UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

GUSTAVO ROCHA GARCIA

Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos

Ribeirão Preto

2013

GUSTAVO ROCHA GARCIA

Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profª. Drª. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Garcia, Gustavo Rocha

Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos. Ribeirão Preto, 2013.

241p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Area de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: de Miranda-Santos, Isabel Kinney Ferreira

1. carrapato *Rhipicephalus microplus*. 2. sialotranscriptoma - 454 sequencing technology. 3.imunoproteoma. 4. proteomas salivares - MudPIT. 5. DIGE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

GARCIA, G.R. **Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Profª. Drª. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP
Assinatura: _____

Profª. Drª. Angela Kaysel Cruz
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP
Assinatura: _____

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP
Assinatura: _____

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo
Instituição: Instituto de Química - UNICAMP
Assinatura: _____

Profª. Drª. Russolina Benedeta Zingali
Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ
Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2009/53645-3 e 2009/51212-2, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos 559603/2009-6 e 471946/2010-9.

Nunca nada grandioso no mundo foi feito sem uma grande dose de paixão

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

Dedicatória

À minha amada esposa Raquel, com muito amor, carinho e alegrias. Seu intenso apoio, dedicação, companheirismo, paciência e compreensão foram fundamentais para elaboração deste trabalho.
"... atrás de um grande homem, há sempre uma grande mulher..." *Autor desconhecido*

À minha mãe Sônia e ao Henrique Sales pelos ensinamentos, determinação, pelo amor, alegrias, carinho e educação que sempre servirão como modelos de dedicação e trabalho.
"O caráter pode se manifestar nos grandes momentos, mas ele é formado nos pequenos, um Pai constrói Homens" *Phillips Brooks*

Aos meus eternos e grandes amigos, Matheus Lança e Glauber Zanoni (*in Memoriam*).

"..Não sei por que você se foi, quantas saudades eu senti, e de tristezas vou viver, e aquele adeus não pude dar, você marcou na minha vida, viveu, morreu na minha história..." *Tim Maia*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sua presença em todos os momentos, também pelo meu pai José Mário, meu irmão Alexandre e aos meus eternos amigos Matheus Lança e Glauber Zanoni (*in Memoriam*), nos quais sempre me apoio e ganho força para seguir.

À toda minha família, em especial minha mãe Sônia, esposa Raquel, meu irmão Rodrigo, minha querida afilhada Heloísa, meu sobrinho Pedro Henrique, minha tia Rosilene e meu tio Adauto, meus primos Gabriel e Raíssa, minha avó Iva, minha tia Sirleide, minha avó Dines, meu tio João, Henrique Sales, minha sogra Zilda e meu Tio Felício (e sua família, em especial meu afilhado José Antônio) que são pessoas a quem eu admiro e devo muito do que eu sou hoje; muito obrigado a todos por tudo que fizeram por mim, pelo incentivo, carinho, paciência e pela compreensão nos momentos de ausência.

À Profª Drª. Isabel Santos por ter me dado à oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa; pela confiança, liberdade, orientação, incentivo, conselhos e ajuda durante todo o meu percurso acadêmico; pelo vasto conhecimento compartilhado, motivação, perseverança e simplesmente pela sua intensa dedicação e amizade.

À Profª. Drª. Beatriz Rossetti Ferreira, pela dedicação, contribuição, incentivo e auxílio indispensável durante meu aprendizado no laboratório e no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. José Marcos Ribeiro do NIH-NIAID- EUA, pela intensa colaboração com nosso grupo de pesquisa, além do vasto conhecimento compartilhado, incentivo, ajuda e disponibilidade de seus programas que foram fundamentais para desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para realização deste trabalho, pelo profissionalismo, disciplina, pela coordenação, empenho e dedicação com o nosso programa de pós-graduação. Agradeço também aos técnicos de seu laboratório, Cristiane e Wander, pela presteza e cuidado com o laboratório.

Ao laboratório do Dr. Sandro Valentini e Dr. Cleslei Zanelli da UNESP-Araraquara, em especial à Drª Danuza Rossi e ao Fábio Galvão pela generosa e importante contribuição para desenvolvimento de técnicas utilizadas nesse trabalho.

Ao Dr. Antônio Maia da USP-Pirassununga, pelo auxílio e ajuda para obtenção de animais utilizados nesse trabalho.

Gustavo Rocha Garcia

À Drª Kristina Nelson, Dr. Gregory Buck e ao Kevin Knitte do laboratório de espectrometria de massa da Virginia Commonwealth University - Richmond - EUA, pela contribuição, ensinamento, auxilio e presteza durante a execução de parte dos experimento utilizados nesse trabalho.

À Dr. Àlvaro Hernandez da University of Illinois at Urbana-Champaign-EUA, pela contribuição e presteza no serviço realizado nesse trabalho.

Aos atuais integrantes (Amanda, Karoline, Alessandra, Gustavo Zampieri, Dorlei, Aline, Lauren e Nádia) e àqueles que passaram pelo grupo de pesquisa do carrapato, que sempre contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho. Em especial a Drª. Sandra Maruyama, Drª. Wanessa Carvalho, Drª. Elen Anatriello, ao Luiz Gustavo Gardinassi, Prof. Dr. Carlo Oliveira e Tamy pela sincera amizade e alegria que compartilhamos, além dos auxílios prestados no desenvolvimento desse trabalho.

À todos os alunos atuais e também àqueles que passaram pelo laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP, que conheci desde minha entrada no laboratório, pela amizade e contribuição direta e indireta para minha formação profissional. Em especial ao Djama Júnior, Manuela, Tiago Medina, Diego Costa, Claudinha, Paulo Guedes, Antônio Abatepaulo, Fabrine, Fabrício e Tiago Mineo pela amizade, brincadeiras e alegrias compartilhadas.

Ao Dr. Felipe Teixeira, pela sincera amizade, companheirismo, incentivo e importante contribuição para desenvolvimento desse trabalho.

À Ana Cristine, pela amizade, ajuda e dedicação ao programa de pós-graduação da Imunologia, pela integração e disposição em ajudar os alunos.

À todos os alunos do Programa de Pós-graduação de Imunologia Básica e Aplicada, pelo bom convívio, por partilhar tantos momentos de estudo e também de amizade.

Aos Profs. Dr. Claúdio Costa Neto, Dr. Marcelo Gomes, Dr. Célio Silva, Drª Arlete Castelo, Drª Maria Cristina Roque Barreira, Dr. Sandro Valentini, pela disponibilidade de equipamentos em seus laboratórios, bem como os sues respectivos técnicos pelos auxílios prestados.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da minha defesa pública, correções, críticas e sugestões, importantes para a melhoria desse trabalho, bem como para meu crescimento profissional.

Às agências de fomento à pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2009/53645-3) e Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico - CNPq (Processos 559603/2009-6 e 471946/2010-9) pelo fundamental apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado (2009/51212-2) e ao assessor científico anônimo da FAPESP pelos comentários, críticas e sugestões durante os pareceres sobre os relatórios científicos da bolsa.

RESUMO

GARCIA, G.R. **Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. 241p.

Infestações com *Rhipicephalus microplus*, o carrapato dos bovinos, causam enormes prejuízos econômicos para a pecuária. Os carrapatos estão desenvolvendo resistência aos carrapaticidas que, além dessa desvantagem, deixam resíduos em carne e leite. Vacinas anticarrapato representam uma alternativa sustentável de controle de infestações, mas as atualmente disponíveis têm efeitos parciais e transitórios. Surge, assim, a necessidade de identificar novos antígenos vacinais. Para alcançar esse objetivo este trabalho explora o fato de que bovinos apresentam fenótipos contrastantes e herdáveis de infestações que são específicos de certas raças. Além disso, o nível de imunidade do hospedeiro afeta a transcrição de genes de glândulas salivares do carrapato, órgão que produz proteínas que medeiam o parasitismo. A hipótese de trabalho é a que os diferentes níveis da imunidade anticarrapato do hospedeiro afetam, também, a composição salivar do parasita. Assim, em carrapatos alimentando-se em hospedeiros resistentes as proteínas que são cruciais ao parasitismo poderão estar ausentes ou deficientes na sua saliva e por isso os carrapatos não terminam sua refeição de sangue. A neutralização dessas mesmas proteínas pela imunidade humoral pode ter o mesmo efeito e por isso, essas proteínas constituem bons antígenos vacinais. Assim, o objetivo do trabalho foi identificar novos antígenos vacinais em saliva de fêmeas e glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas de carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes e suscetíveis, bem como em larvas não alimentadas oriundas de ovos de fêmeas alimentadas nestes mesmos hospedeiros. Para isso, foram empregadas abordagens de sequenciamento de nova geração "RNA-Seq" (454) e abordagens proteômicas, como análise diferencial em gel (DIGE) e Western Blots (imunoproteoma) seguido de sequenciamento de massa, além da tecnologia de identificação de proteínas multidimensionais (ou Multidimensional Protein Identification Technology, MudPIT) para descrever o proteoma das glândulas salivares e da saliva de fêmeas. A análise transcriptômica resultou no sequencimanto de 1.999.086 reads que permitiu identificar e classificar 11.676 sequências codificadoras (CDS), muitas das quais (3.600 CDS) contêm peptídeo sinal que é indicativo de secreção, portanto podendo estar presente na saliva e

apresentar função importante na hematofagia. Por meio de MudPIT, identificamos 321 proteínas salivares diferentes, além de 126 proteínas no DIGE e 266 proteínas nos imunoproteomas. Muitas dessas proteínas podem ser consideradas antígenos potenciais por estarem associadas com a hematofagia/parasitismo, tais como proteases, nucleases, inibidores de proteases, peptídeos antimicrobianos, proteínas de fixação, entre outros, inclusive proteínas ainda não caracterizadas. A maioria dos genes codificantes dessas proteínas está mais expressa em carrapatos alimentados em hospedeiros suscetíveis, principalmente em carrapatos machos. Além disso, muitas dessas proteínas não são reconhecidas por soros bovinos, inclusive soros de bovinos infestados, embora soros de bovinos infestados e resistentes ao carrapato apresente a maioria das reatividades. O conjunto dos resultados sugere que em nível de proteína a composição da saliva também é afetada pelos diferentes níveis de imunidade dos hospedeiros, além de variar com o ciclo de vida do carrapato. Desse modo, concluímos que as estratégias de investigação empregadas foram satisfatórias para identificar um conjunto de antígenos salivares do carrapato *R. microplus* que representam proteínas alvos para compor vacinas multicomponentes anticarrapato.

Palavras-chave: carrapato *Rhipicephalus microplus,* sialotranscriptoma - 454 sequencing technology, imunoproteoma, proteomas salivares do carrapato, MudPIT e DIGE.

ABSTRACT

GARCIA, G.R. **Study of salivary proteome and immunoproteome of cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, for identification and characterization of silent antigens**. Thesis (PhD degree) - Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. 241p**.**

Infestation with *Rhipicephalus microplus*, the cattle tick, causes huge economic losses to livestock. Ticks are developing resistance to acaricides that, besides this disadvantage, leave residues in meat and milk. The anti tick vaccines represent a sustainable alternative of the infestations control, but the currently available has partial and transient effects. Thus arises the need to identify new vaccine antigens. To achieve this goal, this work explores the fact that cattle exhibit contrasting phenotypes and inheritable of infestations that are specific to certain breeds. Furthermore, the level of immunity of the host affects gene transcription tick salivary gland, organ that produces proteins that mediate the parasitism. The working hypothesis is that different levels of anti tick immunity of host affect also the salivary composition of the parasite. So in ticks feeding on resistant hosts the proteins that are crucial to parasitism may be absent or deficient in their saliva, and by this the ticks do not finish your meal blood. The neutralization of these same proteins by humoral immunity can have the same effect and by this, these proteins are good vaccine antigens. So, the aim of the study was to identify new vaccine antigens in saliva from females and salivary glands of nymphs, males and females of ticks fed on resistant and susceptible hosts as well as in unfed larvae originating from eggs of females fed on these same hosts. To this, were employed sequencing approaches of new generation "RNA-Seq" (454) and proteomic approaches, such as differential analysis in gel (DIGE) and Western Blots (immunoproteomics) followed by sequencing mass, besides the Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) to describe the proteome of the salivary glands and saliva of females. The transcriptomics analysis identified 11,676 coding sequences (CDS), many of which (3,600 CDS) contain predicted signal peptide indicative of secretion, therefore may be present in saliva and provide an important function in blood feeding. Through MudPIT, we identify 321 different salivary proteins, besides 126 proteins in DIGE and 266 proteins in immunoproteomics. Many of these proteins may be considered as potential antigens to be associated with the blood meal/ parasitism, such as proteases, nucleases, protease inhibitors, antimicrobial peptides, proteins of attachment, among

others, including proteins not yet characterized. Most of the genes encoding of these proteins are more expressed in ticks fed on susceptible hosts, especially in male ticks. Moreover, many of these proteins are not recognized by bovine sera, including sera from infested hosts, although sera from infested and resistant host to tick present the most reactivities. The overall results suggest that in protein level, the composition of saliva is also affected by the different levels of immunity of the host, besides vary with the tick life cycle. Thus, we conclude that the research strategies employed were satisfactory to identify a set of tick salivary antigens from *R. microplus* that represent target proteins for composing anti tick multicomponent vaccines.

Keywords: *Rhipicephalus microplus* tick, sialotranscriptome - 454 sequencing technology, immunoproteome, tick salivary proteomes, MudPIT and DIGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. 30

Figura 2 - Modelo experimental de infestação. 41

Figura 3 - Fluxograma 53

Figura 4 - Análise filogenética de proteínas ligantes de histamina em *R. microplus* 90

Figura 5 - Análise filogenética de peptídeos antimicrobianos em *R. microplus* 98

Figura 6 - Análise filogenética de proteínas ligantes de imunoglobulinas G em *R. microplus* 102

Figura 7 - Análise DIGE entre as amostras de LNARmR e LNARmS 113

Figura 8 - Análise DIGE entre as amostras de GSNRmR e GSNRmS 114

Figura 9 - Análise DIGE entre as amostras de GSFRmR e GSFRmS 115

Figura 10 - Distribuição funcional (por família) das 126 proteínas identificadas nas análises DIGE 117

Figura 11 - Western Blot 2D de salivaS 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelo experimental usado nos experimentos DIGEs 48

Tabela 2. PMT usado no escaneamento dos géis 50

Tabela 3. Abundância e distribuição das sequências codificadoras (CDS) e reads presentes no sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus* por biblioteca de cDNA. 57

Tabela 4. Classificação e abundância das reads e sequências codificadoras (CDS) do sialotranscriptoma de *R. microplus* por categoria. 58

Tabela 5. Quantidade de proteínas encontradas nos proteomas de *R. microplus* 59

Tabela 6. Distribuição das proteínas por proteoma. 60

Tabela 7. Classificação funcional dos transcritos do sialotranscriptoma de *R. microplus* anotados na categoria constitutiva. 67

Tabela 8. Classificação funcional dos transcritos do sialotranscriptoma de *R. microplus* anotados na categoria secretadas. 77

Tabela 9. Representação dos transcritos de *R. microplus* de acordo com a origem de alimentação sanguínea, se em hospedeiros geneticamente resistentes ou suscetíveis. 91

Tabela 10. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em LNA por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE. 118

Tabela 11. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em GSN por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE. 120

Tabela 12. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em GSF por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE. 122

Tabela 13. Distribuição das proteínas dos DIGEs por classe funcional. 126

Tabela 14. Identificação dos spots protéicos reconhecidos, ou não, nos imunoproteomas de SalivaS, GSFRmS e GSFRmR. 140

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar 1 - Gel preparativo de LNA

Figura suplementar 2 - Gel preparativo de GSN

Figura suplementar 3 - Gel preparativo de GSF

Figura suplementar 4 - Western Blot 2D de GSFRmS

Figura suplementar 5 - Western Blot 2D de GSFRmR

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1 - Anotação dos transcritos de *R. microplus*. Arquivo de Excel hiperlincado contendo informações do sialotranscriptoma de *R. microplus* - sequências de nucleotídeos

Tabela suplementar 2 - Anotação das sequências codificadoras. Arquivo de Excel hiperlincado contendo informações do sialotranscriptoma de *R. microplus* - sequências de aminoácidos anotada manualmente por família de acordo com sua possível função putativa

Tabela suplementar 3 - Identificação e distribuição das 321 proteínas encontradas nos proteomas de *R. microplus*.

Tabela suplementar 4 - Comparação entre as proteínas encontradas nos proteomas de RmS e RmR

Tabela suplementar 5 - Proteínas encontradas no proteoma de LNARmS

Tabela suplementar 6 - Proteínas encontradas no proteoma de GSNRmS

Tabela suplementar 7 - Proteínas encontradas no proteoma de GSMRmS

Tabela suplementar 8 - Proteínas encontradas no proteoma de GSFRmS

Tabela suplementar 9 - Proteínas encontradas no proteoma de SalivaS

Tabela suplementar 10 - Proteínas encontradas no proteoma de LNARmR

Tabela suplementar 11 - Proteínas encontradas no proteoma de GSNRmR

Tabela suplementar 12 - Proteínas encontradas no proteoma de GSMRmR

Tabela suplementar 13 - Proteínas encontradas no proteoma de GSFRmR

Tabela suplementar 14 - Proteínas encontradas no proteoma de SalivaR

Tabela suplementar 15 - Comparação entre os proteomas de LNARmS e GSNRmS

Tabela suplementar 16 - Comparação entre os proteomas de GSNRmS e GSFRmS

Tabela suplementar 17 - Comparação entre os proteomas de GSNRmS e GSMRmS

Tabela suplementar 18 - Comparação entre os proteomas de GSFRmS e GSMRmS

Tabela suplementar 19 - Comparação entre os proteomas de GSFRmS e SalivaS

Tabela suplementar 20 - Proteínas compartilhadas entre os proteomas de GSNRmS, GSFRmS e GSMRmS

Tabela suplementar 21 - Comparação entre os proteomas de LNARmR e GSNRmR.

Tabela suplementar 22 - Comparação entre os proteomas de GSNRmR e GSFRmR

Tabela suplementar 23 - Comparação entre os proteomas de GSNRmR e GSMRmR

Tabela suplementar 24 - Comparação entre os proteomas de GSFRmR e GSMRmR

Tabela suplementar 25 - Comparação entre os proteomas de GSFRmR e SalivaR

Tabela suplementar 26 - Proteínas compartilhadas entre os proteomas de GSNRmR, GSFRmR e GSMRmR

Tabela suplementar 27 - Comparação entre os proteomas de LNARmS e LNARmR do carrapato R. microplus, de acordo com origem de refeição sanguínea

Tabela suplementar 28 - Comparação entre os proteomas de GSNRmS e GSNRmR do carrapato R. microplus, de acordo com origem de refeição sanguínea

Tabela suplementar 29 - Comparação entre os proteomas de GSFRmS e GSFRmR do carrapato R. microplus, de acordo com origem de refeição sanguínea

Tabela suplementar 30 - Comparação entre os proteomas de GSMRmS e GSMRmR

do carrapato R. microplus, de acordo com origem de refeição sanguínea

Tabela suplementar 31 - Comparação entre os proteomas de SalivaS e SalivaR do carrapato R. microplus, de acordo com origem de refeição sanguínea

Tabela suplementar 32 - Identificação e distribuição das 106 proteínas dos hospedeiros bovinos encontradas nos proteomas de R. microplus

Tabela suplementar 33 - Representação dos transcritos do R. microplus, de acordo com estágio de desenvolvimento e origem de alimentação sanguínea

Tabela suplementar 34 - Representação dos transcritos das bibliotecas de RmR, de acordo com estágio de desenvolvimento do carrapato

Tabela suplementar 35 - Representação dos transcritos das bibliotecas de RmS, de acordo com estágio de desenvolvimento do carrapato

LISTA DE ABREVIATURAS

BEA: *Boophilus microplus* ESTs database

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Programa para pesquisar em bases de dados de nucleotídeos utilizando uma sequência de nucleotídeos própria

BLASTx: Programa para pesquisa de proteínas utilizando uma sequência de nucleotídeo traduzido

B.O.D.: Biochemical oxygen demand

BSA: Bovine Serum Albumin

C: Constitutivo

CDS: Coding sequences

cDNA: Sequencia complementar do ácido desoxirribonucleico (DNA)

cs: Cytoskeletal

Contig: Agrupamento de EST ou reads

CRISP: Cysteine rich secretory protein

D: Desconhecido

detox: Detoxification

detox/ox: Oxidative detoxification

DIGE: Differential Gel Electrophoresis

DMF: Dimetilformamida

DTT: Dithiothreitol

ECL: Enhanced Chemiluminescence

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

EST: Expressed Sequence Tag

ET: Elemento Transponível

extrat: Extracellular matrix and adhesion

FMRP-USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

FRmR: Fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Resistentes

FRmS: Fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Suscetíveis

g.: Giro

GO: Gene Ontology

GSs: Glândulas Salivares

GSFRmR: Glândulas Salivares de Fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros

	Resistentes
GSFRmS:	Glândulas Salivares de Fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Suscetíveis
GSMRmR:	Glândulas Salivares de Machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Resistentes
GSMRmS:	Glândulas Salivares de Machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Suscetíveis
GSNRmR:	Glândulas Salivares de Ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Resistentes
GSNRmS:	Glândulas Salivares de Ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Suscetíveis
h.:	Horas
HPB:	Bovino Holandês Preto e Branco
HRP:	Horseradish peroxidase
IEF:	Isoelectric focusing
imm:	Immunity
KOG:	Eukaryotic Orthologus Groups
LC-MS:	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
LNA:	Larvas Não Alimentadas
LNARmR:	Larvas Não Alimentadas de *R. microplus* provindas de fêmeas alimentadas em hospedeiros Resistentes
LNARmS:	Larvas Não Alimentadas de *R. microplus* provindas de fêmeas alimentadas em hospedeiros Suscetíveis
met.:	Metionina
met/aa:	Aminoacids metabolism
met/carb:	Carbohydrate metabolism
met/energy:	Energy metabolism
met/int:	Intermediary metabolism
met/lipd:	Lipid metabolism
met/nuc:	Nucleotide metabolism
min.:	Minutos
MRmR:	Machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Resistentes
MRmS:	Machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Suscetíveis

MS: Mass Spectrometry

MudPIT: Multidimensional Protein Identification Technology

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ne: Nuclear export

NET: Neutrophil extracellular trap

NIAID / NIH: National Institute of Allergy and Ifectious Diseases- National Institutes of Health

NR: Non Redudant protein databse

nr: Nuclear regulation

NRmR: Ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Resistentes

NRmS: Ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros Suscetíveis

PAMs: Peptideos antimicrobiais

PBS: Tampão fosfato

pe: Protein export machinery

Pfam: Protein family database

pI: Ponto isoelétrico

PLIgG: Proteína Ligante de Imunoglobulina G

pm: Protein modification machinery

PMT: Photomultiplier Tube

prot: Proteasome machinery

ps: Protein synthesis

Read: Sequencia de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento de cDNA pela tecnologia 454 - Roche

RmR: Carrapato *R. microplus* alimentado em hospedeiro Resistente

RmS: Carrapato *R. microplus* alimentado em hospedeiro Suscetível

RNA: Ribonucleic acid

RNAm: RNA mensageiro

RNA seq. Tecnologias de alta capacidade de sequenciamento para sequencia de cDNA

Rpsblast: Reversed Position Specific Blast- Pesquisa por blast de uma sequência de proteína contra uma base de dados de perfis

