, J., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Kocan, K. M., Zivkovic, Z., et al. (2010). Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine*, 28, 1786-1795. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.007>
- De la Fuente, J., Mazuecos, L., Contreras, M. (2023). Innovative approaches for the control of ticks and tick-borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102227>
- De la Fuente, J., Moreno-Cid, J. A., Galindo, R. C., Almazán, C., Kocan, K. M., et al. (2013). Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 172-178. <https://doi.org/10.1111/tbed.12146>
- De La Fuente, J., Villar, M., Estrada-Peña, A., Olivas, J. A. (2018). High throughput discovery and characterization of tick and pathogen vaccine protective antigens using vaccinomics with intelligent Big Data analytic techniques. *Expert Review of Vaccines*, 17, 569-576. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1493928>

- Decrem, Y., Beaufays, J., Blasioli, V., Lahaye, K., Brossard, M., et al. (2008). A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. The FEBS journal, 275, 1485-1499. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06308.x>
- Diatla, G., Soudi, Y., Granjon, L., Arnathau, C., Durand, P., et al. (2012). Epidemiology of tick-borne borreliosis in Morocco. PLoS Neglected Tropical Diseases 6, e1810. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001810>
- Díaz-Martín, V., (2014). Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y vacunas antigarrapata. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2015b). Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: an update. Ticks and Tick-Borne Diseases, 6, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.03.006>
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2015a). New salivary anti-haemostatics containing protective epitopes from *Ornithodoros moubata* ticks: Assessment of their individual and combined vaccine efficacy. Veterinary Parasitology, 212, 336-349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.005>
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R. (2013b). Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. Veterinary Parasitology, 191, 301-314. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.019>
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2011). Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*. Veterinary Parasitology, 178, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.014>
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R. (2013a). An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. Journal of Proteomics, 80, 216-235. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.015>
- Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R., Mattick, J. S. (2008). Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. PLoS Computational Biology, 4, e1000176. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000176>
- Donohue, K. V., Khalil, S. M., Sonenshine, D. E., Roe, R. M. (2009). Heme-binding storage proteins in the Chelicerata. Journal of Insect Physiology, 55, 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.01.002>
- Dore, E., Boilard, E. (2019). Roles of secreted phospholipase A2 group IIA in inflammation and host defense. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1864, 789-802. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.017>

- Doytchinova, I. A., Flower, D. R. (2007a). Identifying candidate subunit vaccines using an alignment-independent method based on principal amino acid properties. *Vaccine*, 25, 856-866. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.032>
- Doytchinova, I. A., Flower, D. R. (2007b). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Dusbábek, F., Kohnova, P., Grubhoffer, L., Lukeš, Š. (1990). Artificial immunization of pigeons against *Argas polonicus* (Ixodoidea, Argasidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 4, 315-320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00446.x>
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2015). African swine fever. *EFSA Journal*, 13, 4163. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4163>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., et al. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47, D427-D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Encinas-Grandes, A., Perez-Sanchez, R., Oleaga-Perez, A. (1999) Ornithodoros e ixodidosis. In: Cordero del Campillo, M., Rojo-Vazquez, F.A. (Ed.) *Parasitologia Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. pp. 518-524.
- Estrada-Peña, A., Mans, B.J. (2014). Tick-induced paralysis and toxicoses. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol II. Oxford University Press. pp. 313-332.
- Estrada-Peña, A., Pfäffle, M., Baneth, G., Kleinerman, G., Petney, T. N. (2017). Ixodoidea of the Western Palaearctic: A review of available literature for identification of species. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8, 512–525. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.013>
- Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A., Hossain, M. N. (2012). Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnology*, 2013, 590587. <https://doi.org/10.5402/2013/590587>
- Fankhauser, N., Mäser, P. (2005). Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*, 21, 1846-1852. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti299>
- Feldman-Muhsam, B., Borut, S., Saliternik-Givant, S., Eden, C. (1973). On the evacuation of sperm from the spermatophore of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Journal of Insect Physiology*, 19, 951-962. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(73\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(73)90021-8)
- Fernandes, E. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 71-93. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9161-y>
- Fernández-Soto, P. (2003). Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Fessler, J. H., Kramerova, I., Kramerov, A., Chen, Y., Fessler, L. I. (2004). Papilin, a novel component of basement membranes, in relation to ADAMTS metalloproteases and ECM

- development. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36, 1079-1084. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.12.010>
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., et al. (2017). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. Nucleic Acids Research, 45, D190-D199. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1107>
- Flower, D. R., Macdonald, I. K., Ramakrishnan, K., Davies, M. N., Doytchinova, I. A. (2010). Computer aided selection of candidate vaccine antigens. Immunome Research, 6, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-S2-S1>
- Fogaça, A. C., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Tanaka, A. S., Bulet, P., Daffre, S. (2006). Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides, 27, 667-674. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.013>
- Francischetti, I. M., Mans, B. J., Meng, Z., Gudderra, N., Veenstra, T. D., Pham, V. M., Ribeiro, J. M. (2008a). An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.009>
- Francischetti, I. M., Meng, Z., Mans, B. J., Gudderra, N., Hall, M., et al. (2008b). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. Journal of Proteomics, 71, 493-512. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.006>
- Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mans, B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., et al. (2005). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35, 1142-1161. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.05.007>
- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M. (2009). The role of saliva in tick feeding. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library, 14, 2051-2088. <https://doi.org/10.2741/3363>
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., et al. (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 10, 483-511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics, 28, 3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Futami, R., Muñoz-Pomer, L., Viu, J. M., Dominguez-Escriba, L., Covelli, L., et al. (2011). GPRO The professional tool for annotation, management and functional analysis of omic databases. Biotechvana Bioinformatics, SOFT3. <https://gpro.biotechvana.com/>
- Garcia, G. R., Gardinassi, L. G., Ribeiro, J. M., Anatriello, E., Ferreira, B. R., et al. (2014). The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. Parasites & Vectors, 7, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-430>

- García-Varas, S. (2004). Vacuna anti-*Ornithodoros moubata*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2010). Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *International Journal for Parasitology*, 40, 313-326. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.08.011>
- Giachetto, P. F., Cunha, R. C., Nhani Jr, A., Garcia, M. V., Ferro, J. A., Andreotti, R. (2020). Gene expression in the salivary gland of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fed on tick-susceptible and tick-resistant hosts. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 477. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00477>
- Giebeler, N., Zigrino, P. (2016). A disintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. *Toxins*, 8, 122. <https://doi.org/10.3390/toxins8040122>
- Ginsberg, H.S. (2014). Tick control. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol II. Oxford University Press. pp. 409-444.
- Gong, H., Qin, S., Wan, X., Zhang, H., Zhou, Y., et al. (2014). Immunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression, and binding specificity. *Parasitology Research*, 113, 4387-4395. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4115-2>
- Gray, J.S., Estrada-Peña, A., Vial, L. (2014). Ecology of nidicolous ticks. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol II. Oxford University Press. pp. 39-60.
- Gudderra, N. P., Sonenshine, D. E., Apperson, C. S., Roe, R. M. (2002). Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology*, 48, 269-278. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00050-1)
- Guerrero, F. D., Miller, R. J., de León, A. A. P. (2012). Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?. *International journal for parasitology*, 42, 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.003>
- Guy, J. E., Wigren, E., Svärd, M., Härd, T., Lindqvist, Y. (2008). New insights into multiple coagulation factor deficiency from the solution structure of human MCFD2. *Journal of Molecular Biology*, 381(4), 941-955. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.042>
- Habib, S. M., Sewify, G. H. (2002). Biological control of the fowl tick *Argas (Persicargas) persicus (Laterreille)* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 12, 11-13. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0280.2001.01015.x>
- Hafez, A., Futami, R., Arastehfar, A., Daneshnia, F., Miguel, A., et al. (2020). SeqEditor: an application for primer design and sequence analysis with or without GTF/GFF files. *Bioinformatics*, 37, 1610-1612. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa903>
- Hallgren, J., Tsigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., et al. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>

- Heekin, A. M., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., Saldivar, L., Scoles, G. A., et al. (2013). Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a *Babesia bovis*-infected bovine host. *Parasitology Research*, 112, 3075-3090. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3482-4>
- Herrero, N., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Zabalgogezcoa, I. (2011). Tick pathogenicity, thermal tolerance and virus infection in *Tolypocladium cylindrosporum*. *Annals of Applied Biology*, 159, 192-201. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00485.x>
- Horigane, M., Shinoda, T., Honda, H., Taylor, E. D. (2010). Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Molecular Biology*, 19, 501-515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01007.x>
- Howe, K. L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., et al. (2020). Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Research*, 48, D689-D695. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz890>
- Ibeas, E., Fuentes, L., Martín, R., Hernández, M., Nieto, M. L. (2009). Secreted phospholipase A2 type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 81, 54-63. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn234>
- Ito, N., Mita, M., Takahashi, Y., Matsushima, A., Watanabe, Y. G., Hirano, S., Odani, S. (2007). Novel cysteine-rich secretory protein in the buccal gland secretion of the parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.065>
- Jia, N., Wang, J., Shi, W., Du, L., Sun, Y., et al. (2020). Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell*, 182, 1328-1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>
- Jori, F., Bastos, A., Boinas, F., Van Heerden, J., Heath, L., et al. (2023). An updated review of *Ornithodoros* ticks as reservoirs of African Swine Fever in Sub-Saharan Africa and Madagascar. *Pathogens*, 12, 469. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030469>.
- Jori, F., Vial, L., Penrith, M. L., Pérez-Sánchez, R., Etter, E., et al. (2013). Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Research*, 173, 212-227. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.005>
- Jurado, C., Martínez-Avilés, M., De La Torre, A., Štukelj, M., de Carvalho Ferreira, H. C., et al. (2018). Relevant measures to prevent the spread of African Swine Fever in the European union domestic pig sector. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 77. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00077>
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28, 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Karim, S., Ribeiro, J. M. (2015). An insight into the sialome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, with a glimpse on its time dependent gene expression. *PloS one*, 10, e0131292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131292>