S: Secretado

s: Secreted

SalivaR: Saliva de Fêmeas de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Resistentes

SalivaS:	Saliva de Fêmeas de *R. microplus* alimentados em hospedeiros Suscetíveis
SCX	Strong Cation exchange
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
SMART:	Simple Modular Architecture Research Tool database
s/protease:	Peptidases
s/protinh:	Protease inhibitor
SRI:	Soro de bovinos resistentes infestados
SRN:	Soro de bovinos resistentes não infestados
SSI:	Soro de bovinos suscetíveis infestados
SSN:	Soro de bovinos suscetíveis não infestados
st:	Signal transduction
st/apoptosis:	Apoptosis
T.A.	Temperatura Ambiente
TBS-T:	Tampão salina com Tris e Tween 20
TCP-1:	Tailless Complex Polypeptide 1
te:	Transposable element
tf:	Transcription factor
TIL:	Trypsin inhibitor-like
tm:	Transcription machinery
tr:	Transportrs and storage
uc:	Unknown conserved
uk:	Unknown
v:	Viral
vir:	Viral product

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 28

1.1. Biologia do carrapato *Rhipicephalus microplus*: características, prejuízos e ciclo de vida..... 28

1.2. Interface parasita/hospedeiro..... 30

1.3. Controle do *R. microplus*: agentes químicos e vacinas..... 32

1.4. Identificação de novos antígenos candidatos a vacinas anticarrapato..... 34

2. OBJETIVOS..... 39

2.1. Objetivo Geral..... 39

2.2. Objetivos específicos..... 39

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 41

3.1. Carrapatos *Rhipicephalus microplus*..... 41

3.1.1. Larvas..... 41

3.1.2. Ninfas..... 42

3.1.3. Adultos - machos e fêmeas..... 42

3.2. Obtenção de RNA e extratos protéicos de *R. microplus*..... 43

3.2.1. Extração e quantificação dos extratos protéicos..... 43

3.2.1.1. Larvas não alimentadas..... 43

3.2.1.2. Glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas..... 43

3.2.1.3. Saliva..... 44

3.2.2. Extração e quantificação do RNA total..... 44

3.3. Sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus*..... 45

3.3.1. Preparação das bibliotecas e sequenciamento..... 45

3.3.2. Bioinformática e análises estatística..... 45

3.4. Proteomas do carrapato *R. microplus* - MudPIT..... 46

3.5. DIGE..... 48

3.5.1. Preparação dos extratos protéicos..... 48

3.5.2. Hidratação das tiras e focalização isoelétrica..... 49

3.5.3. Corrida gel 2D..... 50

3.5.4. Aquisição de imagem dos géis, análise estatística e coleta dos spots..... 50

3.5.5. Sequenciamento dos spots selecionados..... 51

3.6. Imunoproteoma..... 52

3.6.1. Anticorpos primários e secundários..... 52
3.6.2. Preparação dos extratos protéicos, hidratação das tiras, focalização isoelétrica e corrida gel 2D..... 52
3.6.3. Western Blot e coleta dos spots..... 53
3.6.4. Sequenciamento dos spots selecionados..... 54
3.7. Fluxograma..... 54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 56
4.1. Transcriptoma do *R. microplus*..... 56
4.1.1. Análise por bioinformática..... 56
4.1.2. Características gerais do sialotranscriptoma de *R. microplus* assemblado..... 57
4.2. Proteomas do *R. microplus*..... 60
4.2.1. Características gerais dos proteomas do *R. microplus*..... 60
4.3. Descrição dos transcritos e proteínas identificadas por família..... 65
4.3.1. Categoria de proteínas constitutivas: genes expressos da categoria constitutivo 65
4.3.2. Categoria de proteínas putativamente secretadas: genes expressos da categoria secretada..... 71
4.3.3. Categoria ET: Elemento transponíveis..... 110
4.3.4. Categoria V: possíveis proteínas virais..... 110
4.4. DIGE..... 113
4.4.1. Análise 2-D DIGE de proteínas salivares do *R. microplus*..... 113
4.4.2. Identificação das proteínas de LNA, GSN e GSF do *R. microplus*..... 121
4.5. Imunoproteoma..... 136
4.5.1. Western Blot de SalivaS, GSFRmS e GSFRmR..... 136
4.5.2. Resultados dos sequenciamentos dos spots previamente selecionados..... 142
5. CONCLUSÃO..... 157
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 160
7. MANUSCRITO..... 175
8. PATENTE..... 240
9. MATERIAIS SUPLEMENTARES..... 242

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Biologia do carrapato *Rhipicephalus microplus*: características, prejuízos e ciclo de vida

Rhipicephalus microplus, anteriormente conhecido como *Boophilus microplus* ou carrapato dos bovinos, é um ectoparasita hematófago que necessita obrigatoriamente passar sua vida sobre esses hospedeiros ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue. Pertence ao filo *Arhropoda*, classe *Arachnida*, família *Ixodidae*, e por pertencer a esta família é considerado carrapato de corpo duro. Geralmente está presente em regiões tropicais e subtropicais onde o calor e a umidade propiciam condições favoráveis à sobrevivência e manutenção de sua espécie (1).

Esse artrópode hematófago é muito importante para o setor pecuário, pois causa enormes prejuízos ao produtor. Os prejuízos causados podem ser divididos em biológicos, afetando o hospedeiro e a produção animal em decorrência da transmissão de doenças e ações espoliativas diretas aos hospedeiros, ou podem ser econômicos, aqueles mais claramente percebidos pelos produtores, que são causados pelas perdas produtivas e pelos gastos mensais com insumos e mão-de-obra necessários para o controle desse ectoparasita.

Ainda hoje, os carrapatos apresentam alta incidência e prevalência no Brasil e, mesmo em países desenvolvidos como a Austrália, devido às complexidades associadas no seu combate e pelo desconhecimento dos produtores sobre informações específicas necessárias à adoção de práticas efetivas de controle (2, 3).

Devido à essas complexidades, o Grupo Consultivo para a Pesquisa Agrícola Internacional (do inglês, *Consultative Group for International Agricultural Research*) considera o carrapato uma das três principais causas de prejuízos à produção animal. Em razão desses, a economia do Brasil sofre expressivamente por possuir o maior rebanho bovino comercial do mundo. Estima-se que o prejuízo nacional seja de US$ 2 bilhões/ano e em nível global ultrapassam os US$ 13 bilhões/ano.

Em relação ao ciclo de vida do *R. microplus*, este divide-se em fase de vida livre (ambiente) e fase de vida parasitária (hospedeiro) (Figura 1). A fase de vida livre tem início com o período de pré-postura, após a queda da teleógina ingurgitada que após dois a três dias inicia a fase de postura dos ovos. Essa fase dura, em média, 17 dias e é seguida da fase de eclosão para a qual são necessários de cinco a dez dias, podendo, no entanto, durar até mais de 100 dias. Após a eclosão das neolarvas é necessário um período de quatro a 20

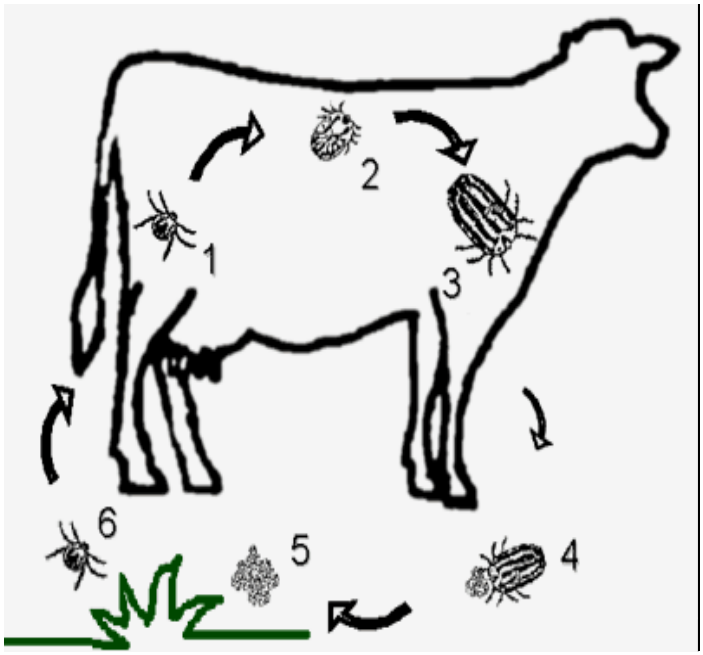
dias para que se tornem larvas infestantes. Além disso, as larvas podem ficar mais de seis meses sem se alimentar. Em geral, a fase de vida livre varia de acordo com as condições climáticas, sendo diretamente afetadas pela temperatura e umidade. O tempo de vida livre do carrapato dos bovinos fica em torno de 28 a 51 dias, podendo se estender a mais de 300 dias quando as condições ambientais não são favoráveis. Em condições ótimas de temperatura e umidade o processo entre a queda até a eclosão de neolarvas tem duração de aproximandamente um mês (4).

Já a fase de vida parasitária geralmente é constante nas regiões que apresenta disseminação do *R. microplus* (5). Essa fase inicia-se quando a larva infestante sobe no hospedeiro. Uma vez no hospedeiro, a larva infestante passa, então, a ser larva parasitária e transforma-se em metalarva, sendo necessários para essa transformação cinco dias em média. Além dessa, outras transformações são necessárias para que esse artrópode chegue ao estágio adulto. As transformações mais determinantes acontecem em média de 7 em 7 dias, sendo de larva para ninfa e ninfa para adulto, respectivamente, seguido do ingurgitamento da teleógina.

As larvas alimentam-se preferencialmente de plasma até que ocorra a primeira muda que dá origem a ninfa, que por sua vez sofre muda originando adultos, carrapatos machos ou fêmeas. Quando adultos, estes vão se acasalar e as fêmeas fecundadas continuam o processo de hematofagia. O sangue torna-se o principal constituinte alimentar nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e, principalmente das fêmeas (6, 7).

O acasalamento acontece a partir do 17º dia da infestação (3° dia da fase adulta), sendo que após a cópula ocorre um rápido ingurgitamento, podendo as fêmeas aumentar em até 200 vezes seu peso (8). Após o ingurgitamento e queda da fêmea, esta pode produzir de 2.000 a 3.000 ovos. Os machos permanecem mais tempo sobre o bovino, podendo então se acasalam com outras fêmeas (9).

De maneira geral, todo o processo entre a fixação, alimentação, troca de cutícula, fase adulta e acasalamento, assim como para o ingurgitamento e queda das fêmeas demora em média de 18 a 26 dias, sob condições ideais.



Fase parasitária:

1- larva infectante realizando a fixação no bovino;

2- ninfa;

3- teleógina em estágio final de ingurgitamento.

Fase de vida livre:

4- teleógina logo após desprendimento, em período de postura no solo;

5- ovos, no solo, em período de incubação;

6- larva infectante no solo.

Figura 1. Ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*. Fase parasitária e fase de vida livre. Adaptado de (10).

1.2. Interface parasita/hospedeiro

O entendimento sobre a dinâmica da relação parasita/hospedeiro entre *R. microplus*/bovino é fundamental para estudo de métodos de controle do carrapato. Uma maneira de desvendar os mecanismos de parasitismo do *R. microplus* é investigar minunciosamente a composição de suas glândulas salivares através do transcriptoma e proteoma deste órgão, correlacionando-os com os estágios de desenvolvimento do carrapato e, principalmente, com os diferentes níveis de imunidade dos seus hospedeiros bovinos, se bovinos geneticamente resistentes ou suscetíveis às infestações.

O hospedeiro preferencial do *R. microplus* é o bovino, sendo que as infestações mais intensas acontecem em bovinos taurinos de origem europeia (por ex. *Bos taurus taurus* - Holandês preto e branco) e as menos intensas em bovinos zebuínos de origem indiana ou asiática (por ex. *Bos taurus indicus* - Nelore). Em épocas de grande infestação nas pastagens os ovinos, equinos, caninos, caprinos, veado, e até mesmo o homem e outros mamíferos também podem ser hospedeiros do *R. microplus* (4). Fatores como sexo, idade e outros que afetam a resistência dos bovinos ao carrapato são discutidos na literatura, sendo a raça o fator de maior importância e com grande consenso entre os diferentes autores.

Vários pesquisadores mostram que os zebuínos são os hospedeiros mais resistentes (R), enquanto que os bovinos da raça taurina são os mais suscetíveis (S) ao carrapato (5, 11-15), sendo herdável o fenótipo da infestação. Prova disso é que nos bovinos híbridos quanto maior o grau de sangue zebuíno, maior a resistência ao *R. microplus* (11, 14-16), portanto no contexto de elucidar os mecanismos de resistência aos carrapatos, os bovinos constituem o único modelo no qual é possível examinar, numa mesma espécie, os desfechos distintos de resistência e suscetibilidade das infestações com *R. microplus*. Apesar disso, existem poucos estudos sobre os correlatos imunes desses fenótipos contrastantes, sendo que a maioria dos estudos sobre aquisição de resistência ao carrapato em bovinos avalia o fenômeno em raças taurinas. Embora os animais de raças taurinas desenvolvam imunidade não conseguem controlam as infestações com a mesma eficiência das raças zebuínas. Poucos estudos examinam, de forma ao mesmo tempo comparativa e abrangente, os perfis dos diferentes mecanismos efetores imunes anticarrapatos nas diferentes raças de bovinos.

Existem várias explicações para a diferença observada na resistência ao carrapato dos taurinos e zebuínos, tais como características da pele, odores, comportamento do animal como a autolimpeza, resposta imune, inflamatória, hemostática, dentre outros fatores (5, 17-21). A resistência ao *R. microplus* não está associada apenas ao número de carrapatos encontrado por hospedeiro, mas também na viabilidade das fêmeas. Se a refeição de sangue for deficiente em quantidade e/ou qualidade esse estágio será afetado negativamente quanto ao tamanho e peso das fêmeas e/ou quanto à massa de ovos depositada pelas fêmeas e/ou na taxa de eclosão de ovos e na viabilidade das futuras larvas originadas (22), afetando assim o sucesso reprodutivo da espécie.

Portanto, para o carrapato completar eficientemente sua refeição de sangue, independente do hospedeiro em que está se alimentando, este precisa lidar com as tentativas do hospedeiro de manter sua homeostasia em resposta à agressão porque essa resposta interfere na hematofagia, sendo ela composta de resposta imune, inflamação e coagulação. Para isso, o carrapato usa, então, o complexo farmacológico bioativo presente em sua saliva para facilitar o acesso ao sangue e para escapar das respostas efetoras de seus hospedeiros (23-25). A saliva dos carrapatos contém inúmeras moléculas que medeiam o parasitismo, tais como moléculas vasodilatadoras, imunossupressoras, anti-inflamatórias, ligantes de histamina e imunoglobulinas, ligantes de quimiocinas, inibidoras de trombina e de agregação plaquetária, inibidora do sistema complemento, inativadora da bradicilina e

anafilotoxina, moléculas de fixação (cimento e cola), metaloproteases, dentre outras (23, 25-27). Esses constituintes salivares variam de acordo com a espécie de carrapato, sendo complementar às respostas dos hospedeiros naturais (28). O carrapato secreta grandes quantidades desses constituintes farmacológicos bioativos no hospedeiro enquanto se alimenta nele (29). Embora isso aconteça, muitos desses constituintes salivares não são reconhecidos naturalmente pelos hospedeiros, mesmo após repetidas infestações. Estes antígenos são conhecidos como antígenos silenciosos que, após ensaios de vacinação, esses podem conferir proteção (30). Além disso, a glândula salivar também é fundamental ao parasitismo pois é o órgão osmorregulador do carrapato. Nesse sentido, tanto a saliva quanto a glândula salivar são alvos em potenciais de busca de novas formas de combater esse parasita.

Em contrapartida, certas espécies de hospedeiros contornam eficientemente a evasão desse ectoparasita e montam respostas que anulam as moléculas bioativas presentes na saliva do carrapato, consequentemente interrompe a refeição sanguínea e expulsa o carrapato do local da fixação. A literatura sugere que as respostas eficazes contra o carrapato envolvem anticorpos contra proteínas salivares (glândula salivar e saliva) (31), além de apresentar níveis de expressão alterados de proteínas de fase aguda (haptoglobulina e amilóide sérica A), citocinas e quimiocinas (17, 32, 33), padrão de linfócitos T especificos tipo Th1 e hipersensibilidade tardia cutânea com participação de basófilos (20, 34).

1.3. Controle do *R. microplus*: agentes químicos e vacinas

O controle do carrapato *R. microplus*, atualmente, é realizado através de agentes químicos e/ou vacinas, porém estes estão aquém do necessário.

Em relação aos agentes químicos, estes possuem preços elevados aos produtores e têm levado à contaminação do meio ambiente, à presença de resíduos em carne e leite e o surgimento e multiplicação de parasitas resistentes (35, 36). Além desses fatores, o uso de agentes químicos ficou ainda mais restrito com o estabelecimento de barreiras sanitárias contra resíduos químicos (37).

Em decorrência disso, muitos grupos almejam desenvolver vacinas contra ectoparasitas. Depois que Trager (1939) demonstrou que a resistência a carrapatos poderia ser trasmitida por soro de animais infestados (38), muitos laboratórios tentaram

desenvolver vacinas anticarrapato. Para isso, tornou-se necessário a busca de antígenos vacinais através de várias estratégias, dentre estas, há do antígeno oculto (39). Essa estratégia emprega o uso de antígenos que não foi exposto ao hospedeiro durante uma infestação natural e que por isso não deve ter gerado mecanismo de escape do parasito por pressão seletiva, podendo gerar mecanismos imunológicos mais eficientes.

Atualmente existem duas vacinas anticarrapato comercialmente disponíveis baseadas nesse conceito, TICK-GARD (australiana) (40) e GAVAC (cubana) (41) que, em tese, seriam métodos de controle sustentáveis. Estas empregam o antígeno Bm86, uma glicoproteína intestinal de *R. microplus*. No caso dessas vacinas, os anticorpos dos hospedeiros ligam-se à superfície das células intestinais do carrapato causando a lise, consequentemente interferindo na nutrição desses ectoparasitas, assim reduzindo a infestação e a capacidade reprodutiva das fêmeas. Porém, a eficiênia de ambas as vacinas é bastante contestada por ser muito variável e pouco duradora (42, 43), tornando indispensável o uso combinado de acaricidas com reforço da vacina, dificultando assim o manejo da mesma. Isso ocorre devido à falta de exposição frequente do hospedeiro ao antígeno da vacina, situação que não acontece com antígenos salivares, e com à falta de melhores adjuvantes é difícil de preservar a imunidade nesses hospedeiros.

Além disso, o carrapato é um parasita extremamente complexo e será difícil de ser controlado por uma vacina contendo apenas um antígeno alvo. Com isso, surge a necessidade em desenvolver novas alternativas sustentáveis para o controle do carrapato, tais como novas vacinas e marcadores de resistência (44, 45).

Vacinas multicomponentes vêm sendo desenvolvidas e testadas em doenças como malária e tuberculose (46-49), por apresentar diversos antígenos em sua formulação. Vacina baseada nesse conceito induz múltiplos níveis de imunidade, o que facilita a solução de problemas associados à restrição genética da resposta imune, diversidade genética dos antígenos e mecanismos de escape do parasita, tal como a redundância de moléculas descritas. Portanto, o desenvolvimento de vacina é uma maneira eficiente de controlar à infestação por carrapato.

Sabemos que a resposta imune anticarrapato dos hospedeiros é um processo fisiológico que decorre da agressão exercida pelo parasita. Essa resposta afeta profundamente a expressão gênica (50) e, consequentemente, a produção de proteínas nesses ectoparasitas. Esse fenômeno é atestado pelos inúmeros mecanismos de escape desenvolvido pelo carrapato. Também sabemos que alterações nos padrões de expressão

gênica necessariamente acompanham os diferentes estágios de vida do carrapato, inclusive nas suas glândulas salivares. Induzir imunidade contra um determinado antígeno candidato expresso apenas no começo ou no final do ciclo poderá ter pouca utilidade. Portanto, estudos de proteomas e transcriptomas de constituintes salivares associados aos estágios de desenvolvimento e à origem de refeição sanguínea do carrapato, se em hospedeiro resistente ou suscetível, são necessários para a busca de novos antígenos vacinais que abrangem todo o ciclo de vida do carrapato.

1.4. Identificação de novos antígenos candidatos a vacinas anticarrapato

Atualmente muitos grupos que estudam as infestações ocasionadas pelos carrapatos têm buscado novos antígenos capazes de induzir imunidade protetora em seus hospedeiros, consequentemente controlar as infestações exercidas por estes carrapatos. Com o avanço das abordagens "ômicas" em várias áreas, alguns grupos começaram a utilizar essas metodologias de alto desempenho e processividade aliadas à bioinformática para busca de novos antígenos vacinais em carrapato. Estas abordagens incluem análises genômicas, transcriptomicas e proteômicas que permitem análisar diversos parâmetros, tais como indicativo de secreção, presença de epítopos, tamanho da sequência, possível função molecular, dentre outras informações, permitindo assim a identificação de um maior número de antígenos.

Atualmente, estão disponíveis transcriptomas e/ou proteomas do carrapato *R. sanguineus* (51), *Antricola delacruzi* (52), *Ixodes scapularis* (53, 54), *Ixodes ricinus* (55), *Amblyomma variegatum* (56), *Amblyomma americanum* (57), dentre outros (26), os quais foram resolvidos por tecnologias que possuem limitações e menor resolução, sendo que somente o transcriptoma do carrapato *Amblyomma maculatum* empregou tecnologia de sequenciamento de nova geração (RNAseq), gerando assim uma quantidade maior e mais completa sobre informações do carrapto em questão.

Nesse sentido, alguns grupos empregam estas abordagens para buscar e estudar antígenos ocultos como candidatos vacinais (30, 58-63), enquanto que outros buscam e estudam os antígenos expostos como os constituintes salivares de carrapato que estão associados ao parasitismo/hematofagia (23, 27, 28, 64, 65).

Em relação às vacinas compostas de antígenos ocultos, estas podem apresentar proteção parcial em bovinos, além de não estimularem de maneira eficiente à produção de anticorpos protetores (66), enquanto que os antígenos expostos como, por exemplo, os antigenos salivares podem apresentar uma maior proteção porque podem conferir imunidade de memória por meio da re-estimulação que ocorre durante a exposição ao carrapato eventualmente presente em pastos (67).

No caso do carrapato *R. microplus*, estão disponíveis algumas bases de dados para busca de antígenos, porém estas estão aquém do necessário. Há disponível uma base de dados de cDNAs expressos em *R. microplus*, denominada como base de dados BmiGI, contendo 42.512 ESTs (do inglês, Expressed Sequence Tags) (68). Esta foi construída a partir de um *pool* de RNAm de tecidos de *R. microplus* submetidos a diferentes situações, tais como calor, frio, infecção com hemoparasitas, exposição a odor do hospedeiros e a diferentes níveis de resistência a acaricidas. Além disso, também tem disponível uma base de dados do *R. microplus* que apresenta 1,8 Gigabase de DNA originados a partir de ovos e larvas do carrapato (69), porém estas carecem em informações sobre a biologia do carrapato (estágio de desenvolvimento) e sobre constituintes salivares que possam estar associados ao parasitismo.

Para suprir em parte essas lacunas nas informações sobre a biologia do carrapato e sobre os constituintes salivares, nosso grupo executou um transcriptoma sequenciando com tecnologia Sanger ESTs de bibliotecas de cDNA construídas com estratégia SMART (50). Esse transcriptoma foi obtido a partir de larvas não alimentadas oriundas de fêmeas alimentadas em hospedeiros resistentes ou suscetíveis (LNARmR e LNARmS), bem como glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas também alimentadas nesses hospedeiros (GSNRmR, GSMRmR, GSFRmR, GSNRmR, GSMRmS e GSFRmS) e foram agrupados em 3.342 contigs, derivados de 7.923 ESTs. A abundância de várias sequências codificantes variava de acordo com o nível de imunidade do hospedeiro no qual o estágio do carrapato se alimentava. Essa plataforma e essa estratégia para construir o transcriptoma permitiram identificar vários antígenos salivares candidatos em potenciais a compor uma vacina anticarrapato. Além disso, alguns dos antígenos identificados nessa plataforma foram empregados em uma vacina multicomponente e testados em bovinos suscetíveis (70). Bovinos que foram vacinados com recombinantes de proteínas salivares obtiveram uma alta proteção, afetando a infestação e a viabilidade das fêmeas alimentadas nesses hospedeiros, além de apresentar imunidade de memória com prensença de anticorpos

específicos contra antígenos salivares do carrapato (67), validando assim a nossa estratégia de busca de antígenos vacinais.

Um estudo recente identificou 105 proteínas do intestino de *R. microplus* por meio do sequenciamento de extrato de intestino separado em duas dimensões (71). Esse nível de resolução sugere que análises proteômicas podem representar boas estratégias para identificar antígenos candidatos a comporem vacinas.

Apesar de todas essas informações disponíveis, ainda falta um estudo em *R. microplus* que abrange os constituintes salivares frente a diferentes níveis de imunidade do hospedeiro e estágios de desenvolvimento do carrapato, abrangendo em conjunto e de forma mais completa as análises transcriptomicas e proteômicas. Para isso, o presente trabalho propôs construir e sequenciar novas bibliotecas de glândulas salivares do carrapato, semelhante ao já realizado pelo nosso grupo, porém, com tecnologia de sequenciamento de nova geração (RNAseq). Essa tecnologia permite a identificação de um volume maior de sequências, principalmente de sequências completas. Além dessa estratégia, este trabalho irá empregar análises proteômicas dessas amostras salivares utilizando a tecnologia de identificação de proteínas multidimensional (MudPIT - do inglês, Multidimensional Protein Identification Technology) que também permite identificar e analisar uma ampla gama de proteínas, incluindo proteínas de membrana, proteínas hidrofóbicas fortemente ácidas e básicas, bem como proteínas de baixa abundância presentes nestes extratos protéicos complexos (72, 73). Além das análises proteômicas, também serão realizadas análises diferenciais em géis 2D (DIGE - do inglês, Differential Gel Electrophoresis) para avaliar a expressão diferencial de proteínas do carrapato quando alimentado em diferentes hospedeiros, além de análises de imunoproteoma que empregam o sequenciamento de proteínas salivares reconhecidas, ou não, por soros de bovinos resistentes e suscetíveis infestados, ou não, com *R. microplus.*

Proteínas presentes em quantidades diferentes e/ou reconhecidas de forma diferencial pelos dois tipos de hospedeiros bovinos podem representar bons antígenos vacinais. Uma proteína menos abundante na saliva de carrapatos que se alimentam em hospedeiro resistente e/ou uma proteína reconhecida somente por hospedeiros resistentes pode representar um constituinte essencial do parasitismo. Se faltar na saliva do carrapato ou for neutralizada pela imunidade do hospedeiro a refeição de sangue será mal sucedida.

Portanto, o objetivo deste trabalho é identificar novos antígenos vacinais em saliva de fêmeas e glândulas salivares de ninfas (GSN), machos (GSM) e fêmeas (GSF) de

carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes e suscetíveis, bem como em larvas não alimentadas (LNA) oriundas de ovos de fêmeas alimentadas nestes mesmos hospedeiros. Com isso, podemos aprimorar nosso entendimento de como o carrapato *R. microplus* faz para parasitar os diferentes hospedeiros e como a imunidade desses hospedeiros pode afetar a expressão de genes e proteínas do carrapato. Também podemos identificar quais proteínas são importantes em cada estágio de desenvolvimento do carrapato quando alimentado em hospedeiro resistente e suscetível.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar antígenos protetores para compor uma vacina que controle infestações com o carrapato dos bovinos e descrever em profundidade os mecanismos de parasitismo do carrapato dos bovinos.

2.2. Objetivos Específicos

Coletar glândulas salivares de carrapatos em estágio de ninfa, macho e fêmea e saliva de fêmea alimentadas em bovinos geneticamente resistentes ou suscetíveis ao parasita ao longo de todo o período de hematofagia (coleta diária, até o fim do ciclo).

- Descrever os salivomas de ninfas e adultos de carrapatos alimentados em bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis;
- Identificar os componentes do salivoma que são reconhecidos, ou não, por soros de bovinos naturalmente infestados e assinalar sua função biológica putativa por meio do banco de sequências anotadas;
- Identificar a sequência e a função biológica dos antígenos silenciosos presentes diferencialmente em saliva e glândulas salivares (GSs) de carrapatos alimentados em hospedeiros geneticamente resistentes ou suscetíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

O estudo foi realizado seguindo normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Protocolo nº 102/2009). Todos os protocolos que utilizaram kits comerciais seguiram as recomendações dos fabricantes, quando presentes as modificações foram descritas. Um fluxograma do delineamento experimental deste trabalho é ilustrado na Figura 3 no item 3.7 desta seção.

3.1. Carrapatos *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos utilizados nesse estudo foram obtidos a partir da colônia de *R. microplus* do Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP coletados na região de Ribeirão Preto-SP. A colônia de carrapatos foi mantida através de infestações periódicas em bovinos.

Bovinos das raças Holandesa (HPB, 4 animais) e Nelore (4 animais) foram submetidos a infestações artificiais com aproximadamente 10 mil larvas e 20 mil larvas não alimentadas de *R. microplus*, respectivamente. As infestações foram realizadas utilizando câmeras de panos de algodão coladas aos flancos direito e esquerdo de cada animal (Figura 2). Os bovinos foram acompanhados durante a infestação para obtenção dos diferentes estágios do ciclo de vida do carrapato. Os carrapatos foram mantidos em estufas incubadoras de B.O.D. (Tecnal, Piracicaba, Brasil) sob condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo até sua utilização. Estes animais receberam manejo intensivo durante todos os experimentos de infestações.

3.1.1. Larvas

Larvas não alimentadas (LNA) provindas dos ovos de fêmeas que se alimentaram em hospedeiro geneticamente suscetível (LNARmS) ou resistentes (LNARmR) às infestações, foram obtidas após o período de oviposição das fêmeas. Larvas eclodidas de 1 a 3 semanas foram utilizadas para obtenção de extrato protéico e para extração de RNA total.

Figura 2. Modelo experimental de infestação. Bovino da raça *B. taurus taurus* (Holandês Preto e Branco – HPB) preso no brete, durante infestação com *R. microplus*.

3.1.2. Ninfas

Ninfas alimentadas em bovinos suscetíveis (NRmS) e resistentes (NRmR) foram coletadas em diferentes dias de alimentação (9, 10, 11, 12 e 13 dias após o inicio da infestação) e de diferentes infestações e animais. Logo após cada coleta, estas ninfas foram usadas para extração de glândulas salivares (GS) e posteriormente estas foram empregadas para obtenção de extratos protéicos e para extração de RNA total (GSNRmS e GSNRmR).

3.1.3. Adultos - machos e fêmeas

Carrapatos machos e fêmeas alimentados em bovinos suscetíveis (MRmS e FRmS, respectivamente) e resistentes (MRmR e FRmR, respectivamente) foram coletados em diferentes dias de alimentação (16, 17, 18, 19, 20 dias após o inicio da infestação) e de diferentes infestações e animais. Logo após cada coleta, estes carrapatos adultos foram usados para extração de glândulas salivares (GS) e posteriormente estas foram empregadas para obtenção dos extratos protéicos e para extração de RNA total (GSMRmS e GSMRmR; GSFRmS e GSFRmR).

3.2. Obtenção de RNA e extratos proteicos de *R. microplus*

3.2.1. Extração e quantificação dos extratos proteicos

Todas as amostras foram coletadas utilizando materiais estéreis, autoclavados e muflados.

3.2.1.1. Larvas não alimentadas

Para obtenção dos extratos de LNAs, as larvas (LNARmS e LNARmR) oriundas de aproximadamente 1g de massa de ovos foram acondicionadas em criotubos de 4 ml e congeladas com nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados RNA later (Extração de RNA), água Milliq ou 1,5ml de tampão fosfato (PBS- NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na2HPO4 81 mM, KH2PO4 15 mM) e inibidores de proteases com volume final de 20% (Complete, Mini EDTA-free – Roche). Estas foram trituradas com homogeinizador T10 basic - Ultra-Turrax (IKA® Works, Inc. Wilmington, USA) sonicadas e congeladas com nitrogênio líquido e descongelada em banho Maria 56°C por 7 vezes, em seguida esse material foi centrifugado a 14.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada com kit Coomassie assay (Pierce, Rockford, IL) e posteriormente armazenado a -70° C até o uso.

3.2.1.2. Glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas

Ninfas, machos e fêmeas (NRmS e NRmR; MRmS e MRmR; FRmS e FRmR, respectivamente) foram empregados para dissecação e extração das glândulas salivares sob lupa em RNA later (Extração de RNA), água Milliq ou PBS estéril e inibidores de protease com volume final de 20% (Complete, Mini EDTA-free – Roche). As glândulas salivares obtidas foram empregadas para obtenção dos extratos de GSNRmS, GSRmR, GSMRmS, GSMRmR, GSFRmS e GSFRmR, conforme métodos do item 3.2.1.1. Para obtenção dos proteomas, tampão de solubilização (7M uréia, 2M thioureia, 0,2% SDS, 1% DTT, 2% Triton X-100, inibidor protease e nuclease) compatível com MudPIT foi adicionado a estes extratos.

3.2.1.3. Saliva

Fêmeas ingurgitadas em bovinos HPB e Nelore foram coletadas para obtenção da saliva (SalivaS e SalivaR, respectivamente). Estas foram lavadas em PBS, posteriormente secadas em papel de filtro e fixadas com fita adesiva em placas com a parte ventral do corpo voltado para cima. Em seguida foi administrado com uma seringa de 10 ml, uma solução a 0,2% de dopamina (Revivan®) diluída em PBS em temperatura ambiente (T.A.). A administração de dopamina induz a contração dos ácinos das glândulas salivares, estimulando a salivação. As salivas (SalivaRmS e SalivaRmR) foram coletadas em tubo e mantidas em gelo. A cada 1 ml de saliva foi acrescentado inibidor de protease com volume final de 20% (Complete, Mini EDTA-free – Roche), juntamente com 25ul de EDTA 1M e 50ul de DTT 1M. Posteriormente, a concentração protéica e armazenamento desses extratos foram realizados conforme itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2.

3.2.2. Extração e quantificação do RNA total

Para a obtenção de RNA total, as larvas (obtidas conforme item 3.2.1.1) foram embebidas em 1,5 mL de reagente Trizol (Invitrogen), enquanto que para as GSs (obtidas conforme item 3.2.1.2) foi retirado o RNA later e adicionado 800 µl de reagente Trizol. Todas as amostras foram então trituradas com homogeneizador T10 basic - Ultra-Turrax (IKA® Works, Inc. Wilmington, USA), seguindo a extração do RNA total com o *kit* SV Total RNA Isolation System (Promega) conforme recomendações do fabricante com algumas modificações. Brevemente, essas suspensões de extrato celular e Trizol foram transferidas para um tubo contendo 200µl de clorofórmio para cada 1 ml da suspensão celular, em seguida homogeneizado manualmente e incubado em T.A., por 15 minutos. Posteriormente a mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 10 minutos (T.A.). A solução transparente do lisado (± 500 µl) foi adquirida e transferida para um novo tubo contendo 300 µl de etanol 95% e após homogeneização cuidadosa a solução foi transferida para a coluna de afinidade de RNA. A coluna foi centrifugada a 12.000g, por 1 min. a T.A. e o eluato descartado. A solução posteriormente recebeu tampões específicos do kit, intercalados por centrifugações de 1 min. a 12000 g. Na sequência as amostras foram eluídas da coluna em 50 µl de água livre de nucleases. Uma alíquota do eluato foi usada para quantificação de RNA no Nanodrop® e outra para análise pelo Bioanalyzer®. Em

seguida estes RNAs total foram empregados para síntese de cDNAs e posteriormente para preparação das bibliotecas.

3.3. Sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus*

3.3.1. Preparação das bibliotecas e sequenciamento

Para produção do sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus* foram construídas oito bibliotecas de cDNA não normalizadas (a saber, LNARmS, LNARmR, GSNRmS, GSNRmR, GSMRmS, GSMRmR, GSFRmS e GSFRmR). Para isso, RNA mensageiro (RNAm) foi isolado a partir de 20µg de RNA total (Descrito no item 3.2.2) com o kit Oligotex (Qiagen, Valencia, CA). A fração enriquecida de RNAm foi convertido para uma biblioteca de cDNA com adaptadores primário com código de barras, compatíveis com o sistema 454, como publicado previamente (74). Após a construção da biblioteca, as bibliotecas foram quantificadas utilizando fluorímetro Qubit (Invitrogen, CA), e os tamanhos dos fragmentos médios foram determinados por análise de 1µl das amostras no Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) utilizando um chip de DNA 7500. As bibliotecas foram diluídas até $1x10^6$ moléculas/µ em forma de *pool*. Amplificação clonal baseada em emulsão e sequenciamento foram realizados a partir de placa cheias em sequenciador 454 Genome Sequencer FLX system (454 Life Sciences, Branford, CT). O sequenciamento foi realizado no Centro de Genômica Comparativa e Funcional W. M. Keck, Centro de Biotecnologia Roy J. Carver da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign de acordo com as instruções do fabricante (454 Life Sciences, Branford, CT). Os processamentos dos sinais foram realizadas utilizando o pacote de dados de análise Software-454 versão 2.3.

3.3.2. Bioinformática e análises estatística

Análise por bioinformática deste estudo foi realizado conforme publicado previamente por Karim e colaboradores 2011 (75). Os programas de computador utilizados foram escritos e fornecidos em Visual Basic 6.0 (Microsoft, Redmond, Washington) pelo Dr. José M. Ribeiro do NIAID / NIH – Rockville – USA. As buscas dos contigs contra

vários bancos de dados foram realizadas utilizando blastx, blastn ou rpsblast para obter uma visão sobre as transcrições salivares de *R. microplus*.

Os bancos de dados utilizados foram de proteínas não redundantes (NR) do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) e serão descritos a seguir: Gene Ontology (GO), FASTA (76), o banco de dados Swissprot, Base de dados de sequências salivares de carrapatos previamente publicadas (25), Bancos de dados personalizados do GenBank contendo sequências mitocondriais e de nucleotídeos de RNA ribossomal e o Banco de dados de domínios conservados do NCBI (77) contendo motifs SMART (78), KOG (79) e Pfam (80).

Múltiplos alinhamentos de sequências foram realizados utilizando o algoritmo Clustal W (81). Análises filogenéticas foram determinadas utilizando o método Neighbor - Joining (NJ), executado com o software MEGA 5.05 (82). O nó de suporte de cada subtipo foi avaliado utilizando a análise de bootstrap com 1.000 repetições e as distâncias evolutivas foram determinadas utilizando o método de Jones-Taylor-Thornton (JTT) (83). Estas análises foram realizadas apenas em sequências completas, em outras palavras, em sequências que possuem metionina inicial (Met) e códon de terminação, além de previsto peptídeo sinal que é indicativo de secreção. Sequências completas que apresentaram muitos "frame shifts" (também chamado de erro de enquadramento) foram excluídas das análises.

Testes de chi-quadrado foram realizados em análises de comparações entre transcritos de diferentes bibliotecas do carrapato *R. microplus*. O p value <0.05 foi usado para estabilizar o nível de significância nas análises.

3.4. Proteomas do carrapato *R. microplus* - MudPIT

Extratos de LNARmS, LNARmR, SalivaS, SalivaR, GSNRmS, GSNRmR, GSMRmS, GSMRmR, GSFRmS e GSFRmR, obtidos conforme item 3.2.1, foram sequenciados pela tecnologia MudPIT, totalizando 10 proteomas de *R. microplus*. Para cada amostra, 10 µl de solução foi removida para o processamento e diluída para 100ul com 100 mM de bicarbonato de amônio. Estas amostras foram reduzidas com 5 µl de 10 mM ditiotreitol no bicarbonato de amônio 0,1 M em T.A. por 30 minutos. Em seguida, estas foram alquiladas com 5 µl de 50 mM iodoacetamida em 0,1 M bicarbonato de amônio em T.A. por 30 min. As amostras foram, então, digeridas com 1µg de tripsina por

aproximadamente 14 horas e depois a reação de digestão foi interrompida com 5% (v:v) de ácido acético glacial. Cada amostra foi dessalinizada antes da análise de espectrometria de massa.

O sistema LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) consistiu de um sistema híbrido de espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Thermo Electron com uma fonte iônica "nanospray" conectado a uma coluna capilar de fase reversa C18 Waters NanoAcquity. A coluna C18 interage com uma coluna de troca catiónica forte (SCX- do inglês, *strong cation exchange*). Uma solução final de 2-5 µg foi injetada nestas colunas. Os peptídeos que não estavam presos à coluna SCX foram, então, eluídos por um gradiente de acetonitrila à 0.1 M de ácido fórmico com uma vazão de 0,4 ul/min., durante 60 minutos. Após esse fracionamento de fluxo contínuo, oito frações de troca iônica foram eluídas na coluna C18, utilizando alíquotas de concentrações crescentes de acetato de amônio. Cada fração de troca iônica foi analisada por um gradiente de acetonitrila à 0.1M de ácido fórmico com uma vazão de 0,4 ul/min., durante 60 minutos. A fonte de íons nanospray foi operada à 3,5 kV. A digestão foi analisada colocando o dobro da capacidade de aquisição do aparelho, para determinar o peso molecular do peptídeos e os espectros de íons, que serviram para determinar as sequências de aminoácidos. Este modo de análise produz cerca de 100.000 espectros CAD por fração de troca iônica que variam em abundância ao longo de várias ordens de magnitude. Nem todos os espectros de CAD são derivados de peptídeos.

Os dados do sequenciamento de cada amostra foram analisados por busca em banco de dados usando Sequest search algorithm. Nosso novo sialotranscriptoma de *R. microplus* serviu como banco de dados para essas buscas, uma vez que o *R. microplus* não possui genoma completo sequenciado. Os peptídeos e proteínas identificadas nas amostras foram salvos em arquivo de formato Scaffold.

Para a confiabilidade da identificação dos peptídeos, utilizamos os seguintes critérios de análises no software Scaffold: 1) mínimo de 2 peptídeos únicos para cada proteína identificada, 2) 99% de probabilidade mínima de identificação da proteína e 3) 95% de probabilidade mínima de identificação do peptídeo.

3.5. DIGE

3.5.1. Preparação dos extratos protéicos

As proteínas extraídas de LNARmS, LNARmR, GSNRmS, GSNRmR, GSFRmS e GSFRmR, conforme o item 3.2.1, foram empregadas para análise diferencial em gel. Os extratos protéicos foram todos ajustados para uma concentração de 5mg/ml em pH8,5. Os CyDye 5nmol (Ge Healthcare, USA) foram ressuspendidos para uma concentração final de 1nmol/µl em DMF (dimetilformamida), em seguida pipetamos 2µl da solução 1nmol/ul e acrescetamos 3µl de DMF para obter uma solução de trabalho de 400pmol/µl.

Para as análises diferenciais fizemos as seguintes combinações experimentais em duplicatas (Tabela 1): combinações entre LNARmS e LNARmR; GSNRmS e GSNRmR; GSFRmS e GSFRmR, totalizando 9 tiras, sendo 3 tiras para cada combinação experimental, a saber: 2 tiras contendo amostras marcadas com CyDye e 1 tira para gel preparativo empregado na coleta dos spots diferencialmente expressos.

A tabela 1 mostra detalhadamente as combinações experimentais realizadas empregando as amostras mencionadas anteriormente. Por exemplo, para combinação de LNARmS e LNARmR, 1 tira recebeu extrato protéico de LNARmS marcado com Cy3, além do extrato de LNARmR marcado com Cy5 e do controle interno (CI) da reação com extratos de LNARmS + LNARmR marcados com Cy2. Na outra tira foram invertidas as marcações para evitar favorecimento de marcação para determinada amostra, ou seja, essa tira recebeu extrato protéico de LNARmS marcado com Cy5, além de extrato de LNARmR marcado com Cy3 e como CI da reação com extratos de LNARmS + LNARmR marcados com Cy2.

Portanto, para cada marcação (Cy2, Cy3 ou Cy5) adicionamos 1µl da solução de trabalho em 50 µg de proteína mencionadas anteriormente, em seguida esta solução foi misturada, centrifugada e incubada por 30min em gelo protegido da luz. Para bloquear a reação, 1µl de lisina à 10mM foi adicionado e incubado por 10min. em gelo. Posteriormente, estas amostras marcadas foram empregadas para hidratação das tiras.

Tabela 1. Modelo experimental usado nos experimentos DIGEs

	LNARmS x LNARmR		**GSNRmS x GSNRmR**		**GSFRmS x GSFRmR**	
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Cy2	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*	CI*
Cy3	LNARmS	LNARmR	GSNRmS	GSNRmR	GSFRmS	GSFRmR
Cy5	LNARmR	LNARmS	GSNRmR	GSNRmS	GSFRmR	GSFRmS

***CI**: Controle Interno da reação - Marcação das amostras testadas em cada experimento com Cy2. Para o experimento de LNA- LNARmS + LNARmR; para o de GSN- GSNRmS + GSNRmR e para o de GSF- GSFRmS + GSFRmR.

3.5.2. Hidratação das tiras e focalização isoelétrica

Para corrida da primeira dimensão, tiras IPG lineares de 13 cm de pH 3-10 (GE Healthcare, USA) foram reidratadas por 20 horas em T.A. em 250 µL de solução de reidratação (GE Healthcare, USA) suplementado com 1% IPG buffer pH 3-10L (GE Healthcare, USA) e extrato protéico previamente marcados com os CyDye, usando IPGBox (GE Healthcare, USA).

No caso das tiras empregadas no preparo dos géis preparativos foram adicionadas 150 µg de proteína de cada amostra (por ex. no experimento entre LNARmS x LNARmR, usamos 150 µg de proteína de LNARmS + 150 µg de proteína de LNARmR em uma única tira) em seguida estas foram hidratadas como descrito acima.

Após a reidratação, as tiras foram empregadas para focalização isoelétrica (IEF, do inglês - *isoelectric focusing*) a 20°C usando Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, USA). A IEF foi conduzida em 300V por 12h seguido de 1000V até acumular 800Vh, em seguida 8000V até acumular 11300Vh e 8000V para 4400Vh, totalizando 20100V em um tempo aproximadamente de 16h20min. usando aparatos do Ettan II IPGphor (GE Healthcare, USA). Após a focalização isoelétrica, as tiras foram retiradas e armazenadas em tubo de vidro protegido da luz no -70°C até a corrida da segunda dimensão.