- Kazimírová, M., Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>
- Keeley, D. P., Hastie, E., Jayadev, R., Kelley, L. C., Chi, Q., et al. (2020). Comprehensive endogenous tagging of basement membrane components reveals dynamic movement within the matrix scaffolding. *Developmental Cell*, 54, 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.022>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10, 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, T. K., Tirloni, L., Pinto, A. F., Diedrich, J. K., Moresco, J. J., et al. (2020). Time-resolved proteomic profile of *Amblyomma americanum* tick saliva during feeding. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0007758. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007758>
- Kitsou, C., Fikrig, E., Pal, U. (2021). Tick host immunity: vector immunomodulation and acquired tick resistance. *Trends in Immunology*, 42, 554-574. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.05.005>
- Kon, E., Elia, U., Peer, D. (2022). Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.016>
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M. L. (2010). Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Journal of Insect Physiology*, 56, 212-226. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.003>
- Kopáček, P., Weise, C., Saravanan, T., Vítová, K., Grubhoffer, L. (2000). Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 465-475. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01020.x>
- Kořený, L., Oborník, M., Lukeš, J. (2013). Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *PLoS Pathogens*, 9, e1003088. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003088>
- Kotani, E., Yamakawa, M., Iwamoto, S. I., Tashiro, M., Mori, H., et al. (1995). Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1260, 245-258. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)00202-E](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)00202-E)
- Kotsyfakis, M., Schwarz, A., Erhart, J., Ribeiro, J. M. (2015). Tissue-and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports*, 5(1), 9103. <https://doi.org/10.1038/srep09103>
- Krasny, L., Bland, P., Kogata, N., Wai, P., Howard, B. A., Natrajan, R. C., Huang, P. H. (2018). SWATH mass spectrometry as a tool for quantitative profiling of the matrisome. *Journal of Proteomics*, 189, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.026>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305, 567-580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>

- Landulfo, G. A., Patané, J. S. L., Silva, D. G. N. D., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Mendonça, R. Z., et al. (2017). Gut transcriptome analysis on females of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) and phylogenetic inference of ticks. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26, 185-204. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017027>
- Lane, R. S., Moss, R. B., Hsu, Y. P., Wei, T., Mesirov, M. L., Kuo, M. M. (1999). Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5), 850-859. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.850>
- Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9, 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Larsen, J. E. P., Lund, O., Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, 2, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>
- Latif, A. A., Putterill, J. F., de Klerk, D. G., Pienaar, R., Mans, B. J. (2012). *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. *PloS one*, 7, e41651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041651>.
- Lenarcic, B., Bevec, T. (1998). Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biological Chemistry*, 379, 105-111.
- Lew-Tabor, A. E., Valle, M. R. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 573-585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>
- Lew-Tabor, A. E., Bruyeres, A. G., Zhang, B., Valle, M. R. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 500-510. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.005>
- Li, Z., Chen, W., Qiu, Z., Li, Y., Fan, J., et al. (2022) African Swine Fever Virus: A Review. *Life (Basel, Switzerland)*, 12, 1255. <https://doi.org/10.3390/life12081255>.
- Linares-Fernández, S., Lacroix, C., Exposito, J. Y., Verrier, B. (2020). Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response. *Trends in Molecular Medicine*, 26, 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.002>
- Ludwig, C., Gillet, L., Rosenberger, G., Amon, S., Collins, B. C., Aebersold, R. (2018). Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*, 14, e8126. <https://doi.org/10.15252/msb.20178126>
- Luka, P.D., Mwiine, F.N., Yakubu, B., Erume, J., Pérez-Sánchez, R., Unger H., Shamaki, D. (2017). African swine fever virus transmission cycle in Nigeria: Assessment of domestic pig-soft tick contact. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 3: 6-12. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.vsr/2017.3.1.6.12>
- Luque, A., Carpizo, D. R., Iruela-Arispe, M. L. (2003). ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23656-23665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212964200>

- Lv, T., Xie, X., Song, N., Zhang, S., Ding, Y., et al. (2022). Expounding the role of tick in Africa swine fever virus transmission and seeking effective prevention measures: A review. *Frontiers in Immunology*, 13, 1093599. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1093599>
- Macours, N., Poels, J., Hens, K., Francis, C., Huybrechts, R. (2004). Structure, evolutionary conservation, and functions of angiotensin-and endothelin-converting enzymes. *International Review of Cytology*, 239, 47-97. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)39002-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)39002-9)
- Mans, B. J. (2020). Quantitative visions of reality at the tick-host interface: biochemistry, genomics, proteomics, and transcriptomics as measures of complete inventories of the tick sialoverse. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 574405. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.574405>
- Mans, B. J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Schwan, T. G., et al. (2008a). Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 42-58. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.003>
- Mans, B. J., de Castro, M. H., Pienaar, R., de Klerk, D., Gaven, P., Genu, S., Latif, A. A. (2016). Ancestral reconstruction of tick lineages. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 509–535. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.002>
- Mans, B. J., Featherston, J., Kvas, M., Pillay, K. A., de Klerk, D. G., et al. (2019). Argasid and ixodid systematics: Implications for soft tick evolution and systematics, with a new argasid species list. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10, 219–240. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.09.010>
- Mans, B. J., Louw, A. I., Neitz, A. W. (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21371-21378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112060200>
- Mans, B. J., Ribeiro, J. M. (2008b). Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 841-852. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.06.007>
- Mans, B. J., Ribeiro, J. M., Andersen, J. F. (2008c). Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 18721-18733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800188200>
- Manzano Román, R., 2002. Vacuna anti-*Ornithodoros erraticus*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., de la Fuente, J., Ricardo Pérez-Sánchez, R. (2012a). Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control, In: Shah, M.M. (Ed.) *Parasitology*. Intech, Rijeka (Croatia), pp. 125-162.
- Manzano-Roman, R., Diaz-Martin, V., Gonzalez-Gonzalez, M., Matarraz, S., Álvarez-Prado, A. F., et al. (2012c). Self-assembled protein arrays from an *Ornithodoros moubata* salivary gland expression library. *Journal of Proteome Research*, 11, 5972-5982. <https://doi.org/10.1021/pr300696h>

- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2015). Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine*, 33, 1046-1055. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.015>
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Pérez-Sánchez, R. (2016). TSGP4 from *Ornithodoros moubata*: molecular cloning, phylogenetic analysis and vaccine efficacy of a new member of the lipocalin clade of cysteinyl leukotriene scavengers. *Veterinary Parasitology*, 227, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.005>
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R. (2012b). Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Veterinary Parasitology*, 185, 248-259. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.032>
- Manzano-Román, R., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R. (2006). Antigens from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* induce lethal anti-tick immune responses in pigs and mice. *Veterinary Parasitology*, 135, 65-79. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.08.004>
- Manzano-Román, R., García-Varas, S., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R. (2007). Purification and characterization of a 45-kDa concealed antigen from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* that induces lethal anti-tick immune responses in pigs. *Veterinary Parasitology*, 145, 314-325. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.011>
- Martins, L. A., Bensaoud, C., Kotál, J., Chmelař, J., Kotsyfakis, M. (2021). Tick salivary gland transcriptomics and proteomics. *Parasite Immunology*, 43, e12807. <https://doi.org/10.1111/pim.12807>
- Maruyama, S. R., Garcia, G. R., Teixeira, F. R., Brandão, L. G., Anderson, J. M., et al. (2017). Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasites & Vectors*, 10, 206. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2136-2>
- Marzouk, A. S., Swelim, H. H., Ali, A. A. B. (2020). Ultrastructural changes induced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the ovary of the tick *Argas (Persicargas) persicus* (Oken). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101507>
- Masoud, H. M., Helmy, M. S., Darwish, D. A., Abdel-Monsef, M. M., Ibrahim, M. A. (2020). Apyrase with anti-platelet aggregation activity from the nymph of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Experimental and Applied Acarology*, 80, 349-361. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00471-9>
- Masoumi Asl, H., Goya, M. M., Vatandoost, H., Zahraei, S. M., Mafi, M., et al. (2009). The epidemiology of tick-borne relapsing fever in Iran during 1997-2006. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7, 160-164. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2009.01.009>
- Matias, J., Kurokawa, C., Sajid, A., Narasimhan, S., Arora, G., et al. (2021). Tick immunity using mRNA, DNA and protein-based Salp14 delivery strategies. *Vaccine*, 39, 7661-7668. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.003>
- Maya-Monteiro, C. M., Alves, L. R., Pinhal, N., Abdalla, D. S., Oliveira, P. L. (2004). HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.005>

- Medina, J. M., Jmel, M. A., Cuveele, B., Gómez-Martín, C., Aparicio-Puerta, E., et al. (2022). Transcriptomic analysis of the tick midgut and salivary gland responses upon repeated blood-feeding on a vertebrate host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 919786. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.919786>
- Ment, D., Gindin, G., Rot, A., Eshel, D., Teper-Bamnolker, P., et al. (2013). Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. *Biocontrol Science and Technology*, 23, 956-967. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.811217>
- Mihaljica, D., Marković, D., Repac, J., Božić, B., Radulović, Ž., et al. (2021). Exploring immunogenicity of tick salivary AV422 protein in persons exposed to ticks: prospects for utilization. *Experimental & Applied Acarology*, 85, 83–99. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00653-z>
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.011>
- Min, X. J., Butler, G., Storms, R., Tsang, A. (2005). OrfPredictor: predicting protein-coding regions in EST-derived sequences. *Nucleic Acids Research*, 33, W677-W680. <https://doi.org/10.1093/nar/gki394>
- Minoura, H., Chinzei, Y., Kitamura, S. (1985). *Ornithodoros moubata*: host immunoglobulin G in tick hemolymph. *Experimental Parasitology*, 60, 355-363. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(85\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(85)90042-6)
- Mur, L., Iscaro, C., Cocco, M., Jurado, C., Rolesu, S., et al. (2017). Serological surveillance and direct field searching reaffirm the absence of *Ornithodoros erraticus* ticks role in African Swine Fever cycle in Sardinia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 1322–1328. <https://doi.org/10.1111/tbed.12485>
- Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y. (2015). A new era of secreted phospholipase A2. *Journal of Lipid Research*, 56, 1248-1261. <https://doi.org/10.1194/jlr.R058123>
- Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., et al. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology*, 11, 641-650. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00375.x>
- Narasimhan, S., Kurokawa, C., DeBlasio, M., Matias, J., Sajid, A., Pal, U., Lynn, G., Fikrig, E. (2021). Acquired tick resistance: The trail is hot. *Parasite Immunology*, 43(5), e12808. <https://doi.org/10.1111/pim.12808>
- Narasimhan, S., Montgomery, R. R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., et al. (2004). Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 1141-1146. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307669100>
- Ndawula Jr, C., Tabor, A. E. (2020). Cocktail anti-tick vaccines: The unforeseen constraints and approaches toward enhanced efficacies. *Vaccines*, 8, 457. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030457>
- Nebreda Mayoral, T., Merino, F. J., Serrano, J. L., Fernández-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez, R. (2004). Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of