3.5.3. Corrida de gel 2D

O procedimento para obtenção de géis bidimensionais em géis de poliacrilamida (gel 2D) foram realizados de acordo com Yatsuda e colaboradores (84). Resumidamente, as tiras foram equilibradas em solução de equilibrio (50 mM Tris, 6M uréia, 2% SDS, 30% glicerol, pH 8,8) contendo primeiramente DTT (10 mg /ml) por 20 min. sob leve agitação, e posteriormente, iodoacetamida (25 mg /ml) por outros 20 min. sob leve agitação.

A segunda dimensão foi realizada em géis SDS de poliacrilamida (12,5%) em cuba SE600 (GE Healthcare, USA) com amperagem de 25mA/4gel por 17h30min. com temperatura constante à 4°C, usando banho termostático MultitempIII (Ge Healthcare, USA). Pesos moleculares foram adicionados ao lado de cada tira/gel (All Blue-Precision Plus Protein Standart- Biorad). Placas de baixa fluorecência (GE Healthcare, USA) foram usadas para minimizar o *background* de fluorescência durante os escaneamentos dos géis.

Após a corrida da segunda dimensão, o gel preparativo foi fixado em solução de fixação (15% de etanol e 1% ácido cítico pH 2,3) por 16h e corado com deep purple (Ge Healthcare, USA) conforme recomendações do fabricante, em seguida lavado com etanol 15% e mantido a 4°C até a coleta dos spots.

Os géis cujas proteínas estavam marcadas com CyDye foram empregados para aquisições de imagens e posteriormente análises de expressão diferencial.

3.5.4. Aquisição de imagem dos géis, análise estatística e coleta dos spots

Os géis, cujas proteínas marcadas com CyDye (Tabela 1) foram escaneados no Typhoon Trio (Ge Helthcare, USA) com os comprimentos de ondas de: 520BP Cy2 Blue (488/520 nm) normal, 580BP Cy3 Green (532/580 nm) normal e 670BP Cy5 Red (633/670 nm) normal. Os PMTs (do inglês, *photomultiplier tube*) usados em cada gel estão descritos na Tabela 2.

As imagens foram analisadas usando programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, USA). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste Student´s t para avaliar o grau de significância entre as comparações. O valor de $p < 0.025$ foi usado para estabilizar o nível de significância. Os spots diferencialmente expressos foram coletados a partir dos géis preparativos (descrito no item 3.5.3) por sistema robótico Spot Picker (GE Healthcare, USA).

Tabela 2. PMT usado no escaneamento dos géis.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Cy2-PMT	570	565	575	570	575	575
Cy3-PMT	560	590	560	545	555	560
Cy5-PMT	530	550	535	535	530	540

3.5.5. Sequenciamento dos spots selecionados

Os spots previamente selecionados e coletados foram transferidos para um tubo novo, lavados e descorados com 500 µl de uma solução de metanol 50% por 14 horas. Os spots foram desidratados em 200 µl de acetonitrila e reidratados em 30 µl de ditiotreitol (DTT) à 10 mM em 0,1 M de bicarbonato de amónio e reduzidos à T.A. por 30 minutos. A solução de DTT foi removida e as amostras foram alquiladas em 30 µl de iodoacetamida 50 mM em 0,1 M de bicarbonato de amónio à T.A. durante 30 minutos. O reagente foi removido e os spots foram desidratados em 100 ul de acetonitrila. A acetonitrila foi removida e os spots foram reidratados em 100 µl de bicarbonato de amónio 0,1M. Posteriormente, os spots foram novamente desidratados em 100 µl de acetonitrila, em seguida a acetonitrila foi removida e os spots foram secos completamente por centrifugação de vácuo. Os spots foram, então, reidratados em 20 ng/µl de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amónio em gelo durante 10 minutos. Qualquer solução de tripsina em excesso foi removido e 20 µl de bicarbonato de amónio 50 mM foi adicionado. As amostras foram digeridas por aproximadaemnte 14h à 37 ° C. Os peptídeos formados extraídos da poliacrilamida foram colocados em duas alíquotas de 30 µl de 50% acetonitrila à 5% de ácido fórmico. Estes extratos foram combinados e evaporados a 15 µl para análise de sequenciamento de massa. Esse procedimento, bem como pesquisa em bancos de dados e análise de identificação foram os mesmos descritos no item 3.4. A função molecular prevista para cada peptídeo sequenciado foi determinado pesquisando em Gene Ontology (http://www.geneontology.org/) e Uniprot (http://www.uniprot.org/). O pI (ponto isoelétrico) das sequências foram calculados usando o site ExPASy (http://expasy.org/proteomics).

3.6. Imunoproteoma

3.6.1. Anticorpos primários e secundários

Para detecção das proteínas nativas presentes nas amostras salivares do carrapato *R. microplus*, soros de bovinos HPB (n=4) e Nelore (n=4) submetidos à duas infestações artificiais consecutivas com 10.000 larvas e 20.000 larvas, respectivamente, foram coletados durantes os estágios do ciclo de vida do carrapato (larva, ninfa e adultos) e usados como anticorpo primário em *pool* na diluição de 1:100 em TBS-T 2% de leite desnatado em pó. Soros de bovinos HPBs e Nelores não infestados também foram usados.

Para detecção das proteínas salivares reconhecidas pelos soros bovinos, proteína G-HRP (Pierce) foi usada na diluição de 1:2.000 em TBS-T contendo 0,1% (p/v) de BSA.

3.6.2. Preparação dos extratos protéicos, hidratação das tiras, focalização isoelétrica e corrida gel 2D

A preparação dos extratos protéicos, hidratação das tiras, focalização isoelétrica e corrida da segunda dimensão foram realizados da mesma maneira descrita nos itens 3.2.1 e 3.5, exceto a parte de marcação com CyDye.

Amostras de SalivaS, GSFRmS e GSFRmR foram usadas para realização dos imunoproteomas, consequentemente para coleta dos spots reconhecidos, ou não, por soros bovinos. Para cada extrato protéico foram realizados 7 tiras de 13 cm pH3-10 linear (Ge Healthcare, USA), consequentemente 7 géis para cada amostra testada, a saber: 1 tira/gel contendo 100µg proteína (utilizada de molde para coleta dos spots - corado com prata); 4 tiras/géis contendo 400 µg de proteína/gel (Western Blots com soros de bovinos infestados, ou não, com carrapato) e 2 tiras/géis contendo 400µg proteína (coleta spots). Para cada amostra, todas as tiras foram focalizadas ao mesmo tempo, assim como as 4 tiras utilizadas para os Western Blots foram separadas pela segunda dimensão na mesma corrida para evitar interferências inerentes às etapas.

Antes de iniciar as análises por Western Blots, foram realizados 1 gel 2D de poliacrilamida 12% de cada amostra focalizada (SalivaS, GSFRmS e GSFRmR) e coradas com prata usando kit Silver Staining protein (Ge Healthcare, USA). Esses géis foram

empregados para confrontar com os resultados dos Western Blots e nos guiar durante as coletas dos spots para sequenciamento.

3.6.3. Western Blot e coleta dos spots

Os géis obtidos da separação pela segunda dimensão foram transferidos para membranas de nitrocelulose ECL hybond (Ge Healthcare, USA) a 10V, 400mA por 25 min em cuba transferência semi-seca TE-70 ECL (Amersham Bioscience) usando tampão de transferência gelado (25mM Tris; 192mM Glicina; 20% Metanol, pH8,3). Essas membranas foram bloqueadas em TBST 5% de leite desnatado em pó por 1h em T.A. Posteriormente estas foram lavadas 2 vezes por 5 min/cada com TBST. Em seguida receberam soros dos bovinos descritos no item 3.6.1, a saber: 1° membrana - *pool* de soros bovinos suscetíveis (HPB) não infestados; 2° membrana - *poo*l de soro bovinos resistentes (Nelore) não infestados; 3° membrana - *pool* de soro bovinos suscetíveis (HPB) infestados e 4° membrana - *pool* de soro bovinos resistentes (Nelore) infestados. Essas membranas foram incubadas com os soros bovinos por 14 h a 4°C, em seguida foram lavadas 3 x por 5 min/cada. Posteriormente, foram incubadas com proteína G-HRP por 1h em T.A., conforme descrito no item 3.6.1, e em seguida foram lavadas 3 x 5 min/ cada. Para visualização dos spots reconhecidos, ou não, por soros de bovinos, as membranas receberam o substrato ECL Western Blotting Substrate (Pierce- Thermo Scientific) e a visualização dos spots foi evidenciado usando o Sistema de Imagem Multifuncional (Ge Healthcare, USA).

Após a realização de todos os Western Blots, foram realizados novos géis 2D (géis preparativos) que foram utilizados para as coletas dos spots reconhecidos, ou não, por soros bovinos. Estes foram realizados, conforme protocolo descrito anteriormente. Após a corrida, os géis preparativos foram corados com PhastGel Blue R (Ge Healthcare, USA) conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, estes foram submetidos a coleta dos spots usando pinças cirúrgicas mufladas. Os spots previamente selecionados foram coletados e acondicionados individualmente em tubo de 1ml contendo 2µl de água milliq estéril e foram submetidos para sequenciamento de massa.

3.6.4. Sequenciamento dos spots selecionados

O sequenciamento dos spots selecionados nos Western Blots de salivaS, GSFRmS e GSFRmR foram realizados conforme descrito nos itens 3.4 e 3.5.5.

3.7. Fluxograma

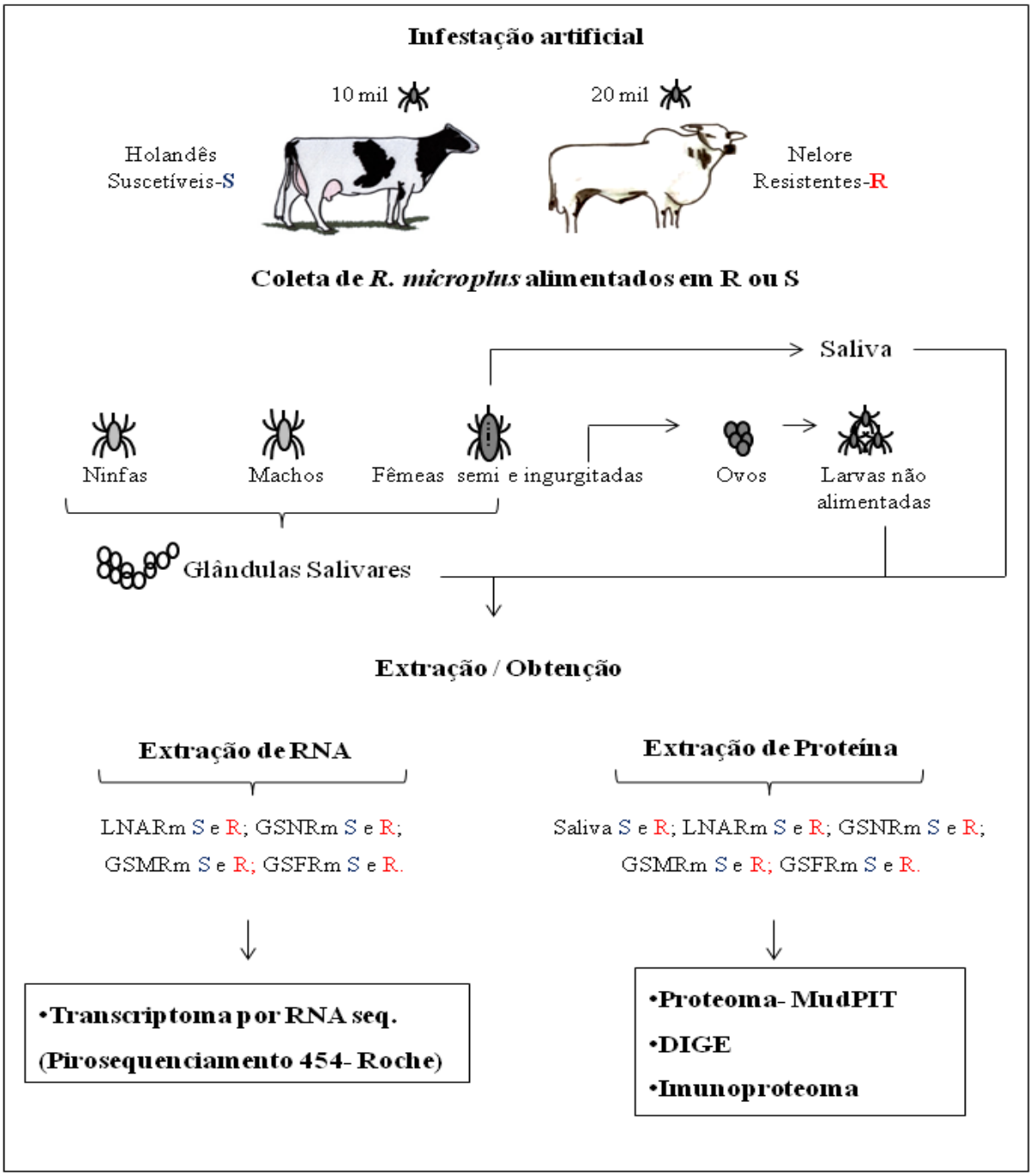


Figure 3. Fluxograma. Delineamento experimental conduzido neste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Transcriptoma do *R. microplus*

A fim de obter um completo catálogo sobre os constituintes salivares e uma visão geral sobre a biologia do carrapato *R. microplus* no contexto da origem de alimentação sanguínea (se em hospedeiro bovinos geneticamente resistente ou suscetível) e do seu ciclo de desenvolvimento (larva, ninfa e adultos - macho e fêmea) foram realizadas 8 bibliotecas de cDNA, a saber: larvas não alimentadas oriundas de fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros suscetíveis (LNARmS), larvas não alimentadas oriundas de fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros resistentes (LNARmR), glândulas salivares de ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros suscetíveis (GSNRmS), glândulas salivares de ninfas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros resistentes (GSNRmR), glândulas salivares de machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros suscetíveis (GSMRmS), glândulas salivares de machos de *R. microplus* alimentados em hospedeiros resistentes (GSMRmR), glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros suscetíveis (GSFRmS) e glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* alimentadas em hospedeiros resistentes (GSFRmR). Estas foram sequenciadas pela tecnologia de sequenciamento de nova geração, baseada em RNA-seq (454 sequencing Technology - Roche Diagnostics Corporation) que permite obtenção de um maior volume de sequências (principalmente sequências completas), consequentemente um maior número de informações (85), caracterizando assim um novo sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus*.

4.1.1. Análise por bioinformática

Após os sequenciamentos das bibliotecas de cDNA e dos proteomas (descrito no item 4.2 desta seção) do *R. microplus*, os resultados foram analisados por bioinformática e todas as informações foram organizadas em planilhas de Excel hiperlincadas (Tabelas suplementares 1 e 2), porém os links não estão disponíveis por motivo de proteção de propriedade intelectual. Primeiramente, as informações foram organizadas por programas de bioinformática com base nas sequências de nucleotídeos montadas virtualmente a partir das reads (denominadas de contigs) obtidas nos sequenciamentos das bibliotecas de cDNA. Essas informações podem ser visualizadas na Tabela suplementar 1.

Posteriormente, na Tabela suplementar 2, essas sequências de nucleotídeos foram traduzidas para sequências de aminoácidos e foram organizadas por famílias e anotadas de acordo com sua possível função putativa. Em ambas as tabelas, para cada contig identificado no sialotranscriptoma existem inúmeras informações, a saber: comprimento das sequências; número de reads; presença ou não de peptídeo sinal (indicativo de secreção), bem como localização citoplasmática ou provável função de ancoramento; resultados do blast para diversos bancos de dados com os respectivos *e-value*, cobertura, extensão do *match*, porcentagem da cobertura e porcentagem de identificação; tabela comparativa entre as 8 bibliotecas, mostrando número de reads individualmente para cada biblioteca dentro de cada contig; análises de comparações entre as bibliotecas com seus respectivos testes estatísticos; confirmação à nível protéico, devido a presença ou ausência nos diversos proteomas de *R. microplus*; se ocorre *match*, extensão do *match*, *e-value*, comprimento do melhor *match*, porcentagem da cobertura e porcentagem de identificação com sequências presentes no sialotranscriptoma de *R. microplus* realizado previamente com tecnologia SMART (50); número de possíveis locais de glicosilação presente na sequência; peso molecular; ponto isoelétrico; classificação por função; descrição das sequências; dentre outras informações.

4.1.2. Características gerais do sialotranscriptoma de *R. microplus* assemblado

As bibliotecas de cDNA foram piro-sequenciadas resultando num total de 2.413.950 reads e posteriormente assembladas em 348.707 contigs, incluindo *singletons*. Uma subanálise mais criteriosa dos dados assemblados foi realizada para agrupar os contigs contendo no mínimo 4 sequências, sendo que cada sequência constituída por, pelo menos, 149 nucleotídeos. Este processo resultou em 40.734 contigs que continham 1.999.086 reads, aproximadamente 83% do total reads geradas pelos sequenciamentos.

Todas as bibliotecas oriundas de carrapatos alimentados em hospedeiros bovinos geneticamente resistentes (RmR) contabilizaram 1.005.880 reads (50,3% das reads) e estão distribuídas da seguinte maneira: a biblioteca de LNARmR é formada por 164.030 reads ou 8,2% das reads assembladas, seguido pela biblioteca de GSNRmR com 264.162 reads (13,2%), GSFRmR com 196.336 reads (9,8%) e GSMRmR com 381.352 reads (19%). Em adição, a biblioteca de LNARmS contabilizou 199.077 reads ou 9,9% das reads

assembladas, seguido da biblioteca de GSNRmS com 321.163 reads (16%), GSFRmS com 215.093 reads (10,7%) e GSMRmS com 257.873 reads (12,9%), totalizando 993.206 reads (49,7%) presentes em bibliotecas oriundas de carrapatos alimentados em hospedeiros bovinos geneticamente suscetíveis (RmS). Esses resultados podem ser visualizados na Tabela suplementar 1.

Em seguida, como mencionado no item 4.1.1, esses resultados foram utilizados para extrair 11.676 sequências codificadoras (CDS), em outras palavras sequências protéicas, das quais foram derivadas de 931.698 reads ou 39% da totalidade das reads. Analisando somente as bibliotecas de RmR, 498.482 reads foram anotadas em 11.329 CDS que estão distribuídas da seguinte maneira: 6.018 CDS anotadas a partir de 5,8% do total de reads e estão presentes na biblioteca de LNARmR, seguido pela biblioteca de GSNRmR com 7.060 CDS anotadas a partir de 12.8% de reads, GSMRmR com 9.414 CDS anotadas a partir de 27,3% das reads e na biblioteca de GSFRmR com 7.305 reads anotadas de 7,5% das reads. Já em relação as bibliotecas de RmS, 433.216 reads foram anotadas em 10.667 CDS que estão distribuídas em 3.755 CDS (9,2% das reads) para biblioteca de LNARmS, seguido pela biblioteca de GSNRmS com 5.425 CDS (16,2% das reads), GSMRmS com 9.215 CDS (11,4% das reads) e biblioteca de GSFRmS com 9,5% da totalidade das reads assembladas em 2.238 CDS. Estes dados estão mostrados na Tabela 3 e na Tabela suplementar 2.

Tabela 3. Abundância e distribuição das sequências codificadoras (CDS) e reads presentes no sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus* por biblioteca de cDNA.

Biblioteca cDNA	*R.microplus* alimentado em bovinos **Resistentes**		*R.microplus* alimentado em bovinos **Suscetíveis**	
	N° of CDS	**N° of Reads**	**N° of CDS**	**N° of Reads**
LNA	6.018	54.115 (5,8%)	3.755	86.135 (9,2%)
GSN	7.060	119.574 (12,8%)	5.425	151.406 (16,2%)
GSM	9.414	254.657 (27,3%)	9.215	106.691 (11,4%)
GSF	7.305	70.136 (7,5%)	2.238	88.984 (9,5%)
Total	11.329	498.482	10.667	433.216

A anotação manual dos 11.676 CDS presentes no sialotranscriptoma de *R. microplus* resultou em cinco principais categorias, a saber: categoria de proteínas putativamente secretadas (S), constitutivo (C), desconhecido (D), elemento transponível (ET) e viral (V) (Tabela suplementar 2). As sequências derivadas da categoria secretada são compostas por 278.351 reads assembladas em 3.600 CDS, gerando uma média de 77 reads por CDS (31% do total de CDS). As sequências relacionadas com a categoria constitutivo representam 4.629 CDS (com uma média de 66 reads por CDS) assembladas de 307.184 reads, enquanto que 2.822 CDS assembladas de 331.738 reads (média de 117 reads por CDS) representa a categoria desconhecido. Já a categoria de elemento transponível é composta de 618 CDS (média de 23 reads por CDS) assembladas de 14.139 reads e finalmente a categoria viral contém 7 CDS assembladas de 286 reads, obtendo uma média de 41 reads por CDS (Resumido na Tabela 4).

Essas CDS classificadas foram subsequentemente agrupadas em 120 famílias de acordo com a suas possíveis funções putativa. Este catálogo anotado está disponível na Tabela suplementar 2 e resumido na tabela 7 e 8. Em adição, essas famílias serão descritas e discutidas no item 4.3 dessa seção, juntamente com os resultados dos proteomas.

Tabela 4. Classificação e abundância das reads e das sequências codificadoras (CDS) do sialotranscriptoma de *R. microplus* por categoria.

Categorias	Número de CDS	Número de reads	% total de reads	Reads/CDS
Secretada	3.600	278. 351	29,88	77.3
Constitutivo	4.629	307.184	33,97	66.4
Desconhecida	2.822	331.738	35,61	117.6
Elemento Transponível	618	14.139	1,52	22.9
Viral	7	286	0,03	40.9
Total	11.676	931.698		

Em relação às novas informações obtidas nesse novo sialotranscriptoma do *R. microplus* realizado com tecnologia de RNAseq, aproximadamente 9.243 novas CDS foram identificadas ou seja, cerca do quádruplo de informações geradas pelo transcriptoma anterior (obtida com tecnologia SMART e sequenciamento Sanger) sobre constituintes

salivares dessa espécie de carrapato; o sialotransccriptoma realizado com tecnologia SMART já tinha apresentado 53% de novas informações quando comparado com o BMiGI. Portanto, esse novo sialotranscriptoma do *R. microplus* representa um número maior de informações em relação a todas as plataformas já disponíveis.

4.2. Proteomas do *R. microplus*

Para adicionar e complementar o novo catálogo do carrapato *R. microplus*, gerado pelo sialotranscriptoma, foram realizados 10 proteomas também de acordo com diferentes origens de alimentação sanguínea e do ciclo de desenvolvimento do carrapato (a saber, proteomas de SalivaS, SalivaR, LNARmS, LNARmR, GSNRmS, GSNRmR, GSMRmS, GSMRmR, GSFRmS e GSFRmR). Esses proteomas foram sequenciados empregando a tecnologia MudPIT, permitindo assim a identificação de grande número de proteínas salivares distintas.

4.2.1. Características gerais dos proteomas do *R. microplus*

Os proteomas sequenciados por MudPIT resultaram na identificação de 321 proteínas diferentes (Tabela suplementar 3). Dessas 321 proteínas, 234 são comuns entre os proteomas de RmS e RmR e 70 proteínas são exclusivas de proteomas de RmS, enquanto que apenas 17 proteínas são exclusivas de proteomas de RmR. Portanto, 304 proteínas foram identificadas nos proteomas de RmS e 251 proteínas nos proteomas de RmR (Tabela 5 e Tabela suplementar 4).

Tabela 5. Quantidade de proteínas encontradas nos proteomas de *R. microplus*

Proteomas	N° de proteínas identificadas
Todos os proteomas de RmS*	304
Todos os proteomas de RmR**	251
Exclusivas dos proteomas de RmS#	70
Exclusivas dos proteomas de RmR##	17
Em comum RmS e RmR*#	234
Todos os proteomas¥	321

RmS: carrapato *R. microplus* alimentado em bovinos geneticamente suscetíveis; RmR: carrapato *R. microplus* alimentado em bovinos geneticamente resistentes.
*- Proteínas encontradas nos proteomas de SalivaS, LNARmS, GSNRmS, GSMRmS e GSFRmS.
**- Proteínas encontradas nos proteomas de SalivaR, LNARmR, GSNRmR, GSMRmR e GSFRmR.
#- Proteínas encontradas **exclusivamente** nos proteomas de SalivaS, LNARmS, GSNRmS, GSMRmS e GSFRmS
##- Proteínas encontradas **exclusivamente** nos proteomas de SalivaR, LNARmR, GSNRmR, GSMRmR e GSFRmR.
*#-Proteínas comuns a todos os proteomas de RmS e RmR.
¥- Total de proteínas identificadas nos 10 proteomas.

Em análise individual dos proteomas (Tabelas suplementares de 5-14 e resumido na Tabela 6), o de LNARmS está representado por 22 proteínas identificadas a partir de 118 espectros, seguido pelo proteoma de GSNRmS com 227 proteínas (2.138 espectros), GSMRmS com 89 proteínas (682 espectros), GSFRmS com 244 proteínas (2.227 espectros) e salivaS com 19 proteínas (66 espectros). Já em relação aos proteomas de RmR, o de LNARmR está representado por 4 proteínas identificadas a partir de 5 espectros, seguido do proteoma de GSNRmR com 177 proteínas (1.541 espectros), GSMRmR com 78 proteínas (688 espectros), GSFRmR com 174 proteínas (1.309 espectros) e salivaR com 8 proteínas (232 espectros).

Nota-se que em todos os proteomas oriundos de RmS apresentam quantidade maior de proteínas identificadas em relação aos respectivos proteomas de RmR (Tabela 6), sendo que todos foram obtidos com o mesmo volume/quantidade de amostra.

Tabela 6. Distribuição das proteínas por proteoma.

Amostras	Proteomas de RmS		Proteomas de RmR	
	N° de proteínas identificadas	N° de espectros identificados*	N° de proteínas identificadas	N° de espectros identificados*
LNA	22	118	4	5
GSN	227	2.138	177	1.541
GSM	89	682	78	688
GSF	244	2.227	174	1.309
Saliva	19	66	8	232

*- Número de espectro pelo qual o peptídeo pode ser identificado.

Além disso, as tabelas suplementares de 5-14 mostram os tipos de proteínas identificadas individualmente nos diferentes proteomas. Nessas tabelas podem ser visualizadas diversas informações para cada proteína/sequência identificada, a saber: número de acesso correspondente no sialotranscriptoma, uma vez que este serviu como base de dados para pesquisa de identificação dessas proteinas sequenciadas; identificação/nome da proteína (em inglês); peso modecular (kDa); cobertura da sequência; função putativa (de acordo com as análises obtidas no sialotranscriptoma); sequência do peptídeo sequenciado; e as possíveis modificações. Além dessas informações e análises descritas até o momento, outras comparações empregando os resultados desses proteomas foram realizadas e serão descritos a seguir.

Para somar informações sobre a biologia do *R. microplus,* comparações entre os estágios do ciclo de vida do carrapato (larva, ninfa e adulto - fêmea e macho, além de saliva de fêmeas) quando alimentado em um mesmo hospedeiro (seja RmS ou RmR) foram realizadas. Para isso, foram confrontados os proteomas de LNARmS e GSNRmS resultando em 212 proteínas exclusivas de GSNRmS, enquanto que apenas 7 proteínas são exclusivas de LNARmS e 15 são comuns a ambas as amostras (Tabela suplementar 15).

Já a comparação entre GSNRmS e GSFRmS resultou em 44 proteínas exclusivas de GSNRmS, 61 proteínas exclusivas de GSFRmS e 183 proteínas são compartilhadas entre os estágios (Tabela suplementar 16). A comparação entre GSNRmS e GSMRmS resultou em 159 proteínas exclusivas de GSNRmS, 21 proteínas exclusivas de GSMRmS e 68 proteínas compartilhadas entre as amostras comparadas (Tabela suplementar 17).

Comparando amostras oriundas da fase adulta do carrapato, ou seja entre GSFRmS e GSMRmS, essa análise resultou em 169 proteínas exclusivas de GSFRmS, enquanto que apenas 14 são exclusivas de GSMRmS e 75 proteínas são compartilhadas entre as amostras (Tabela suplementar 18). Em relação as proteínas salivares das fêmeas, se buscou saber quais são secretadas, portanto comparamos o proteoma de GSFRmS com o de SalivaS. A comparação resultou em 228 proteínas exclusivas do proteoma de GSFRmS, enquanto que apenas 3 proteínas são exclusivas de SalivaS e 16 são comuns entre as amostras (Tabela suplementar 19).

Para finalizar as comparações entre os proteomas de RmS, comparamos os proteomas da fase intermediária (ninfa) com os da fase adulta (macho e fêmea), ou seja comparamos os proteomas de GSNRmS com GSFRmS e GSMRmS para evidenciar as proteínas que são comuns a esses estágios do ciclo de vida do carrapato ou que as difereciam. Essa comparação identificou 67 proteínas comuns a essas fases (Tabela suplementar 20).

Essas comparações também foram realizadas empregando os proteomas de RmR. Na comparação entre o proteoma de LNARmR e GSNRmR identificou 175 proteínas exclusivas de GSNRmR, enquanto que apenas 2 proteínas é exclusivas de LNARmR e 2 proteínas comuns aos proteomas comparados (Tabela suplementar 21). Já na comparação entre o proteoma de GSNRmR e GSFRmR identificou 57 proteínas exclusivas de GSNRmR, 54 exclusivas de GSFRmR e 120 proteínas comuns entre as amostras (Tabela suplementar 22). Entre GSNRmR e GSMRmR identificou 118 proteínas exclusivas de GSNRmR, 19 exclusivas de GSMRmR e 59 proteínas comuns entre as amostras (Tabela suplementar 23). Já na comparação entre o proteoma de GSFRmR e GSMRmR identificou 116 proteínas exclusivas de GSFRmR, 20 exclusivas de GSMRmR e 58 proteínas comuns entre as amostras (Tabela suplementar 24). Em relação a comparação entre GSFRmR e SalivaR identificou 173 proteínas exclusivas de GSFRmR, 7 exclusivas de SalivaR e 1 proteína comum entre as amostras (Tabela suplementar 25). Em adição, 54 proteínas são compartilhadas entre os proteomas de GSNRmR, GSFRmR e GSMRmR (Tabela suplementar 26).

Além disso, fizemos comparações entre os estágios para evidenciar se a origem de refeição sanguínea pode afetar os tipos de proteínas presentes nessas diferentes amostras, em outras palavras se os diferentes tipos de imunidade ao carrapato interferem nos constituintes salivares. Para isso, proteoma de LNARmS foi comparado como proteoma de

LNARmR resultando em 21 proteínas exclusivas de LNARmS, enquanto que apenas 3 proteínas são exclusivas de LNARmR e apenas 1 proteína é compartilhada (Tabela suplementar 27). Já a comparação entre o proteoma de GSNRmS com o de GSNRmR identificou 85 proteínas exclusivas e presentes apenas em NRmS, enquanto que 35 proteínas são exclusivas de NRmR ; a presença de 142 proteínas independe da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 28). Na comparação entre GSFRmS e GSFRmR mostra que 88 proteínas são exclusivas de FRmS, enquanto que 18 são exclusivas de FRmR; a presença de 156 proteínas independe da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 29). Em relação à comparação entre os proteomas de GSMRmS e GSMRmR, esta mostrou 39 proteínas presentes apenas em MRmS, enquanto que 28 exclusivas de MRmR e 50 proteínas independe da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 30). Para finalizar as combinações, SalivaS e SalvaR foram comparadas resultando em 17 proteínas exclusivas presentes apenas SalivaS, enquanto que 6 exclusivas de SalivaR e apenas 2 proteínas independe da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 31). Assim, essas evidências sugerem que as diferentes imunidades dos hospedeiros podem afetar em nível protéico a composição salivar do carrapato.

Além dessas comparações, os resultados dos sequenciamentos dos 10 proteomas foram analisados utilizando a base de dados do *Bos taurus* do NR-NCBI para verificar se proteínas do hospedeiro ingeridas pelo carrapato durante sua refeição de sangue recirculam na glândula salivar e/ou se são secretadas na saliva da fêmea. Surpreendentemente, foram identificadas 106 proteínas diferentes dos hospedeiros, incluindo actinas, hemoglobinas, queratinas, transferrinas e albuminas séricas dentre outras proteínas do soro, porém inesperavelmente não foram encontradas imunoglobulinas dos hospedeiros, mesmo estas estando em abundância no plasma bovino. Este achado sugere que os carrapatos dos bovinos podem apresentar uma estratégia importante e eficiente para intervir na resposta humoral dos seus hospedeiros, uma vez que é conhecido que os hospedeiros bovinos conseguem montar resposta imune humoral contra antígenos salivares do *R. microplus* (86), e que anticorpos de bovinos imunes estão presentes em hemolinfa de fêmeas de *R. microplus* ingurigitadas com atividade preservada mesmo após o ciclo de vida parasitária ser concluído (87). Além disso, alguns trabalhos monstram que a resistência ao carrapato pode estar associada com a resposta humoral dos hospedeiros (38, 88, 89). Essa hipótese será melhor discutida no item 4.3 sobre "proteínas ligantes de imunoglobulinas G

(PLIGs)". Mas esta não é a única explicação: a região Fab é tão diversa que dificilmente seria detectada pleo MudPIT. Vale mencionar que não encontramos Fc.

Em geral, os proteomas serviram para identificar muitas proteínas diferentes presentes nesses constituintes salivares, porém a grande maioria dessas proteínas está associada com possível função constitutiva do carrapato e uma minoria com função moduladora associada ao parasitismo. Essas proteínas juntamente com os transcritos obtidos no sialotranscriptoma serão discutidos, em conjunto para um melhor entendimento, a seguir.

4.3. Descrição dos transcritos e proteínas identificadas por família

Neste item serão descritos e discutidos as familias encontradas e anotadas a partir dos transcritos obtidos no sialotranscriptoma do *R. microplus*, de acordo com as suas funções putativas. Em cada família descrita haverá informações confirmando, ou não, a presença nos proteomas. Análise deexpressão diferencial entre as diferentes bibliotecas foram realizadas da mesma maneira ou combinações, conforme descrito anteriormente no item 4.2.1. Neste item iremos focar principalmente nas famílias presentes na categoria S, uma vez que estas podem auxiliar os carrapatos durante o parasitimo. As tabelas suplementares 33-35 incluem também a análise de expressão diferencial dos transcritos das categorias constitutivo, desconhecidas, viral e elemento transponível, no entanto, não serão discutidas em detalhes. O texto a seguir serve como um guia para a navegação da Tabela suplementar 2.

4.3.1. Categoria de proteínas constitutivas: genes expressos da categoria constitutivo

As 4.629 CDS anotadas como genes expressos da categoria constitutivo do sialotranscriptoma de *R. microplus* foram assemblados a partir de 307.184 reads e foram posteriormente caracterizados em 18 subgrupos/famílias de acordo com a possível função putativa (Tabela suplementar 2 e resumido na Tabela 7).

Um grupo de transcritos composto de 5.378 reads assemblados em 52 CDS foi associado com imunidade do carrapato por apresentar maior similaridade com receptores

"toll-like", proteínas associadas com interferon, alfa-2-macroglobulina e outras proteínas de imunidade do carrapato. Também foram recuperadas proteínas que podem afetar a resposta imune dos hospedeiros, tais como fator de inibição da migração de macrofagos e PLIGs. Além disso, as famílias de receptores "toll-like" e PLIGs apresentaram representantes nos proteomas de GSN (RmS e RmR) e GSM (RmS e RmR), respectivamente. Esses resultados sugerem que a presença desses transcritos são essenciais para defesa do carrapato *R. microplus* contra agentes patogênicos que podem estar presentes no sangue dos seus hospedeiros ou mesmo no ambiente, bem como para auxiliar a modulação de resposta imune dos hospedeiros durante o parasitismo.

Membros dos grupos das peptidases citosólicas também foram encontrados, tais como membros das famílias da catepsina, calpaína, aminopeptidase, protease de membrana, carboxipeptidase e outras peptidases, totalizando 42 CDS anotadas em 1.501 reads. As sequências da família nomeada "outras peptidases" também estão presentes nos proteomas de GSFRmS, GSFRmR e GSNRmR. Um grupo que soma 245 CDS representa uma importante função salivar e foi anotada como família de maquinária de exportação de proteínas. Membros dessa família também foram recuperados dos proteomas de GSN (RmS e RmR) e GSF (RmS e RmR).

Em relação aos constituintes estruturais, proteínas foram identificadas e anotadas como membros da família de proteínas associadas com citoesqueleto. Esta família está representada por 284 CDS, muitas das quais associadas com tubulinas, actinas, miosinas entre outras. Proteínas dessa família foram recuperadas dos proteomas de RmS (LNA, GSN, GSF, GSM e Saliva) e RmR (GSN e GSF).

Enzimas que lidam com a desintoxicação do carrapato foram recuperadas e classificadas como sulfotransferase, glutationa transferase, dehidrogenase, O-metil-transferase e transportadores de resistência às drogas, totalizando 58 CDS (assemblados a partir de 1.096 reads). Além disso, 41 CDS (assemblados de 867 reads) foram anotadas como enzimas relacionadas com a desintoxicação oxidativo, composta pelo citocromo P450 e catalase, bem como selenoproteínas e superóxido-dismutase que podem ser secretadas e antagonizar a resposta inflamatória do hospedeiro. As famílias da glutationa transferase e citocromo P450 apresentaram *match* com proteínas encontradas nos proteomas de GSN (RmR e S) e GSF (RmR e S); e GSFRmR, respectivamente.

Um total de 153 CDS com 18.777 reads codificando proteínas associadas com matriz extracelular e adesão também foram recuperadas do sialotranscriptoma e

apresentaram similaridade com proteínas encontradas nos proteomas de GSN (RmS e RmR), GSF (RmS e RmR) e GSMRmS. Em relação ao metabolismo do carrapato, proteínas das famílias relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, energia, metabolismo intermediário, lípidos e nucleótidos foram recuperadas contabilizando 589 CDS extraídas de 61.488 reads. Todas as famílias apresentaram *match* com proteínas identificadas nos proteomas. Também foram recuperadas CDS associadas com o grupo de exportação nuclear (presente no proteoma de GSNRmS) e regulação nuclear (presentes nos proteomas de GSNRmR e S; GSFRmR e S; e GSMRmR e S) obtendo 11 membros assemblados a partir de 478 reads e 136 CDS de 4.633 reads, respectivamente.

Duzentos e vinte CDS atribuídas ao grupo de maquinaria de modificação protéica foram assembladas a partir de 11.878 reads. Essa família está presente nos proteomas de GSMRmS, GSNRmR e S; e GSFRmR e S. Além disso, 139 CDS extraídas de 5.263 reads foram anotadas como maquinaria de proteassoma (presente no proteoma de GSNRmR e S; e GSFRmS), enquanto que a família de maquinaria de síntese protéica (presentes nos proteomas de GSNRmR e S; GSFRmR e S; e GSMRmR e S) apresentou 312 CDS extraídas de 30.173 reads. Outras 522 CDS assembladas a partir de 19.438 reads foram anotadas como transdutores de sinal (presentes nos proteomas de GSNRmR e S; e GSFRmR e S), e 42 CDS com 2.070 reads foram associadas com apoptose.

As sequências representando fator de transcrição foram agrupadas em 93 CDS extraídas de 5.258 reads (presentes nos proteomas de GSMRmR e S; GSNRmR e S; e GSFRmR e S), enquanto que a família de maquinaria de transcrição está representada por 456 CDS assembladas a partir de 26.075 reads (também presentes nos proteomas de GSMRmR e S; GSNRmR e S; e GSFRmR e S). Já a família de transportadores e armazenagem está representada por 214 CDS extraídas de 8,966 reads e apresenta similaridade com os proteomas de GSMRmS, GSNRmR e S; e GSFRmR e S.

Além de todas essas famílias, aproximadamente 1.020 CDS foram classificadas como proteínas conservadas desconhecidas (988 CDS assembladas de 76.328 reads) e proteínas conservadas secretadas desconhecidas (32 CDS assembladas de 1.448 reads) e ambas famílias possuem membros nos proteomas. Estas proteínas conservadas de função desconhecidas são possivelmente proteínas não caracterizadas associadas com função celular ou de modulação de respostas dos hospedeiros.

Tabela 7. Classificação funcional dos transcritos do sialotranscriptoma de *R. microplus* anotados na categoria constitutiva.

Classes e famílias	Número de CDS	Número de reads	% total de reads*	Reads/CDS	Presente no proteoma?qual(is)?
Proteínas constitutivas					
PRODUTOS ASSOCIADOS COM IMUNIDADE					
Proteína ligante de Imunoglobulina G	14	3795	1,24	271,1	GSMRmS e GSMRmR
Similar a fator de inibição de migração de macrófago	7	263	0,09	37,6	-
Similar a proteína associada com interferon	7	243	0,08	34,7	-
Receptores Toll-like	2	121	0,04	60,5	GSNRmS e GSNRmR
Alfa-2-macroglobulina	4	89	0,03	22,3	-
Outras proteínas associadas com imunidade	18	867	0,28	48,2	-
Total	52	5378	1,75	103,4	
PEPTIDASES					
Catepsina (proteases contendo aspartil e cisteína)	7	368	0,12	52,6	-
Calpaína	3	41	0,01	13,7	-
Aminopeptidase	6	125	0,04	20,8	-
Protease de membrana	5	224	0,07	44,8	-
Peptidase - peptídeo sinal	4	168	0,05	42,0	-
Carboxipeptidase	6	329	0,11	54,8	-
Outras peptidases	11	246	0,08	22,4	GSFRmS, GSFRmR e GSNRmR
Total	42	1501	0,49	35,7	
MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS	245	11135	3,62	45,4	GSFRmR e S; GSNRmR e S
CITOESQUELETO	284	14934	4,86	52,6	LNARmS, GSNRmS e R; GSFRmS e R; GSMRmS;

					SalivaS
DESINTOXICAÇÃO					
Sulfotransferases	16	441	0,14	27,6	-
Glutationa transferase	16	292	0,10	18,3	GSNRmR e S; GSFRmR e S
Dehidrogenases	19	274	0,09	14,4	-
O-Metil transferases	3	18	0,01	6,0	-
Transportadores para resistência a múltiplas drogas	4	71	0,02	17,8	-
Desintoxicação oxidativo					-
Citocromo P450	24	519	0,17	21,6	GSFRmR
Catalase	7	115	0,04	16,4	-
Superóxido dismutase	4	45	0,01	11,3	-
Selenoproteínas	6	188	0,06	31,3	-
Total	99	1963	0,64	19,8	
MATRIZ EXTRACELULAR E ADESÃO	153	18777	6,11	122,7	GSNRmS e R; GSFRmS e R; e GSMRmS
METABOLISMO					
Aminoácido	59	3145	1,02	53,3	GSNRmR e GSFRmR e S
Carboidrato	76	3835	1,25	50,5	GSNRmR e S; GSFRmR e S
Energia	193	47209	15,37	244,6	GSMRmR e S; GSNRmR e S ;GSFRmR e S
Intermediária	39	833	0,27	21,4	GSNRmR e S; GSFRmR e S
Lipídeo	144	3694	1,20	25,7	GSNRmR e S; GSFRmR e S; GSMRmS
Nucleotídeo	78	2772	0,90	35,5	GSNRmR e S; GSFRmR e S; GSMRmS
Total	589	61488	20,02	104,4	
EXPORTAÇÃO NUCLEAR	11	478	0,16	43,5	GSNRmS

REGULAÇÃO NUCLEAR	136	4633	1,51	34,1	GSMRmR e S; GSNRmR e S; GSFRmR e S; LNARmS
MAQUINARIA DE MODIFICAÇÃO PROTEÍCA	220	11878	3,87	54,0	GSMRmS; GSNRmR e S; GSFRmR e S
MAQUINARIA DE PROTEASSOMA	139	5263	1,71	37,9	GSNRmR e S; GSFRmS
MAQUINARIA DE SÍNTESE PROTEÍCA	312	30173	9,82	96,7	GSMRmR e S; GSNRmR e S; GSFRmR e S
TRANSDUÇÃO DE SINAL	522	19438	6,33	37,2	GSNRmR e S; GSFRmR e S
Similar para proteína associada com apoptose	42	2070	0,67	49,3	-
Total	564	21508	7,00	38,1	
FATOR DE TRANSCRIÇÃO	93	5258	1,71	56,5	GSMRmR e S; GSNRmR e S; GSFRmR e S;
MAQUINARIA DE TRANSCRIÇÃO	456	26075	8,49	57,2	GSMRmR e S; GSNRmR e S; GSFRmR e S;
TRANSPORTADORES E ARMAZENAGEM	214	8966	2,92	41,9	GSMRmS; GSNRmR e S; GSFRmR e S;
PROTEÍNAS CONSERVADAS DESCONHECIDAS	988	76328	24,85	77,3	GSMRmR e S; GSNRmR e S; GSFRmR e S;
PROTEÍNAS CONSERVADAS SECRETADAS DESCONHECIDAS	32	1448	0,47	45,3	GSNRmS
TOTAL	**4.629**	**307.184**			

*Associadas com total de reads da categoria constitutiva.

4.3.2. Categoria de proteínas putativamente secretadas: genes expressos da categoria S

Um total de 278.351 reads assembladas em 3.600 CDS foram associadas com proteínas putativamente secretadas por GSs do carrapato *R. microplus.* Trabalhos recentes têm implicado tais transcritos como importantes para codificar proteínas que auxiliam e facilitam o processo de refeição sanguínea pelos carrapatos (25, 54, 75). A tabela Suplementar 2 e Tabela 8 contêm análises e anotações meticulosas dessa categoria de transcritos. Os dados anotados incluem famílias de genes conhecidas previamente, tais como lipocalinas, metaloproteases, proteases, peptídeos contendo domínios de inibição de proteases, peptideos antimicrobiais (PAMs), imunomoduladores, nucleases, proteínas de cimento, de cola, seda, ricas em glicinas, proteínas de caudas ácidas e básicas, dentre outras importantes famílias de proteínas associadas com obtenção de sangue e/ou facilitação do parasitismo.