- Spain. European Journal of Epidemiology, 19, 79-83. <https://doi.org/10.1023/B:EJEP.0000013252.97826.10>
- Need, J. T., Butler, J. F. (1991). Possible applications of the immune response of laboratory mice to the feeding of argasid ticks. Journal of Medical Entomology, 28, 250-253. <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.2.250>
- Nuttall, P. A. (2019). Wonders of tick saliva. Ticks and Tick-Borne Diseases, 10, 470-481. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.005>
- Nuttall, P. A. (2023). Tick saliva and its role in pathogen transmission. Wiener klinische Wochenschrift, 135, 165-176. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y>
- Nuttall, P. A., Trimnell, A. R., Kazimirova, M., Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunology, 28, 155-163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00806.x>
- Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., da Silva Vaz Jr, I., Tanaka, T., Ali, A. (2022). Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12, 941831. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831>
- Obolo-Mvoulouga, P. (2017). Caracterización del transcriptoma y proteoma intestinal de *Ornithodoros moubata*. Utilidad para la búsqueda de antígenos vacunales. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. (2018). Evaluation of the protective efficacy of *Ornithodoros moubata* midgut membrane antigens selected using omics and in silico prediction algorithms. Ticks and Tick-Borne Diseases, 9, 1158-1172. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.015>
- Olajiga, O., Holguin-Rocha, A. F., Rippee-Brooks, M., Eppler, M., Harris, S. L., Londono-Renteria, B. (2021). Vertebrate responses against arthropod salivary proteins and their therapeutic potential. Vaccines, 9, 347. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040347>
- Oleaga, A., Carnero-Morán, A., Valero, M. L., Pérez-Sánchez, R. (2021b). Proteomics informed by transcriptomics for a qualitative and quantitative analysis of the sialoproteome of adult *Ornithodoros moubata* ticks. Parasites & Vectors, 14, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04892-2>
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R. (2007). A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37, 1149-1159. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.07.003>
- Oleaga, A., González-Pérez, S., Pérez-Sánchez, R. (2022). First molecular and functional characterisation of ferritin 2 proteins from *Ornithodoros* argasid ticks. Veterinary Parasitology, 304, 109684. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109684>
- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. (2015). Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. Parasites & Vectors, 8, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1148-z>

- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. (2017a). Functional annotation and analysis of the *Ornithodoros moubata* midgut genes differentially expressed after blood feeding. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8, 693-708. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.002>
- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. (2017b). A proteomic insight into the midgut proteome of *Ornithodoros moubata* females reveals novel information on blood digestion in argasid ticks. *Parasites & Vectors*, 10, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2300-8>
- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R. (2018). *De novo* assembly and analysis of midgut transcriptome of the argasid tick *Ornithodoros erraticus* and identification of genes differentially expressed after blood feeding. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9, 1537-1554. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.018>
- Oleaga, A., Pérez Sánchez, R., Encinas Grandes, A. (1990). Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Veterinary Record* 126, 32-37.
- Oleaga, A., Soriano, B., Llorens, C., Pérez-Sánchez, R. (2021a). Sialotranscriptomics of the argasid tick *Ornithodoros moubata* along the trophogonic cycle. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2), e0009105. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009105>
- Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Encinas-Grandes, A. (1994). Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Veterinary Parasitology*, 52, 97-111. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90040-X)
- Pardi, N., Hogan, M. J., Weissman, D. (2020). Recent advances in mRNA vaccine technology. *Current Opinion in Immunology*, 65, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.008>
- Parizi, L. F., Githaka, N. W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., & da Silva Vaz Jr, I. (2012). The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Veterinary Journal*, 194, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.023>
- Parizi, L. F., Githaka, N. W., Logullo, C., Zhou, J., Onuma, M., Termignoni, C., da Silva Vaz, I., Jr. (2023). Universal tick vaccines: Candidates and remaining challenges. *Animals*, 13, 2031. <https://doi.org/10.3390/ani13122031>
- Parthasarathi, B. C., Kumar, B., Ghosh, S. (2021). Current status and future prospects of multi-antigen tick vaccine. *Journal of Vector Borne Diseases*, 58, 183-192. DOI: 10.4103/0972-9062.321739
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., et al. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic acids research*, 47, D442-D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>
- Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A. (1994). Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *Veterinary Record*, 135, 207-209. <https://doi.org/10.1136/vr.135.9.207>

- Pérez-Sánchez, R., Manzano-Román, R., Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A. (2019a). Function-guided selection of midgut antigens from *Ornithodoros erraticus* ticks and an evaluation of their protective efficacy in rabbits. *Veterinary Parasitology*, 272, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.016>
- Pérez-Sánchez, R., Manzano-Román, R., Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A. (2019b). *In silico* selection of functionally important proteins from the mialome of *Ornithodoros erraticus* ticks and assessment of their protective efficacy as vaccine targets. *Parasites & Vectors*, 12, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3768-1>
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A. (1992). Analysis of the specificity of the salivary antigens of *Ornithodoros erraticus* for the purpose of serological detection of swine farms harbouring the parasite. *Parasite Immunology* 14, 201-216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1992.tb00461.x>
- Pérez-Sánchez R, Oleaga A, Manzano-Román R, Encinas-Grandes A. (2010). Surveillance of ticks in Europe based on indirect methods: the anti-tick ELISA test. European network for arthropod vector surveillance for human public health (VBornet). VBORNET Newsletter 4, 10-12. http://vbornet.euro-aegis.com/newsletters/VBORNET_NL04.pdf
- Perner, J., Kropáčková, S., Kopáček, P., Ribeiro, J. M. (2018). Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12, e0006410. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006410>
- Perner, J., Provazník, J., Schrenková, J., Urbanová, V., Ribeiro, J. M., Kopáček, P. (2016a). RNA-seq analyses of the midgut from blood-and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports*, 6, 36695. <https://doi.org/10.1038/srep36695>
- Perner, J., Sobotka, R., Sima, R., Konvickova, J., Sojka, D., et al. (2016b). Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *Elife*, 5, e12318. <https://doi.org/10.7554/eLife.12318>
- Petrou, G., Crouzier, T. (2018). Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomaterials science*, 6, 2282-2297. <https://doi.org/10.1039/C8BM00471D>
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*, 9, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>
- Pietschmann, J., Mur, L., Blome, S., Beer, M., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2016). African swine fever virus transmission cycles in Central Europe: Evaluation of wild boar-soft tick contacts through detection of antibodies against *Ornithodoros erraticus* saliva antigen. *BMC Veterinary Research*, 12, 1. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0629-9>
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M. T., Ramsubhag, A. (2008). Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 119-148. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9170-x>
- Popara, M., Villar, M., de la Fuente, J. (2015). Proteomics characterization of tick-host-pathogen interactions. *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*, 513-527. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2004-4_34
- Pourseyed, S. H., Tavassoli, M., Bernousi, I., Mardani, K. (2010). *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different

- developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.014>
- Quembo, C. J., Jori, F., Heath, L., Pérez-Sánchez, R., & Vosloo, W. (2016). Investigation into the epidemiology of African swine fever virus at the wildlife–domestic interface of the Gorongosa National Park, Central Mozambique. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63, 443-451. <https://doi.org/10.1111/tbed.12289>
- Rachinsky, A., Guerrero, F. D., Scoles, G. A. (2008). Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*, 152, 294-313. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.027>
- Rakhit, R., Chakrabartty, A. (2006). Structure, folding, and misfolding of Cu, Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1762, 1025-1037. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.004>.
- Randolph, S.E. (2014). Ecology of non-nidicolous ticks. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol II. Oxford University Press. pp. 3-38.
- Rashid, M., Rashid, M. I., Akbar, H., Ahmad, L., Hassan, M. A., et al. (2019). A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*, 146, 129-141. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001282>
- Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Pérez-Sánchez, R., Blanco, E., Michaud, V., Roger, F. (2011). Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 247-254. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01207.x>
- Rebaudet, S., Parola, P. (2006). Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48, 11-15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00104.x>
- Ribeiro, J. M. C., Labruna, M. B., Mans, B. J., Maruyama, S. R., Francischetti, I. M., et al. (2012). The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.01.003>
- Ribeiro, J. M., Mans, B. J. (2020). TickSialoFam (TSFam): a database that helps to classify tick salivary proteins, a review on tick salivary protein function and evolution, with considerations on the tick sialome switching phenomenon. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 374. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00374>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rouf, N. Z., Biswas, S., Tarannum, N., Oishee, L. M., Muna, M. M. (2022). Demystifying mRNA vaccines: an emerging platform at the forefront of cryptic diseases. *RNA biology*, 19, 386–410. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2055923>