A anotação a seguir serve como um guia para pesquisas nas Tabelas 8 e 9, e Tabelas suplementar 2, 33, 34 e 35.

Proteínas contendo domínios de inibidores de proteases

Esta família representa 4% (11.502 reads) das reads anotadas como proteínas secretadas putativamente, totalizando 368 CDS para proteínas contendo domínios associados com inibidores de proteases, tais como proteínas contendo domínio kunitz, kazal, til, serpina, tiropinas, cistatina, inibidor de carboxipeptidase e outras.

Proteínas contendo domínio kunitz

Proteínas contendo domínio kunitz são abundantemente encontradas em sialotranscriptomas de artropodes hematófagos, tais como de moscas (25, 90-92) e carrapatos (51, 75, 93), incluindo sialotranscriptoma de *R. microplus* realizado pela tecnologia SMART (94). Estas proteínas têm sido caracterizadas como inibidores da coagulação (95-97), vasodilatadores (98) e inibidores de proteases (99-101). Na Tabela suplementar 2 mostra 201 sequências contendo domínio kunitz deduzidas de 5.408 reads, destas 69 CDS são sequências completas (possuem metionina inicial e códon de terminação) e possuem peptídeo sinal indicativo de secreção. Estas proteínas contêm de 1 a

6 domínios kunitz baseados em sua assinatura SMART, classificadas como monolaris, bilaris, trilaris, tetralaris, pentalaris e hexalaris (Resumidas na tabela 8).

Em geral, os transcritos anotados como monolaris, bilaris e trilaris são significativamente mais expressos em bibliotecas de RmS (*p<0,001*), enquanto que as pentalaris e hexalaris são mais expressão em grande quantidade nas bibliotecas de RmR (*p=0.003* and *p<0.001*, respectivamente) e apenas a tetralaris não apresenta diferença significante entre as diferentes bibliotecas (Table 9). Em relação as análises dos transcritos de acordo com estágio de desenvolvimento do carrapato (larva x ninfa x adultos), é digno de nota que as famílias pentalaris e hexalaris não são expressas em larvas não alimentadas e em fêmeas, e isto independe da origem de alimentação sanguínea (se em hospedeiros geneticamente resistentes ou suscetíveis) (Tabela suplementar 33). As famílias monolaris, bilaris e trilaris são significativamente mais expressas em larvas não alimentadas (estágio inicial) oriundas de fêmeas que se alimentaram em hospedeiros resistentes (*p<0,001, p<0,001* and *p=0,009*, respectivamente), entretanto os carrapatos que se alimentaram em hospedeiros suscetíveis têm altos níveis da expressão desses transcritos durante o estágio intermediário (estágio de ninfa, *p<0,001*) e final (adulto- macho, *p<0,001*) (Tabela suplementar 33).

Esta observação pode ser melhor evidênciada na comparação dos transcritos de cada estágio de desenvolvimento do carrapato quando se alimenta em hospedeiros suscetíveis ou resistentes. Em geral estes transcritos estão aumentando significativamente com o passar do curso da infestação, alcançando a maior expressão na fase adulta (Tabelas suplementares 34 e 35), período em que os carrapatos mais necessitam desses constituintes para obtenção se sangue. Juntos, esses resultados sugerem que as larvas derivadas de fêmeas que se alimentaram em hospedeiros resistentes demonstram um aumento de transcritos destas famílias, possivelmente devido à influência que suas progenitoras receberam das respostas efetivas dos hospedeiros durante sua alimentação sanguínea. Desse modo sugerimos que as larvas oriundas de RmR conseguem modificar seus transcritos para lidar melhor frente a uma futura infestação nesses mesmos animais.

Em relação aos RmS, estes transcritos são frequentemente encontrados em grande quantidade no final da infestação (fase adulta), sugerindo que exibem uma maior facilidade na obtenção de sangue durante todo o curso da infestação, especialmente no final do processo de alimentação sanguínea que apresenta uma maior expressão desses transcritos.

Serpinas

Serpinas ou inibidor de serino proteases apresentam papéis importantes no controle da coagulação sanguínea e inflamação. Estas proteínas têm sido identificadas frequetemente em carrapatos (25, 62, 75, 102). Membros desta família possuem ação inibitória da catepsina G, quimase e elastase de vertebrados, bem como atividade imunosupressora em *I. ricinus* (103-105). Devido as várias funções associadas as serpinas, estas proteínas têm sido consideradas como antígenos em pontenciais para o desenvolvimento de vacinas anticarrapato, incluindo serpinas não salivares (62, 106).

Nesse novo sialotranscriptoma de *R. microplus* identificamos 15 CDS assembladas de 954 reads que estão associadas com membros dessa família, 7 CDS das quais são sequências completas e possuem peptídeo sinal que é indicativo de secreção. Além disso, membro desta família foi encontrado nos proteomas de SalivaS e SalivaR, mostrando que estas estão sendo secretadas em seus hospedeiros.

Em geral, estes transcritos estão significativamente mais expressos em bibliotecas de RmR ($p<0,001$) (Tabela 9), sugerindo que essa expressão em RmR pode ser devido à pressão sofrida por estes carrapatos frente à eficiente resposta hemostática dos seus hospedeiros. Em análises dos transcritos de acordo com estágio de desenvolvimento do carrapato, é digno de nota que estes transcritos estão abundantemente expressos em bibliotecas de carrapatos machos, apesar de haver a presença de transcritos desta família em todos os estágios de desenvolvimento (Tabela suplementar 33). Esta maior expressão em carrapatos machos acontece independentemente da origem de alimentação sanguínea, se em hospedeiro resistente ou suscetível (Tabelas suplementares 34 e 35). Assim, comparando apenas os transcritos das bibliotecas de carrapatos machos, estes são significativamente mais expressos em carrapatos MRmS (Tabela suplementar 33). Juntos estes resultados sugerem que os carrapatos machos desempenham um papel fundamental no processo final de obtenção de sangue, especialmente quando se alimentam em hospedeiros suscetíveis.

Tiropina (TY)

Tiropina, também conhecida como tiroglobulina, é um termo usado para determinar um tipo de proteína que tem a capacidade de inibir proteinases dependentes de cisteína ou cátion (107). As tiroglobulinas e inibidores de protease de cisteína são caracterizados por motivos de proteína *equistation* derivado de *actiniam* (108-110), que têm sido implicadas

na inibição de protease (108), além disso, estão associados com molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, suportando a participação como um fator de controle no processo de apresentação de antígenio (107). Essas proteínas são caracterizadas pela presença do domínio TY na base de dados SMART e têm sido previamente identificadas em carrapatos *A. variegatum, A. maculatum, R. sanguineus* (51, 56, 75), e em *R. microplus* (94).

A tabela Suplementar 2 mostra quatro sequências completas assembladas a partir de 76 reads, possuindo peptídeo sinal indicativo de secreção e domínios TY na base de dados SMART. Todas as sequências exibem melhores similaridades para uma tiropina salivar de *R. sanguineus* depositada na base de dados do NR-NCBI. Tal como observado no sialotranscriptoma de *A. maculatum*, foi recuperado uma sequência (Rm-nr-55483) com 26 sítios potenciais para galactosilação, portanto indicando domínios de tiropina e mucina (75).

Em geral, os membros desta família são significativamente mais expressos ($p < 0,001$) em bibliotecas de RmR (Tabela 9). Quando a fonte de alimentação sanguínea é o hospedeiro resistente, os membros dessa família são expressos durante todas as fases de desenvolvimento do carrapato, já quando a fonte de alimentação sanguínea é hospedeiro suscetível apenas ninfas expressam esses transcritos (Tabela suplementar 33).

Cistatinas

Cistatinas pertencem à uma família de inibidores de protease de cisteína, geralmente contendo quatro resíduos de cisteína conservados, que formam duas ligações de dissulfureto e, tipicamente, apresenta 115 aminoácidos (111-114). Estes foram funcionalmente caracterizados como inibidores da catepsina L e S, que possuem atividade antiinflamatória e imunossupressora (115), e são consideradas alvos em potenciais para as vacinas (30, 116). Trinta e quatro CDS para cistatinas extraídos de 941 reads foram recuperados do sialotransciptoma de *R. microplus*, 21 das quais são sequências completas, incluindo peptídeo sinal indicativos de secreção.

Representantes desta família estão presentes em todas as bibliotecas de *R. microplus* (Tabela suplementar 33), porém apresentando expressão significativamente mais elevada ($p = 0,009$) em bibliotecas de RmS (Tabela 9). Em análise dos transcritos por estágio de desenvolvimento do carrapato, estes estão significativamente mais expressos em LNARmR ($p = 0,02$), enquanto que no estágio intermediário (ninfa) e adulto (macho)

essas transcritos são significativamente mais expressos (*p <0,001*) em RmS (Tabela suplementar 33).

Já em análise dos transcritos das bibliotecas RmR, estes transcritos são significativamente mais expressos em carrapatos machos (Tabela suplementar 34), enquanto que os transcritos das bibliotecas de RmS são significativamente mais expressos em ninfas e machos (Tabela suplementar 35). Portanto, independente da origem de alimentação de sangue, os carrapatos vão precisar sempre de membros desta família durante todo o curso da infestação. Em adição, os carrapatos machos são os que se destacam na expressão de transcritos desta família, sugerindo que novamente os carrapatos machos têm um papel importante no processo final de refeição de sangue.

Domínio Kazal

Peptídeos contendo domínio kazal pertencem a uma importante família que são considerados inibidores de serina protease e também podem afetar outras proteínas, como trombina e plasmina, além de apresentar atividade antimicrobiana (117-120). Além disso, no sialotranscriptoma de *Am. variegatum* as proteínas que contêm vários domínios pode apresentar o domínio de Kazal, em conjunto com o domínio de ligação à fator de crescimento de insulina, sugerindo uma função de modulação de cascatas de transdução de sinal (56). Representantes desta família foram previamente identificadas em outros sialotranscriptomas de artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos *R. sanguineus, A. variegatum e A. maculatum* (51, 56, 75).

Aqui, 6 CDS assembladas a partir de 306 reads apresentando peptídeo sinal foram recuperadas e anotadas como peptídeos contendo domínio kazal, destas, três CDS (Rm-nr-88797, Rm-n-113485 e Rm-n-113484) são sequências completas. A CDS nomeado como Rm-nr-88797 presente no sialotranscriptoma de *R. microplus* teve a identidade de 99% e cobertura de 73% com uma CDS de *A. maculatum* (Am-25261). Anotação anterior desse transcrito mostra um domínio Kazal na sua região amino terminal, um domínio EFhand e um domínio de von Willebrand do tipo C na reagião carboxi terminal. Esta proteína apresenta uma alta identificação com a proteína relacionada com folistatina (FRP) do carrapato *Haemaphysalis longicornis*, que têm sido associados à função *housekeeping* (75). Proteínas semelhantes nos vertebrados têm sido associadas à modulação no transporte de íons em neurônios, apesar de função de housekeeping (121).

Em relação as análises de comparação entre as bibliotecas, estes representantes são significativamente mais expressos (*p <0,001*) em bibliotecas de RmS (Tabela 9). Em relação à análise entre estágios de desenvolvimento de carrapato, esses representantes não apresentam diferença significativa entre as LNA, enquanto NRmR têm uma expressão significativamente maior do que NRmS (*p = 0,01*) e na fase adulta, os carrapatos machos e fêmeas quando alimentados em hospedeiro suscetível exibem números significativamente maiores de transcritos (*p<0,001*) do que os adultos alimentados em hospedeiros resistentes (Tabela suplementar 33).

Inibidores da carboxipeptidase (IC)

Proteínas presentes nesta família foram identificadas e caracterizadas em carrapatos *R. bursa, R. sanguineus, H. longicornis e A. maculatum* (51, 75, 122-124). O IC de *R. bursa* é uma proteína fortemente restringida por ligações dissulfureto que mostra estimular a fibrinólise *in vitro* pela inibição da carboxipeptidase B do plasma, também conhecido como inibidor fibrinólise ativável por trombina (122).

Um grupo de 17 sequências que codificam para IC assembladas a partir de 508 reads foram obtidas do sialotranscriptoma de *R. microplus*. Destas, 13 CDS apresentaram peptídeo sinal indicando secreção. Sete CDS apresentaram melhores similaridades com sequências de *R. bursa*, no entanto 5 CDS apresentaram com *R. sanguineus*, além de 2 CDS para *H. longicornis*, 2 CDS para *I. scapularis* e 1 CDS para *Cupiennius Salei*, indicando assim a sua diversidade.

Em geral, esses representantes são significativamente mais expressos (*p <0,001*) em bibliotecas de RmS (Tabela 9). Com relação as análises dos transcritos por estágios de desenvolvimento do carrapato, estes representantes não apresentaram diferença significativa entre as bibliotecas larvas não alimentadas (LNARmS e LNARmR) bem como as bibliotecas de fêmeas (FSGRMS e FSGRmR). Já em relação as bibliotecas de ninfas (GSNRmS e GSNRmR) esses representantes são significativamente mais expressos em NRmS (*p<0,001*), o mesmo acontece com a biblioteca de machos que têm a expressão significativamente maior (*p<0,001*) para esses transcritos quando se alimentam nesses mesmos hospedeiros (Tabela suplementar 33). Assim, sugere-se que *R. microplus* pode usar esses representantes para promover os distúrbios da coagulação em seus hospedeiros, especialmente em hospedeiros suscetíveis.

Chimadanina

Tabela suplementar 2 revela 4 CDS assembladas a partir de 491 reads (3 CDS são sequências completas) codificando para um inibidor de trombina previamente identificado em *H. longicornis*, denominada chimadanina. Esta proteína pode desempenhar uma função durante obtenção de sangue pelos carrapatos, por apresentar função anticoagulante com atividade inibidora da trombina (125). Semelhante às outras famílias associadas à facilitação de obtenção de sangue, os transcritos desta também estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em bibliotecas de RmS (Tabela 9).

Em bibliotecas larvas não alimentadas não foram encontrados membros dessa família, já nos estágios de ninfas e adulto (machos e fêmeas) estes representantes são significativamente mais expressos ($p<0,001$) quando se alimentaram em hospedeiros suscetíveis (Tabela suplementar 33). Estes resultados sugerem que os carrapatos quando alimentados em hospedeiros suscetíveis produzem mais proteínas dessa família para facilitar o processo de refeição de sangue.

Proteína ligante de Fosfatidiletanolamina

Nesse sialotranscriptoma de *R. microplus* foi identificado 1 CDS assemblada de 31 reads associada com proteína ligante de fosfatidiletanolamina. Esta proteína pertence uma outra família associada com inibidores de serina protease (126) e tem sido encontrada em *A. maculatum* (75). Sua função ainda precisa ser determinada.

Tabela 8. Classificação funcional dos transcritos do sialotranscriptoma de *R. microplus* anotados na categoria secretadas.

Classes e famílias	Número de CDS	Número de reads	% total de reads*	Reads/CDS	Presente no proteoma?qual(is)?
Proteínas secretadas putativas					
DOMÍNIOS DE INIBIDORES DE PROTEINASE					
Domínio Kunitz					
Hexalaris	2	68	0,02	34	-
Pentalaris	4	136	0,05	34	-
Tetralaris	11	345	0,12	31,36	-
Trilaris	28	920	0,33	32,86	-
Bilaris	61	1.598	0,57	26,20	-
Monolaris	95	2.341	0,84	24,64	-
Total	201	5.408	1,94	26,91	
Domínio TIL (pode apresentar função antimicrobiana)	72	2.260	0,81	31,39	-
Domínio de Tiropinas	4	76	0,03	19,00	-
Cistatina	34	941	0,34	27,68	-
Serpina	15	954	0,34	63,60	SalivaS e R
Peptídeos contendo domínio Kazal	6	306	0,11	51,00	-
Inibidor de Carboxipeptidase (IC)	17	508	0,18	29,88	-
Chimadanina	4	491	0,18	122,75	-
Proteína ligante de Fosfatidiletanolamina	1	31	0,01	31,00	-
Outros inibidores de proteases	14	527	0,19	37,64	-
ENZIMAS					
PEPTIDASES SECRETADAS					
Metaloproteases da família reprolisina	115	5.686	2,04	49,44	-
Metaloprotease do tipo Neprilisina					

Família M13/Neprilisina	44	958	0,34	21,77	
Outras metaloproteases	13	339	0,12	26,08	-
Dipeptidil-peptidase /família M2	7	447	0,16	63,86	-
Serino proteases	74	5.494	1,97	74,24	GSMRmR e GSNRmR
Serino carboxypeptidases	25	544	0,20	21,76	-
Transglutaminase	4	455	0,16	113,75	-
Legumaina	5	149	0,05	29,80	-
Endopeptidases	7	216	0,08	30,86	GSFRmS
Catepsina (proteases contendo aspartil e cisteína)	4	103	0,04	25,75	GSNRmS
Outras peptidases	4	75	0,03	18,75	-
NUCLEASES SECRETADAS					
Deoxiribonuclease II	10	404	0,15	40,40	-
Ribonuclease específica para dsRNA	1	11	0,00	11,00	-
Ribonuclease, T2 family	2	22	0,01	11,00	-
Outras endonucleases	3	33	0,01	11,00	-
5' nucleotidase	14	572	0,21	40,86	-
LIPASES E ESTERASES	6	195	0,07	32,50	-
ESFINGOMIELINA FOSFODIESTERASE	2	18	0,01	9,00	-
GLICOSIDASES SECRETADAS	15	456	0,16	30,40	-
GALACTOSIDASE/FUCOSIDASE	15	1.012	0,36	67,47	GSMRmR e S; e GSNRmS
MUCINAS	215	21.301	7,65	99,07	GSMRmR e S
LIPOCALINAS/PROTEÍNAS LIGANTE DE HISTAINA/ P27	294	10.524	3,78	35,80	GSNRmR e S; e SalivaR e S
FAMÍLIA DO ANTÍGENO 5	18	1.879	0,68	104,39	GSFRmS, GSNRmS e GSMRmR
PEPTÍDEOS CONTENDO DOMÍNIO PROKINETICINA	3	20	0,01	6,67	-
PROTEÍNAS SECRETADAS ASSOSICADAS COM IMUNIDADE					

PEPTÍDEO ANTIMICROBIAL					
Defensina	22	944	0,34	42,91	-
Longicornsina	4	126	0,05	31,50	-
Hebreaina/ricinusina/microplusina	9	679	0,24	75,44	-
Inibidor de elastase de neutrófilo	5	528	0,19	105,60	SalivaR e GSNRmR
Outras proteínas intermediárias	13	281	0,10	21,62	-
Lisozima	3	32	0,01	10,67	-
PROTEÍNAS LIGANTES DE IMUNOGLOBULINA	12	2.810	1,01	234,17	GSMRmR e S
IMUNOSSUPRESSOR DAP-36	16	468	0,17	29,25	-
EVASINA	36	1.114	0,40	30,94	-
PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS					
Ixoderina/ficolina	11	277	0,10	25,18	-
ML - Niemann-Pick	13	305	0,11	23,46	-
PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DO CARRAPATO					
FAMÍLIA RICA EM GLICINA					
Proteínas semelhante a cutícula	14	357	0,13	25,50	-
Proteínas de cimento	49	27.527	9,89	561,78	GSFRmS; e GSMRmR e S
Elastina	5	243	0,09	48,60	-
Proteína de cola	5	217	0,08	43,40	-
Proteínas semelhantes à seda	2	45	0,02	22,50	-
Proteínas contendo repetições de GYG	10	145	0,05	14,50	-
Proteínas contendo repetições de GGY	11	311	0,11	28,27	-
Outras proteínas ricas em glicinas	84	12.590	4,52	149,88	GSNRmR e S; GSMRmR e S; e GSFRmS
SALP-15	3	88	0,03	29,33	-
SUPERFAMÍLIA DE CAUDA BÁSICA	23	801	0,29	34,83	-

SUPERFAMÍLIA DE CAUDA ÁCIDA	6	400	0,14	66,67	-
8.9 KDA	17	435	0,16	25,59	-
9.4 KDA	6	441	0,16	73,50	-
10 KDA	4	7.478	2,69	1.869,50	
SIMILAR *Rhipicephalus*					
Proteínas associadas ao R. microplus	243	11.045	3,97	45,45	GSMRmRe S; GSNRmR e S; e SalivaS
Proteínas associadas ao R. appendiculatus	113	5.089	1,83	45,04	GSMRmRe S; GSNRmR e S; e GSFRmS
SIMILAR Amblyomma					
Proteínas associadas ao Amblyoma maculatum	49	1.294	0,46	26,41	-
Proteínas associadas ao Amblyomma variegatum	6	101	0,04	16,83	-
Proteínas associadas ao Amblyomma americanum	6	86	0,03	14,33	-
SIMILAR Ixodes scapularis	12	918	0,33	76,50	GSNRmR e S; GSMRmS; e GSFRmS
SIMILAR Dermacentor andersoni	45	1.148	0,41	25,51	-
OUTRAS PROTEÍNAS SECRETADAS	43	1.409	0,51	32,77	GSFRmS e GSNRmS
OUTRAS PROTEÍNAS SECRETADAS NÃO CARACTERIZADAS	1.432	136.204	48,93	95,11	GSNRmR e S
Total	**3.600**	**278.351**			

*Associados com total de reads da categoria S.

Enzimas

Sequências contendo assinaturas de enzimas e possuindo sinal de secreção foram anotadas como enzimas secretadas. Estas representam 5% das reads anotadas como proteínas putativamente secretadas, totalizando 302 CDS. É importante notar que algumas enzimas listadas abaixo podem também ser associadas com a função constitutiva, assim, uma discussão mais detalhada dessas proteínas pode ser observada abaixo.

Protease

No presente sialotranscriptoma de *R. microplus*, as proteases secretadas representam a maioria das CDS que codificam para as enzimas, em consonância com o sialotranscriptoma de *A. maculatum* (75). Dessas, as metaloproteases representam a maior parte das sequências extraídas, totalizando 172 CDS derivados de 6.983 reads. As metaloproteases foram sub-classificados em (i) família reprolisina contendo 115 CDS assembladas de 5.686 reads, (ii) família neprilisinas contendo 44 CDS assembladas de 958 reads e outras metaloproteases contabilizando 13 CDS assembladas de 339 reads.

i) Metaloprotease do tipo reprolisina

Membros desta família têm sido encontrados em abundância nos sialotranscriptomas de diversos carrapatos (25, 65, 75, 127). Aqui, no sialotranscriptoma de *R. microplus* foram anotados transcritos que codificam para proteínas que contêm o domínio ZnMc_salivary_gland_MPs no banco de dados CDD, totalizando 115 CDS. Deste total, 33 CDS são sequências completas contendo um previsto peptídeo sinal indicativo de secreção. Outras 14 sequências incompletas também apresentam peptídeo sinal. Metaloproteases do tipo reprolisina foram identificados e caracterizados em saliva do carrapato *I. scapularis* como um potente inibidor da proliferação de células endoteliais e da angiogênese, além de outras atividades fibrinogenolítica (27, 65).

ii) Metaloprotease do tipo neprilisina

Este grupo é representado pela metaloprotease que apresenta motif peptidase_M13_N na base de dados PFAM, que desempenha um importante papel no na sinalização de peptídeo na superfície da célula (128, 129). As neprilisinas são ectopeptidases integrais de membrana de plasma do tipo II e, geralmente, não aparecem na

saliva de carrapato, por causa de um segmento hidrofóbico não clivado próximo ao NH2 terminal, que forma uma âncora de membrana (128, 130). A perda desses domínios de ancoragem de membrana leva à sua presença na saliva do carrapato. Em geral, estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de vários péptidos que regula a inflamação e o sistema imune (129), portanto, representam alvos terapêuticos em potenciais (128). Vinte e uma CDS, das 44 CDS, são sequências completas como mostrado na Tabela suplementar 2, mas apenas 2 (Rm-TB2-59318 e Rm-TB2-14440) dessas sequências possuem peptídeo sinal indicativo de secreção. Outras 4 CDS são sequências incompletas, mas também apresentam peptídeo sinal.