- Roversi, P., Lissina, O., Johnson, S., Ahmat, N., Paesen, G. C., et al. (2007). The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *Journal of Molecular Biology*, 369, 784-793. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.064>
- Saha, S., Raghava, G. P. S. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65, 40-48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>
- Saha, S., Raghava, G.P.S., Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P.J., Timmis, J. (2004). BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physicochemical properties. In: *Proceedings of the Artificial Immune Systems: Third International Conference, ICARIS 2004, Catania, Sicily, Italy*. Berlin. Springer, pp. 197–204.
- Sajid, A., Matias, J., Arora, G., Kurokawa, C., DePonte, K., et al. (2021). mRNA vaccination induces tick resistance and prevents transmission of the Lyme disease agent. *Science Translational Medicine*, 13, eabj9827. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj9827>
- Salát, J., Paesen, G. C., Řezáčová, P., Kotsyfakis, M., Kovářová, Z., et al. (2010). Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochemical Journal*, 429, 103-112. <https://doi.org/10.1042/BJ20100280>
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I. (2008). Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives, In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 447-469.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Laddomada, A., Martínez Avilés, M. (2021). Editorial: African Swine Fever. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 632292. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.632292>.
- Sanders, M. L., Glass, G. E., Nadelman, R. B., Wormser, G. P., Scott, A. L., et al. (1999). Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*, 149, 777–784. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009887>
- Sanders, M. L., Jaworski, D. C., Sanchez, J. L., Defraites, R. F., Glass, G. E., et al. (1998). Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 279-285. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.279>
- Saravanan, T., Weise, C., Sojka, D., Kopáček, P. (2003). Molecular cloning, structure and bait region splice variants of α 2-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 841-851. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00083-3)
- Sayed, M. A., El Kammah, K. M., El-Fiky, Z. A. (2004). A preliminary study on the DNA-vaccine for chicken protection against tick *Argas persicus* (Oken, 1818). *Arab. J. Biotech.*, 7, 273-282.
- Sayed, M. A., Habeeb, S., El Kammah, K. M. (2001). Chicken immunological reaction to salivary gland proteins of *Argas persicus* (Oken) (Acari: Argasidae). *International Journal of Acarology*, 27, 145-149. <https://doi.org/10.1080/01647950108684244>

- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., et al. (2019). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 47, D23-D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27, 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schorderet-Weber, S., Noack, S., Selzer, P. M., Kaminsky, R. (2017). Blocking transmission of vector-borne diseases. *International Journal for Parasitology*, 7, 90-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.01.004>
- Schuijt, T. J., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., DePonte, K., et al. (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*, 10(2), 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.010>
- Schulz, M. H., Zerbino, D. R., Vingron, M., Birney, E. (2012). Oases: robust *de novo* RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics*, 28, 1086-1092. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts094>
- Schwartz, B. S., Ford, D. P., Childs, J. E., Rothman, N., Thomas, R. J. (1991). Anti-tick saliva antibody: A biologic marker of tick exposure that is a risk factor for lime disease seropositivity. *American Journal of Epidemiology*, 134, 86-95. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115996>
- Schwartz, B. S., Nadelman, R. B., Fish, D., Childs, J. E., Forseter, G., Wormser, G. P. (1993). Entomologic and demographic correlates of anti-tick saliva antibody in a prospective study of tick bite subjects in Westchester County, New York. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, 50-57. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.50>
- Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M., Goldstein, M. D. (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *American Journal of Epidemiology*, 132, 58-66. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115643>
- Schwartz, B. S., Sanchez, J. L., Sanders, M. L., DeFraites, R. F. (1996). Tick avoidance behaviors associated with a decreased risk of anti-tick salivary gland protein antibody seropositivity in military personnel exposed to *Amblyomma americanum* in Arkansas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 410-416. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.410>
- Schwarz, A., Tenzer, S., Hackenberg, M., Erhart, J., Gerhold-Ay, A., et al. (2014). A systems level analysis reveals transcriptomic and proteomic complexity in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands during early attachment and feeding. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 2725-2735. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.039289>
- Sewify, G. H., Habib, S. M. (2001). Biological control of the tick fowl *Argas persicargas persicus* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Pest Science*, 74, 121-123. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0280.2001.01015.x>
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., et al. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 14440-14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>

- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., et al. (2007). The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1638-1655. <https://doi.org/10.1074/mcp.T600050-MCP200>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31, 3210-3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., Bonnet, S. I. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 281. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281>
- Sojka, D., Francischetti, I. M., Calvo, E., Kotsyfakis, M. (2011). Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. Cysteine proteases of pathogenic organisms, 177-191. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_11
- Sommer, D. D., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Pop, M. (2007). Minimus: a fast, lightweight genome assembler. *BMC Bioinformatics*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-64>
- Sonenshine, D.E., Anderson, J.M. (2014). Mouthparts and digestive system: anatomy and molecular biology of feeding and digestion. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol I. Oxford University Press. pp. 122-162.
- Stutzer, C., Mans, B. J., Gaspar, A. R., Neitz, A. W., Maritz-Olivier, C. (2009). *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Experimental Parasitology*, 122, 318-327. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.007>
- Sun, Y., He, L., Yu, L., Guo, J., Nie, Z., Liu, Q., Zhao, J. (2019). Cathepsin L—a novel cysteine protease from *Haemaphysalis flava* Neumann, 1897. *Parasitology Research*, 118, 1581-1592. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06271-4>
- Tadokoro, T., M. Modahl, C., Maenaka, K., Aoki-Shioi, N. (2020). Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) from venomous snakes: An overview of the functional diversity in a large and underappreciated superfamily. *Toxins*, 12, 175. <https://doi.org/10.3390/toxins12030175>
- Talagrand-Reboul, E., Boyer, P. H., Bergström, S., Vial, L., Boulanger, N. (2018). Relapsing fevers: neglected tick-borne diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00098>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tan, A. W., Francischetti, I. M., Slovak, M., Kini, R. M., Ribeiro, J. M. (2015). Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. *Journal of Proteomics*, 117, 120-144. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.014>
- Tasoulis, T., Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9, 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Tavassoli, M., Malekifard, F., Soleimanzadeh, A., Pourseyed, S. H., Bernousi, I., Mardani, K. (2012). Susceptibility of different life stages of *Ornithodoros lahorensis* to entomopathogenic

- fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Parasitology Research, 111, 1779–1783. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3023-6>
- Tavassoli, M., Pourseyed, S. H., Ownagh, A., Bernousi, I., Mardani, K. (2011). Biocontrol of pigeon tick *Argas reflexus* (Acari: Argasidae) by entomopathogenic fungus *Metarhizium Anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). Brazilian Journal of Microbiology, 42, 1445–1452. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000030>
- Teixeira, S. C., Borges, B. C., Oliveira, V. Q., Carregosa, L. S., Bastos, L. A., et al. (2020). Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. International Journal of Biological Macromolecules, 164, 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.178>
- Tirloni, L., Kim, T. K., Coutinho, M. L., Ali, A., Seixas, A., et al. (2016). The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 71, 12–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.01.004>
- Tirloni, L., Reck, J., Terra, R. M. S., Martins, J. R., Mulenga, A., et al. (2014). Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females. PLoS One, 9, e94831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094831>
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76, 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Trape, J. F., Diatta, G., Arnathau, C., Bitam, I., Sarih, M. H., et al. (2013). The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). PLoS One, 8, e78473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078473>
- Trentelman, J. J., Sima, R., Krezdorn, N., Tomás-Cortázar, J., Barriales, D., et al. (2020). A combined transcriptomic approach to identify candidates for an anti-tick vaccine blocking *B. afzelii* transmission. Scientific Reports, 10, 20061. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76268-y>
- Trimnell, A. R., Davies, G. M., Lissina, O., Hails, R. S., Nuttall, P. A. (2005). A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. Vaccine, 23, 4329–4341. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.041>
- Trimnell, A. R., Hails, R. S., Nuttall, P. A. (2002). Dual action ectoparasite vaccine targeting ‘exposed’ and ‘concealed’ antigens. Vaccine, 20, 3560–3568. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00334-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00334-1)
- Tsuji, N., Miyoshi, T., Battsetseg, B., Matsuo, T., Xuan, X., Fujisaki, K. (2008). A cysteine protease is critical for *Babesia spp.* transmission in *Haemaphysalis* ticks. PLoS Pathogens, 4, e1000062. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000062>
- Turner, A. J., Isaac, R. E., Coates, D. (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. Bioessays, 23, 261–269. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200103\)23:3<261::AID-BIES1036>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200103)23:3<261::AID-BIES1036>3.0.CO;2-K)

- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47, D506-D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40, e115-e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Valle, M. R., Guerrero, F. D. (2018). Anti-tick vaccines in the omics era. *Frontiers Biosciences* 10, 122-136. <https://doi.org/10.2741/E812>
- van Oosterwijk, J. G., Wikel, S. K. (2021). Resistance to ticks and the path to anti-tick and transmission blocking vaccines. *Vaccines*, 9, 725. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070725>
- Verza, A. E., Miggiano, R., Lombardo, F., Fiorillo, C., Arcà, B., Purghé, B., et al. (2022). Biochemical and structural analysis of a cytosolic sulfotransferase of the malaria vector *Anopheles gambiae* overexpressed in the reproductive tissues. *Current Research in Structural Biology*, 4, 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2022.07.001>
- Vu Hai, V. V., Almeras, L., Socolovschi, C., Raoult, D., Parola, P., Pagès, F. (2014). Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: available tools and promising future methods. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.022>
- Vu Hai, V., Almeras, L., Audebert, S., Pophillat, M., Boulanger, N., Parola, P., Raoult, D., Pages, F. (2013a). Identification of salivary antigenic markers discriminating host exposition between two European ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor reticulatus*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.09.003>
- Vu Hai, V., Pages, F., Boulanger, N., Audebert, S., Parola, P., Almeras, L. (2013b). Immunoproteomic identification of antigenic salivary biomarkers detected by *Ixodes ricinus*-exposed rabbit sera. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4, 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.06.001>
- Wang, H., Nuttall, P. A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 56, 286-295. <https://doi.org/10.1007/s000180050430>
- Wikel, S. (2014). Tick-host interactions. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol II. Oxford University Press. pp. 88-128.
- Willadsen, P. (2008). Anti-tick vaccines. In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Ed.). *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, pp. 424-446.
- Xavier, M. A., Tirloni, L., Torquato, R., Tanaka, A., Pinto, A. F., et al. (2019). Blood anticlotting activity of a *Rhipicephalus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Biochimie*, 163, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.025>
- Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., et al. (2018). WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46, W71-W75. <https://doi.org/10.1093/nar/gky400>

- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14>
- Zabalgogazcoa, I., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R. (2008). Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*, 158, 336-343. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.019>
- Zambelli, V. O., Pícolo, G., Fernandes, C. A., Fontes, M. R., Cury, Y. (2017). Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins*, 9, 406. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>

Anexo. Publicaciones