As metaloproteases do tipo reprolisina e neprilisina são expressas em todas as fases de desenvolvimento do carrapato (Tabela suplementar 33). Em relação as análises dos transcritos de acordo com origem de refeição sanguínea, estes representantes são significativamente mais expressos ($p<0,001$) em bibliotecas RmS (Tabela 9), principalmente em ninfas e machos (Tabela suplementar 33). Já em análises de transcritos oriundos das bibliotecas RmR, os níveis significativamente mais elevados de expressão foram encontrados em bibliotecas de LNARmR e GSFRmR (Tabela suplementar 34). Sugerimos que a presença dessas enzimas secretadas podem atuar na degradação de pepídeos inflamatórios e imunes dos hospedeiros.

Dipeptidil-peptidase / família de domínio M2

As enzimas presentes nesta família são chamadas de enzimas conversoras de angiotensina I devido à presença de domínio peptidase_M2 na base de dados PFAM. A enzima conversora da angiotensina é uma exopeptidase circulante que participa do sistema de renina-angiotensina, que medeia volume extracelular e está diretamente associada à vasoconstrição pela conversão da angiotensina I em um péptido ativo da angiotensina II. Em saliva de *I. scapularis*, estes componentes têm sido envolvidos na degradação da bradicinina (131), favorecendo a vasoconstrição, uma vez que a bradicinina causa a vasodilatação.

Membros desta família foram identificados no presente sialotranscriptoma de *R. microplus,* totalizando 7 CDS assembladas a partir de 447 reads apresentando melhor correspondencia a *I. scapularis* em bancos de dados NR-NCBI. Três CDS são sequências completas e duas (Rm-nr-105343 e Rm-nr-105362) possuem peptídeo sinal indicativo de secreção. Novamente, semelhante que acontece nas famílias de metaloproteases, os

transritos desta família também estão significativamente mais expressos em RmS (Tabela 9), principalmente em carrapatos machos (Tabela suplementar 33).

Serino proteases

Estas enzimas semelhantes à tripsina foram abundantemente encontradas em sialotranscriptomas de artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos (25, 53, 75). Essas enzimas participam da inflamação ou da inibição da coagulação sanguínea, afetando a proteína C reativa ou vias de fibrinólise em seus hospedeiros (25, 132). Membros desta família, recuperados no presente estudo, foram anotados em 74 CDS assemblados de 5.494 reads. Quarenta e quatro CDS são sequências completas, destas, 33 CDS possuem peptídeo sinal indicativo de secreção. Embora transcritos dessa família são significativamente mais expressos nas bibliotecas RmR (Tabela 9), os MRmS expressam significativamente mais transcritos ($p<0,001$) em relação aos MRmR (Tabela suplementar 33). Em adição, proteínas dessa família foram identificadas também nos proteomas de GSNRmR e GSMRmR, portanto, no geral, estas enzimas são importantes durante toda a infestação independentemente da origem da refeição de sangue do carrapato, se em hospedeiro resistente ou suscetível.

Serina carboxipeptidases

As serina carboxipeptidases são caracterizadas pela presença do domínio Peptidase_S10 na base de dados PFAM. Esta enzima foi identificada no intestino do carrapato *H. longicornis* e sua expressão foi aumentada durante a obtenção de sangue. Esta enzima pode se lozalizada em vacúolos lisossomais e na superfície de células epiteliais. Em ensaios funcionais enzimáticos esta enzima revelou eficientemente hidrolisar substratos sintéticos específicos para a catepsina A e tiol-proteases. Além disso, esta enzima foi associada com a clivagem de hemoglobina, um dos principais componentes da alimentação sanguínea (133). Portanto, esta pode desempenhar um papel importante na digestão de sangue do hospedeiro.

Aqui, foram recuperadas 25 CDS apresentando similaridade para esta família de enzimas, destas, 10 CDS são sequências completas e 5 CDS apresentam peptídeo sinal indicativo de secreção. Representantes desta família estão igualmente distribuídos entre as bibliotecas de RmR e RmS (Tabela 9). Em adição, estes estão presentes em todas as fases de desenvolvimento do carrapato (Tabelas suplementares 34 e 35).

Transglutaminase

Tabela suplementar 2 exibe 4 CDS assembladas a partir de 455 reads anotadas como transglutaminase. O papel dessa enzima ainda não está claro em carrapatos, mas sugerem que pode participar na coagulação do sangue e do sistema de fibrinólise, através do fator XIII ou na estabilização da fibrina (134, 135). Esses representantes são significativamente mais expressos em bibliotecas RmR (Tabela 9), especialmente em bibliotecas de LNARmR e GSFRmR (Tabela suplementar 33). Nota-se nas bibliotecas de carrapatos machos que a expressão dos transcritos estão significativamente maiores em relação aos outros estágios de desenvolvimento, e este aumento é independente da origem de refeição sanguínea (Tabelas suplementares 34 e 35). Assim, os resultados sugerem que esses membros podem ajudar o carrapato durante a refeição de sangue, e novamente os resultados apontam que os carrapatos machos são os principais responsáveis por isso.

Legumaína

Legumaínas são endopeptidases asparaginilo pertencente ao clã CD (peptidase_C13) da família da cisteína protease e são comumente encontrados no trato digestivo do carrapato e, geralmente, a expressão é aumentada durante processo de alimentação de sangue. Sua função geralmente está associada como processo hemoglobinólise (136-139). No presente trabalho, 5 CDS assemblados de 149 reads foram anotadas à esta família da legumaina. As sequências Rm-n-117561, Rm-n-20455 e Rm-n-112512 são sequências completas. Esses representantes estão igualmente expressos em bibliotecas de RmR e RmS (Tabela 9). Em relação as análises de acordo com estágio de desenvolvimento, estes representantes são significativamente mais expressos em carrapatos machos, independentemente da origem de alimentação de sangue (Tabelas suplementares 33-35). Assim, estes podem ser críticos para o processo final de digestão de componentes sangíneos obtidos pelos carrapatos.

Além disso, 4 CDS para catepsina (aspartil e cisteína proteases) também foram encontradas em *R. microplus,* apresentando peptídeo sinal indicativo de secreção. No entanto, estas proteínas podem ser destinadas para o lisossoma. Outras 11 CDS foram encontradas e anotadas como peptidase ou endopeptidase.

Endonucleases

No presente sialotranscriptoma de *R. microplus* foram recuperadas 16 CDS para as endonucleases assemblados a partir de 470 reads. Destas, 10 CDS anotadas como desoxirribonuclease II, incluindo 4 sequências completas contendo peptídeo sinal indicativo de secreção. Constatou-se também três CDS para ribonuclease, tal como T2 e ribonuclease específico para dsRNA. Estas endonucleases foram encontradas em diversos artrópodes, incluindo carrapatos (25, 56, 75, 140-142). Em adição, membro desta família também foi recuperado no proteoma de GSFRmS. Em geral, a desoxirribonuclease e ribonuclease estão envolvidas no metabolismo de nucleótidos por hidrolisar as ligações de desoxirribonucleótidos no DNA nativo e desnaturado, e catalisar a degradação de RNA em componentes menores, respectivamente.

Aqui, estes representantes estão presentes em carrapatos independente da origem de refeição sanguínea, apresentando diferença significativa entre as bibliotecas nas famílias de desoxirribonuclease II, T2 e em outras endonucleases. Os transcritos associados à desoxirribonuclease II estão significativamente mais expressos nas bibliotecas RmS, enquanto que as outras duas famílias estão em bibliotecas RmR (Tabela 9). Assim, sugerimos que estas endonucleases podem ajudar os carrapatos durante à sua fixação, por reduzir a viscosidade e laceração da lesão de alimentação na pele do hospedeiro, além de produzir nucleotídeos antiinflamatórios e, possivelmente, também podem afetar a formação de NET pelos neutrófilos (do inglês, neutrophil extracellular trap), mas esta situação ainda não está esclarecida em carrapato (142, 143).

5' nucleotidase / apirase

Membros da família 5'-nucleotidase, as apirases têm sido comumente identificadas em glândulas salivares de vários artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos (75, 144-146). No sialotranscriptoma de *R. microplus* exibe 14 CDS assembladas de 572 reads e anotadas como membros da família 5' nucleotidase, incluindo 4 CDS completas contendo peptídeo sinal indicativo de secreção.

Estes representantes estão similaridade expressos em bibliotecas de RmR e RmS (Tabela 9) e estão abundantemente expressos no estágio adulto - macho e fêmea (Tabelas suplementares 34 e 35). Estas apirases apresentam atividades antiinflamatória e antihemostática por hidrólise de ATP e ADP libertado pelas células que sofreram lesão,

plaquetas e neutrófilos para produzir AMP e fosfato inorgânico, favorecendo a inflamação e a agregação de plaquetas (25, 146-149). Portanto, esses representantes podem ser essenciais para o carrapato controlar as respostas inflamatória e hemostática de seus hospedeiros.

Lipases / esterases / esfingomielinas

As lipases são enzimas que pertencem a subclasse das esterases, que são fundamentais no metabolismo lipídico. Além disso, algumas lipases são secretadas por agentes patogénicos para facilitar a infecção (150) e também estas enzimas podem afetar a resposta inflamatória e imune do hospedeiro, por interferir em vias de sinalização. Estas enzimas têm sido encontradas em carrapatos (75, 151). Aqui, seis CDS para lipase foram anotadas a partir de 195 reads, sendo 3 CDS são sequências completas contendo peptídeo sinal indicativo de secreção. Além disso, 2 sequências completas associadas à esfingomielina fosfodiesterase assembladas de 18 reads também foram recuperadas do sialotranscriptoma. Ambas as famílias estão significativamente mais expressa ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) em bibliotecas RmR (Tabela 9). Esses representantes, basicamente, estão presentes em carrapatos machos (Tabela suplementar 33). Assim, novamente os carrapatos machos podem ser fundamental para modular importantes respostas de seus hospedeiros.

Glicosidases

O sialotranscriptoma de *R. microplus* revelou 15 CDS assembladas de 456 reads apresentando domínio de quitinase em diversos banco de dados. Três destas CDS são sequências completas, incluindo peptídeo sinal indicativo de secreção. Estas quitinases são enzimas hidrolíticas que quebram ligações glicosídicas em quitina e também têm atividade no sangue. À medida que a quitina é um componente da parede das células e elementos de exoesqueletos de alguns agentes patogénicos, que por sua vez podem estar presentes na circulação sanguínea dos hospedeiros do carrapato, estas glicosidases podem desempenham importante função na proteção do carrapato contra a invasão de agentes patogénicos, tornando estes representantes úteis para compor futura vacina anticarrapatos (152). Além disso, as proteínas contendo domínio de ligação à quitina desempenham importante papel na lubrificação das partes bucais dos carrapatos e na adesão da matriz

extracelular (53). Assim, as quitinases também podem participar do recrutamento e ativação de basófilos (153, 154).

Esses representantes estão expressos entre nas bibliotecas de RmR e RmS (Tabela 9). Além disso, esses estão abundantemente expressos em carrapatos machos independentemente da origem de refeição sanguínea (Tabelas suplementares 34 e 35). Em análise comparativa usando bibliotecas de carrapatos machos, os transcritos dessa família estão significativamente mais expressos (*p<0,001*) em MRmS (Tabela suplementar 33).

Galactosidase / fucosidase

Quinze CDS assembladas a partir de 1.012 reads codificando para galactosidase ou fucosidase foram anotadas no sialotranscriptoma de *R. microplus*, sendo 6 CDS como sequências completas, incluindo pepitídeo sinal indicativo de secreção. Em adição, membros dessa família foram identificados nos proteomas de GSMRmR, GSMRmS e GSNRmS, e geralmente estão associados com o metabolismo de carboidratos. Portanto, estas enzimas podem executar várias funções, e em carrapatos podem quebrar a matriz da pele dos hospedeiros, além de participar do balanço de glicosilação e sialilação do fragmento constante das imunoglobulinas G alterando drasticamente as atividades pró e antiinflamatórias destas IgGs, por alterar a afinidade de ligação ao receptor Fc (155, 156).

Estes representativos estão significativamente mais expressos (*p<0,001*) em bibliotecas de RmR (Tabela 6), particularmente em larvas não alimentadas, ninfas e machos (Tabela suplementar 33). Nesse sentido, esses representantes podem estar sendo usados pelos carrapatos para ajudar na modulação da resposta imune humoral de seus hospedeiros, principalmente em carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes.

Mucinas / Peritrofina

Duzentos e quinze CDS foram extraídas a partir de 21.301 reads provenientes do sialotranscriptoma de *R. microplus* e anotadas como mucinas. Destas, 97 CDS são sequências completas, incluindo peptídeo sinal indicativo de secreção. Outras 40 CDS apresentaram peptídeo sinal. Em adição, membros dessa família também foram encontrados nos proteomas de GSMRmR e GSMRmS.

Estas são caracterizadas como proteínas ricas em serina/treonina contendo grande número de sítios de possíveis glicosilação (NetOGlyc) e são geralmente encontradas em tecidos da mucosa. Estas proteínas foram encontradas em sialotranscriptomas de carrapatos

(51, 75) e possuem importante função na imunidade, por agir na prevenção e proteção contra patogénios (143, 146). Esses representantes estão significativamente mais expressos em todas as fases de desenvolvimento do RmR (Tabela suplementar 33). Em complemento, estes estão abundantemente mais expressos em carrapatos machos (Tabelas suplementares 34 e 35).

Lipocalina

Vários membros da família das lipocalinas foram abundantemente encontrados em glândulas salivares de artrópodes hematófagos, incluindo carrapatos duros e moles (51, 53, 57, 93, 157). Aqui, foram recuperadas 294 CDS deduzidas de 10.524 reads apresentando melhor similaridade com proteínas da família das lipocalinas, como proteína P27, proteína ligante de histamina e serotonina, entre outras lipocalinas. Destas, 143 CDS são sequências completas contendo peptídeo sinal indicativo de secreção. Outras 56 sequências completas não apresentaram peptídeo sinal. Além disso, membros dessa importante família também foram recuperados dos proteomas de GSNRmR, GSNRmS, SalivaR e SalivaS.

É conhecido que histamina e serotonina são importantes mediadores da inflamação e hemostasia e podem ser críticos para o ingurgitamento dos fêmeas e para transmissão de *Borrelia burgdorferi*, agente causador da doença de lyme (158). Além disso, a resistência dos bovinos ao *R. microplus* pode estar associado com a quantidade total de histamina na pele de bovinos (159). Para intervir de forma eficaz as respostas eficientes dos hospedeiros, os carrapatos produzem proteínas que bloqueam estes mediadores (160). Outras funções, como anticoagulante (161), anticomplemento (162), regulação da hemostasia e inflamação por catalizadores de aminas biogênicas (163), ADP (164), tromboxane A2 e leucotrienos (165, 166) também estão associados com membros dessa família.

Cinquenta e quatro sequências completas associadas com proteína ligante de histamina contendo domínio de ligação em histamina (His-binding) nas bases de dados CDD e Pfam e 1 sequências de lipocalina de alta afinidade para serotonina e histamina (SHBP) (160) foram utilizadas para realizar uma análise filogenética (Figura 4). A filogênia indica a diversidade das lipocalinas que podem desempenhar funções semelhantes. As sequências foram agrupadas em 10 diferentes clados (grupos de I-X), definidos por proteínas pertencentes ao clado com > 59% de suporte de *bootstrap*. Note-se que a análise inclui proteínas que são muito semelhantes umas as outras, bem como

proteínas que são muito diferentes entre si. Além disso, lipocalinas de *R. microplus* presentes nesta análise são muito divergentes da sequências de SHBP do carrapato *D. reticulatus*, mas podem apresentar função semelhante. Em geral, esta abundância de sequências presentes no mesmo clado pode representar duplicação gênica, sendo expressas em diferentes momentos do parasitismo, conforme necessidade dos carrapatos.

Esses representantes estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em bibliotecas RmS (Tabela 9). Nas bibliotecas de larvas não alimentadas, esses representantes estão significativamente mais expressos em LNARmR ($p<0,001$), enquanto que nos estágios de ninfa, macho e fêmeas esses representantes estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em RmS (Tabela suplementar 33). Em geral, membros desta família estão presentes em todas as fases de desenvolvimento de carrapato, independentemente da origem de refeição sanguínea (Tabelas suplementares 34 e 35). Assim, devido ao fato de que o *R. microplus* permanece fixados em seus hospedeiros por algumas semanas, a diversidade e a quantidade destas lipocalinas podem refletir na adaptação em seus hospedeiro para uma eficiente e completa refeição sanguínea.

Peptídeos contendo domínio prokineticina

Três sequências completas codificando para peptídeos contendo domínio prokineticina foram deduzidas do sialotanscriptoma de *R. microplus* contendo domínio prokineticina na base de dados PFAM. Embora essas proteínas não apresentam funções conhecida em carrapatos, sabe-se que pertencem à mesma família das proteínas do veneno da cobra mamba preta que induzir a contracção do músculo liso (167). Representantes desta família são expressas basicamente nas bibliotecas RmR (Tabela 9), mais precisamente na biblioteca de macho (Tabela suplementar 33).

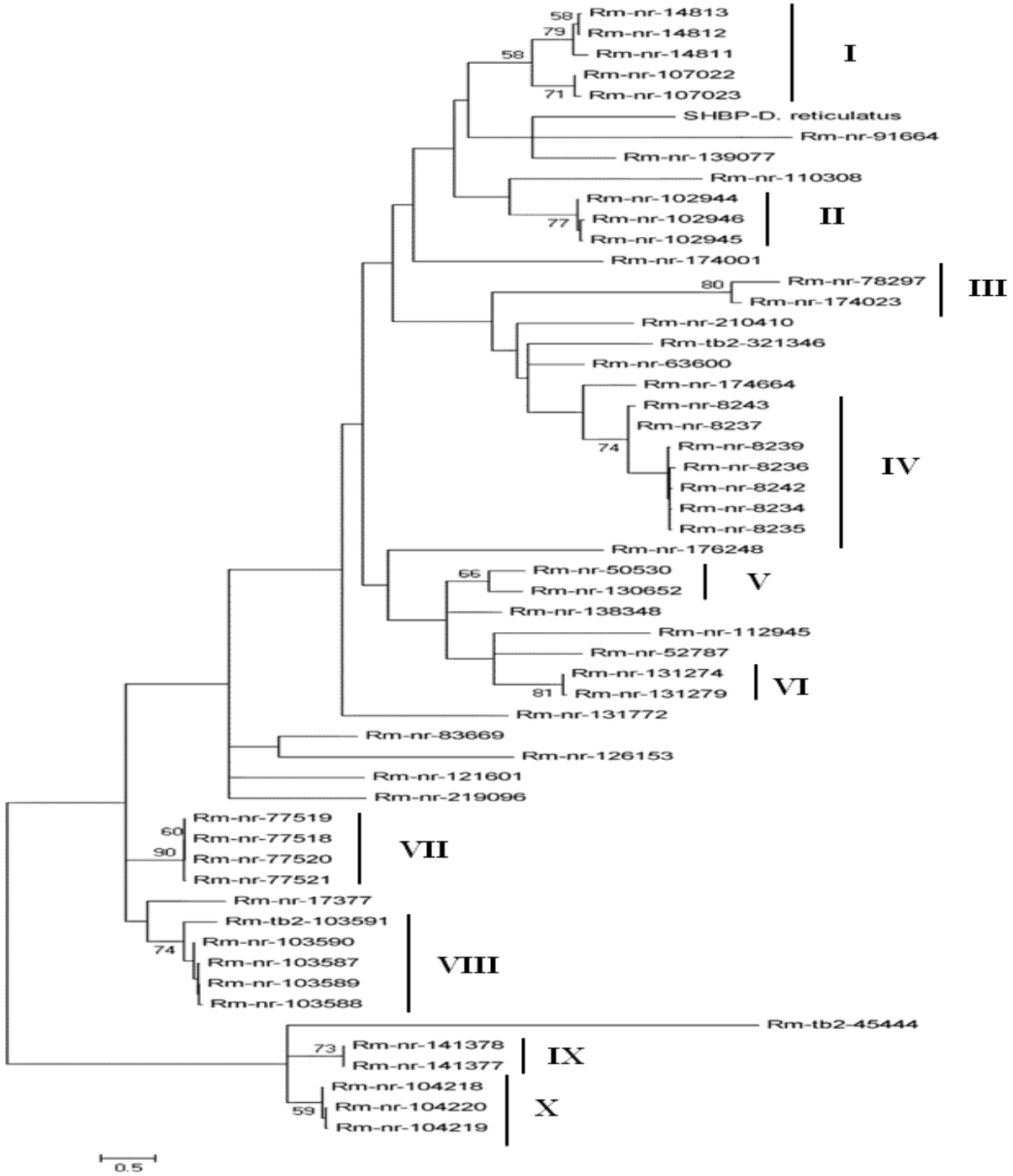


Figura 4. Análise filogenética de proteínas ligantes de histamina em *R. microplus*. Filograma *bootstrapped* (1.000 interações) resultando do alinhamento de 54 sequências completas contendo peptídeo sinal, bem como 1 sequência de SHBP (do inglês, serotonin histamine binding protein) (gi | 18032205) previamente caracterizadas e depositadas nas bases de dados do NCBI. Os números sobre os nós indicam o suporte do *bootstrap*, e a barra na parte inferior indica 50% de divergência de aminoácido. As clades maiores de 59% de suporte de *bootstrap* são indicadas por números romanos.

Tabela 9. Representação dos transcritos de *R. microplus* de acordo com a origem de alimentação sanguínea, se em hospedeiros geneticamente resistentes ou suscetíveis.

Família	N° de reads das bibliotecas de RmR		N° de reads das bibliotecas de RmS		P<0,05?
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Proteínas constitutivas					
PRODUTOS ASSOCIADOS COM IMUNIDADE					
Proteína ligante de Imunoglobulina G	2390	2030,421	1405	1764,579	Sim
Similar a fator de inibição de migração de macrófago	135	140,712	128	122,288	
Similar à proteína associada com interferon	122	130,011	121	112,989	
Receptores Toll-like	27	64,738	94	56,262	Sim
Alfa-2-macroglobulina	58	47,617	31	41,383	Sim
Outras proteínas associadas com imunidade	541	463,867	326	403,133	Sim
PEPTIDASES					
Catepsina (proteases contendo aspartil e cisteína)	212	196,889	156	171,111	
Calpaína	37	21,936	4	19,064	Sim
Aminopeptidase	74	66,878	51	58,122	
Protease de membrana	45	119,846	179	104,154	Sim
Peptidase - peptídeo sinal	117	89,884	51	78,116	Sim
Carboxipeptidase	114	176,023	215	152,977	Sim
Outras peptidases	154	131,616	92	114,384	Sim
MAQUINARIA DE EXPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS	5729	5957,507	5406	5177,493	Sim
CITOESQUELETO	9959	7990,068	4975	6943,932	Sim
DESINTOXICAÇÃO					
Sulfotransferases	242	235,946	199	205,054	
Glutationa transferase	235	156,227	57	135,773	Sim
Dehidrogenases	183	146,597	91	127,403	Sim
O-Metil transferases	11	9,630	7	8,370	
Transportadores para resistência a múltiplas drogas	43	37,987	28	33,013	
Desintoxicação oxidativo					
Citocromo P450	335	277,678	184	241,322	Sim
Catalase	68	61,528	47	53,472	
Superóxido dismutase	34	24,076	11	20,924	Sim
Selenoproteínas	113	100,585	75	87,415	
MATRIZ EXTRACELULAR E ADESÃO	15265	10046,170	3512	8730,830	Sim
METABOLISMO					
Amino ácido	1834	1682,655	1311	1462,345	Sim
Carboidrato	2263	2051,822	1572	1783,178	Sim
Energia	8312	25258,009	38897	21950,991	Sim
Intermediária	459	445,676	374	387,324	
Lipídeo	2318	1976,383	1376	1717,617	Sim
Nucleotídeo	1637	1483,090	1135	1288,910	Sim

EXPORTAÇÃO NUCLEAR	337	255,742	141	222,258	Sim
REGULAÇÃO NUCLEAR	2610	2478,772	2023	2154,228	Sim
MAQUINARIA DE MODIFICAÇÃO PROTEÍCA	6348	6355,030	5530	5522,970	
MAQUINARIA DE PROTEASSOMA	2467	2815,838	2796	2447,162	Sim
MAQUINARIA DE SÍNTESE PROTEÍCA	15608	16143,318	14565	14029,682	Sim
TRANSDUÇÃO DE SINAL	12204	10399,822	7234	9038,178	Sim
Similar para proteína associada com apoptose	681	1107,502	1389	962,498	Sim
FATOR DE TRANSCRIÇÃO	3091	2813,163	2167	2444,837	Sim
MAQUINARIA DE TRANSCRIÇÃO	18013	13950,785	8062	12124,215	Sim
TRANSPORTADORES E ARMAZENAGEM	5939	4797,037	3027	4168,963	Sim
PROTEÍNAS CONSERVADAS DESCONHECIDAS	56991	40837,411	19337	35490,589	Sim
PROTEÍNAS CONSERVADAS SECRETADAS DESCONHECIDAS	542	774,717	906	673,283	Sim
Proteínas secretadas putativas					
DOMÍNIOS DE INIBIDORES DE PROTEINASE					
Domínio Kunitz					
Hexalaris	51	36,382	17	31,618	Sim
Pentalaris	90	72,763	46	63,237	Sim
Tetralaris	178	184,584	167	160,416	
Trilaris	284	492,223	636	427,777	Sim
Bilaris	707	854,970	891	743,030	Sim
Monolaris	795	1252,494	1546	1088,506	Sim
Domínio TIL (pode apresentar função antimicrobiana)	1237	1209,157	1023	1050,843	
Domínio de Tiropinas	73	40,662	3	35,338	Sim
Cistatina	464	503,459	477	437,541	Sim
Serpina	663	510,414	291	443,586	Sim
Peptídeos contendo domínio Kazal	116	163,718	190	142,282	Sim
Inibidor de Carboxipeptidase	113	271,793	395	236,207	Sim
Chimadanina	71	262,697	420	228,303	Sim
Proteína ligante de Fosfatidiletanolamina	24	16,586	7	14,414	Sim
Outros inibidores de proteases	254	281,958	273	245,042	Sim
ENZIMAS					
PEPTIDASES SECRETADAS					
Metaloproteases da família reprolisina	2540	3042,154	3146	2643,846	Sim
Metaloprotease do tipo Neprilisina					
Família M13/Neprilisina	439	512,554	519	445,446	Sim
Outras metaloproteases	187	181,374	152	157,626	
Dipeptidil-peptidase /família M2	212	239,156	235	207,844	Sim
Serina proteases	3809	2939,429	1685	2554,571	Sim
Serina carboxypeptidases	282	291,054	262	252,946	
Transglutaminase	327	243,437	128	211,563	Sim
Legumaina	81	79,719	68	69,281	
Endopeptidases	92	115,565	124	100,435	Sim
Catepsina (proteases contendo aspartil e cisteína)	73	55,108	30	47,892	Sim
Outras peptidases	52	40,127	23	34,873	Sim

NUCLEASES SECRETADAS					
Deoxiribonuclease II	119	216,150	285	187,850	Sim
Ribonuclease específica para dsRNA	9	5,885	2	5,115	
Ribonuclease, T2 family	17	11,771	5	10,229	Sim
Outras endonucleases	29	17,656	4	15,344	Sim
5' nucleotidase	291	306,034	281	265,966	
LIPASES E ESTERASES	118	104,330	77	90,670	Sim
ESFINGOMIELINA FOSFODIESTERASE	14	9,630	4	8,370	Sim
GLICOSIDASES SECRETADAS	251	243,972	205	212,028	
GALACTOSIDASE/FUCOSIDASE	841	541,446	171	470,554	Sim
MUCINAS	17423	11396,574	3878	9904,426	Sim
LIPOCALINAS/PROTEÍNAS LIGANTE DE HISTAINA/ P27	3153	5630,606	7371	4893,394	Sim
FAMÍLIA DO ANTÍGENO 5	1014	1005,313	865	873,687	
PEPTÍDEOS CONTENDO DOMÍNIO PROKINETICINA	19	10,701	1	9,299	Sim
PROTEÍNAS SECRETADAS ASSOSICADAS COM IMUNIDADE					
PEPTÍDEO ANTIMICROBIAL					
Defensina	497	505,064	447	438,936	
Longicornsina	54	67,413	72	58,587	Sim
Hebreaina/ricinusina/microplusina	360	363,282	319	315,718	
Inibidor de elastase de neutrófilo	265	282,493	263	245,507	
Outras proteínas intermediárias	238	150,342	43	130,658	Sim
Lisozima	25	17,121	7	14,879	Sim
PROTEÍNAS LIGANTES DE IMUNOGLOBULINA	2261	1503,421	549	1306,579	Sim
IMUNOSSUPRESSOR DAP-36	132	250,392	336	217,608	Sim
EVASINA	429	596,018	685	517,982	Sim
PROTEÍNAS ASSOCIADAS COM RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS					
Ixoderina/ficolina	137	148,202	140	128,798	
ML - Niemann-Pick	189	163,183	116	141,817	Sim
PROTEÍNAS ESPECÍFICAS DO CARRAPATO					
FAMÍLIA RICA EM GLICINA					
Proteínas semelhante a cutícula	310	191,004	47	165,996	Sim
Proteínas de cimento	24452	14727,641	3075	12799,359	Sim
Elastina	210	130,011	33	112,989	Sim
Proteína de cola	142	116,100	75	100,900	Sim
Proteínas semelhante à seda	32	24,076	13	20,924	Sim
Proteínas contendo repetições de GYG	138	77,579	7	67,421	Sim
Proteínas contendo repetições de GGY	195	166,393	116	144,607	Sim
Outras proteínas ricas em glicinas	10010	6735,969	2580	5854,031	Sim
SALP-15	43	47,082	45	40,918	
SUPERFAMÍLIA DE CAUDA BÁSICA	360	428,555	441	372,445	Sim
SUPERFAMÍLIA DE CAUDA ÁCIDA	103	214,010	297	185,990	Sim
8.9 KDA	109	232,736	326	202,264	Sim
9.4 KDA	59	235,946	382	205,054	Sim

10 KDA	7098	4000,919	380	3477,081	Sim
SIMILAR *Rhipicephalus*					
Proteínas associadas ao R. microplus	5626	5909,354	5419	5135,646	Sim
Proteínas associadas ao R. appendiculatus	3401	2722,744	1688	2366,256	Sim
SIMILAR Amblyomma					
Proteínas associadas ao Amblyoma maculatum	674	692,323	620	601,677	
Proteínas associadas ao Amblyomma variegatum	52	54,038	49	46,962	
Proteínas associadas ao Amblyomma americanum	27	46,012	59	39,988	Sim
SIMILAR Ixodes scapularis	677	491,153	241	426,847	Sim
SIMILAR Dermacentor andersoni	470	614,209	678	533,791	Sim
OUTRAS PROTEÍNAS SECRETADAS	900	753,851	509	655,149	Sim
OUTRAS PROTEÍNAS SECRETADAS NÃO CARACTERIZADAS	99485	72872,586	36719	63331,414	Sim
Proteínas desconhecidas	115622	177488,222	216116	154249,778	Sim
Elemento transponível					
Classe I	6227	5071,505	3252	4407,495	Sim
Classe II	1049	1014,943	848	882,057	
Outros fragmentos	1816	1478,275	947	1284,725	Sim
Proteínas virais	199	153,017	87	132,983	Sim

Testes de chiquadrado foram realizados para comparar o nível de significância entre as famílias das bibliotecas de RmR e RmS. O valor $p<0,05$ foi usado para estabilizar o nível de significância.

Proteínas secretadas assosicadas com imunidade

Análise do sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus* revelou várias CDS associadas a importantes moléculas farmacológicas bioativas envolvidas na proteção do carrapatos, tais como peptídeos antimicrobianos (PAMs), PLIgGs, evasinas, imunossupressores e outros (168-171). A Tabela suplementar 2 mostra aproximadamente 152 CDS para PAMs extraídas de 6.502 reads, destas, 73 CDS são sequências completas apresentando peptídeo sinal indicativo de secreção. Estas proteínas foram distribuídas em 8 famílias, denominados: família da hebreaina/microplusina/ricinusina, defensina, longicornsina, lisozima, ixoderina/ficolina, contendo domínio ML, antígeno 5 e proteínas contendo domínio de inibidor semelhante à tripsina (TIL).

Em análises comparativa entre bibliotecas de RmS e RmR (Tabela 9), das 8 famílias anotadas, apenas três família (longicornsina, lisozima e proteínas contendo domínio ML) estão diferencialmente expressas ($p=0,01$, $p=0,005$ e $p=0,003$, respectivamente). Portanto, estes resultados sugerem que os PAMs são importantes para a

proteção dos carrapatos independente da fonte de alimentação sanguínea (172). Segue abaixo uma discussão detalhada sobre essas famílias de transcritos.

Hebreaina / microplusina / ricinusina

Família representada por 9 CDS assembladas a partir de 679 reads, e a maior parte delas (8 CDS) possuem peptídeo sinal indicativo da secreção. Os PAMs desta família estão sempre presentes durante todas as fases de desenvolvimento do carrapato, independente da origem refeição de sangue (Tabela adicionai 33), porém com uma maior expressão em carrapatos machos (Tabelas suplementares 34 e 35). Os membros da família da microplusina foram caracterizados como peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína com regiões ricas em histidina no N e C terminal. Estes componentes são conhecidos por atuar na defesa do carrapato contra patógenos (173, 174).

Defensina e longicornsina

Vinte e duas CDS extraídas de 944 reads foram anotadas como defensinas. Análise adicional revelou que 18 CDS são sequências completas e 13 CDS possuem peptídeo sinal indicativo da secreção. Outras 4 CDS anotadas como proteínas semelhantes as defensinas, denominadas como proteínas longicornsinas, apresentando melhor similaridade com *H. longicornis*. Estas proteínas mostraram forte atividade antimicrobiana contra microrganismos resistentes às drogas (175). Membros das defensinas estão sendo produzidos constantemente por carrapatos independentes da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 33). Nas comparações entre as bibliotecas de carrapatos machos (Tabelas suplementares 34 e 35), mostram que a expressão das defensinas é maior ($p<0,001$) em MRmS. Já as longicornsinas estão expressas apenas por carrapatos machos (Tabelas suplementares 33, 34 e 35), no entanto, há uma diferença significante ($p<0,001$) entre as bibliotecas de GSMRmS e GSMRmR, na qual os MRmS apresentam uma maior expressão desses constituintes (Tabela suplementar 33).

Lisozima

Três CDS extraídas de 32 reads representam esta família. Estas podem ser produzidas por vários organismos, incluindo os carrapatos (176), e são capazes de digerir certos carboidratos de alto peso molecular. Este processo inclui a hidrólise de ligações 1,4 beta glicosídicas entre os resíduos de ácido N-acetilmurâmico (Mur2Ac) e N-acetil-D-

glucosamina (GlcNAc) em peptidoglicanos, consequentemente destroem à camada de protecção de várias bactérias, por isso, estes são considerados importantes PAMs (177). Em *R. microplus*, esses transcritos são produzidas em abundância por carrapatos machos (Tabela suplementar 33) independente da origem de refeição sanguínea (Tabelas suplementares 34 e 35).

Ixoderina / ficolina (proteínas contendo domínos ML e fibrinogênio)

Outras 24 CDS extraídas de 582 reads também foram associadas à classe de proteínas de reconhecimento de patógenos, como a famíla ixoderina / ficolina contendo domínio fibrinogênio (11 CDS assembladas de 277 reads, sendo 6 sequências completas incluindo peptídeo sinal indicativo de secreção) e família de proteína contendo domínio ML (13 CDS assembladas de 305 reads, destas 7 são sequências completas). O domínio ML está relacionado com a estrutura de reconhecimento de lipídio MD-2 que compõe o receptor do tipo Toll na imunidade inata. Este domínio é rico em estruturas beta pregadas, o que pode ajudar na sua função de interagir com os lipídios (178). Em adição, estes representantes também podem participar da imunidade do carrapato (179-181).

Em análises comparativas, representantes dessas famílias estão presentes em todas as fases de desenvolvimento do carrapato (Tabela suplementar 33) e novamente a expressão está em abundância nas bibliotecas de carrapatos machos (GSMRmR e GSMRmS) (Tabelas suplementares 34 e 35). Em adição, os membros da família ML estão significativamente mais expressos em MRmR (Tabela suplementar 33).

Antígeno-5 (Antígeno 5/CRISP/CAP)

Tabela suplementar 2 exibe 18 CDS assembladas de 1.879 reads codificando para proteínas semelhantes à veneno de vespa, chamado de antígeno-5. Seis CDS são sequências completas, incluindo peptídeo sinal indicativo de secreção. Em adição, membros dessa família foram recuperados dos proteomas de GSFRmS, GSNRmS e GSMRmR. Estas proteínas são encontradas em veneno de vespa, bem como em vários artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos (23, 25, 53, 56). Em relação à superfamília CAP, a qual compreende as famílias de antígeno-5, proteína secretada ricas em cisteínas CRISP (do inglês, cysteine rich secretory protein) e a família 1 associada à patógeno (182), apresentam diversas funções. Em plantas, os membros desta família apresentam atividades antimicrobianas (183, 184). Estes representantes estão presentes em

todas as fases de desenvolvimento do carrapato, e sua expressão independe da origem de refeição sanguínea (Tabelas suplementares 33, 34 e 35).

Proteínas contendo domínio de inibidor semelhante a tripsina (TIL)

Muitos inibidores de proteases podem exercer função antimicrobiana (185), por possuirem 10 cisteínas que formam 5 ligações dissulfureto, caracterizando o domínio TIL. Membros dessa importante família têm sido encontrados em sialomas e sialotranscriptomas, incluindo em *R. microplus* (75, 186, 187). Exemplo de proteína apresentando atividade antimicrobiana contendo domínio TIL é o inibidor da subtilisina encontrado e caracterizado previamente em *R. microplus* (187). Nossa análise revelou 72 CDS para PAMs ricos em cisteína extraídas de 2.260 reads. Destas, 32 CDS são sequências completas incluindo pepídeo sinal, além de 20 sequências incompletas que também apresentam peptídeo sinal, portanto, estes resultados sugerem que essas proteínas podem estar presentes na saliva carrapato.

Representantes dessa família estão presentes durante todo os estágios de desenvolvimento do carrapato, independentemente da origem de refeição sanguínea (Tabela suplementar 33). A presença desses representantes em todos os estágios pode ser possivelmente devido ao grande período que os carrapatos permanecem fixados em seus hospedeiros até completar eficientemente o completo repasto sanguíneo. Em adição, como acontece em outras famílias, esses representantes estão significativamente mais expressos em carrapatos machos do que em outros estágios de desenvolvimento de carrapato (Tabelas suplementares 34 e 35), especialmente em MRmS (Tabela suplementar 33). Esta maior expressão por carrapatos machos pode ser importante para sua proteção, bem como para proteger a fêmea durante o repasto sanguíneo. Esta hipótese é suportada pelo fato de que os transcritos que codificando para os PAMs são expressos em baixa quantidade em bibliotecas de fêmeas.

A fim de demonstrar a diversidade entre os PAMs da saliva de *R. microplus*, uma análise filogenética (Figura 5) foi realizada utilizando 39 sequências completas (sequências das famílias de antigénio 5, defensina, longicornsina, hebreaina / microplusina / ricinusina, lisozima, ixoderina / ficoloina e peptídeos contendo domínio ML) derivados do sialotranscriptoma de *R. microplus*, além de duas sequências de PAMs previamente caracterizadas e depositadas na base de dados do NCBI, denominado microplusina e longicornsina (169, 175). A análise mostra a abundância de sequências de proteínas que

podem apresentar atividade antimicrobiana. Algumas sequências de proteínas possuem grande semelhança entre si (Rm-nr-120711 e Rm-nr-120712-nr, Rm-nr-172281 e Rm-nr-172282, entre outros), como no caso da sequência Rm-nr-135798 que revela identidade elevada com microplusina previamente caracterizadas. Além disso, apesar dessa alta identidade com a microplusina-NCBI, outras sequências da mesma família, tais como Rm-nr-120711, Rm-nr-120712, Rm-nr-56986, Rm-nr-172282 e Rm-nr-172281 são muito divergentes (Figura 5), porém podem apresentar a mesma função antimicrobiana, mostrando à grande diversidade dessa classe de PAMs. Esta observação também acontece nas outras famílias presentes nesta análise.

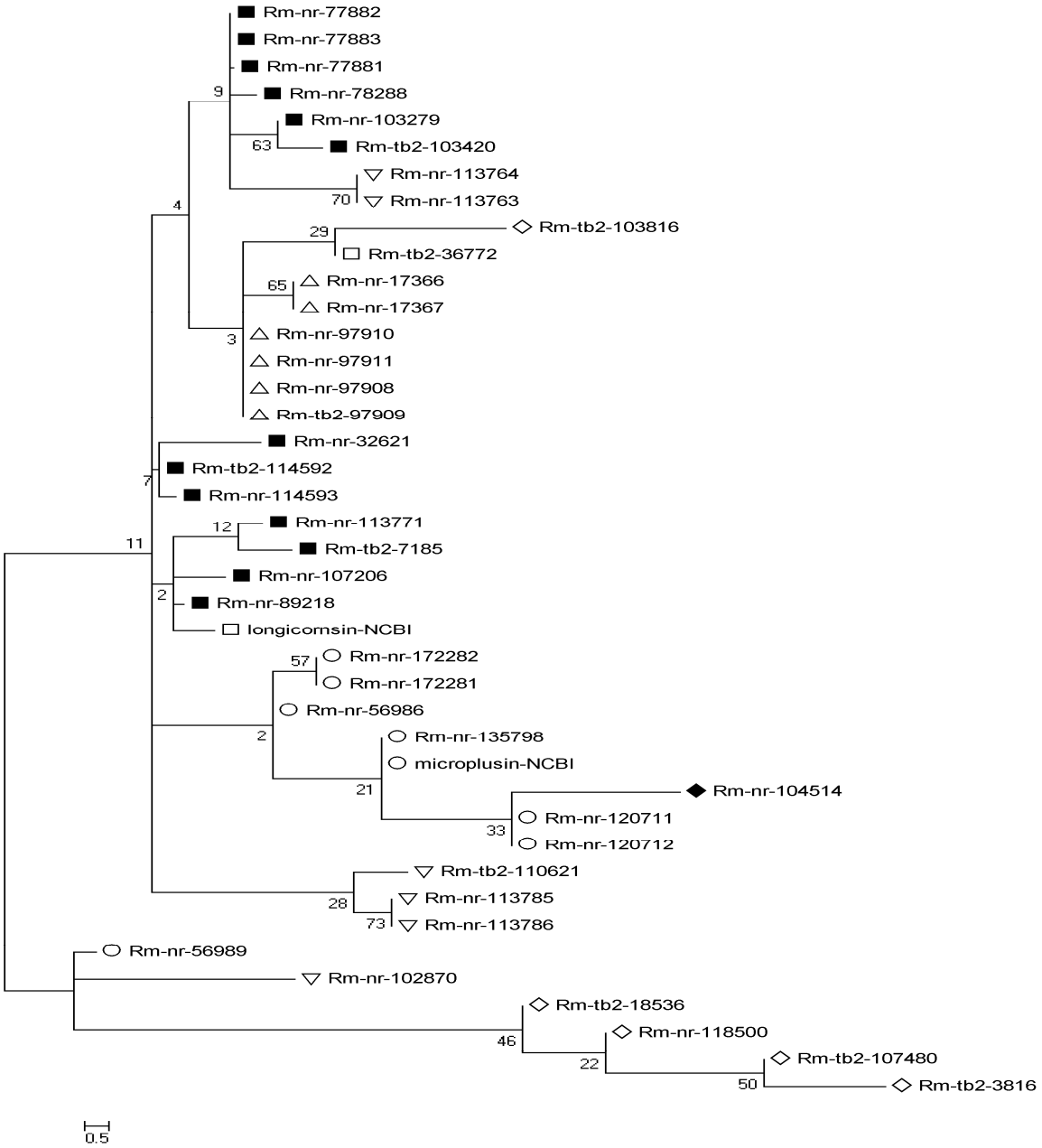


Figura 5. Análise filogenética de peptídeos antimicrobianos em *R. microplus*. Filograma *bootstrapped* (1.000 interações) resultando do alinhamento de 39 sequências completas contendo peptídeo sinal, bem como 2 sequência de PAMs (microplusina e longicornsina) previamente caracterizadas e depositadas nas bases de dados do NCBI. Os números sobre os nós indicam o suporte do *bootstrap*, e a barra na parte inferior indica 50% de divergência de aminoácido. O símbolo ○ representa as sequências da família hebreaina / microplusina / ricinusina (incluindo a sequência de microplusina depositada na base de dados do NCBI), □ representa as sequências da família longicornsina (incluindo a sequência de longicornsina depositada na base de dados do NCBI), ■ representa as

sequências da família defensina, ◇ representa as sequências da família antígeno 5, ◆ representa as sequências da família lisozima, △ representa as sequências da família ixoredina / ficolina e ▽ representa as sequências da família de peptídeos condendo domínio ML.

Inibidor de proteína de elastase de neutrófílo e proteínas de intermediárias

Surpreendentemente, 5 CDS assembladas a partir de 528 reads apresentando peptídeo sinal foram recuperadas e anotadas como inibidor de proteína de elastase de neutrófilos (Tabela suplementar 2). A sequência Rm-nr-117512 foi extraída de 400 reads, portanto, a mais abundantemente expressa nessa família. Em adição, estes inibidores foram encontrados nos proteomas de SalivaR e GSNRmR. Sabe-se que a elastase dos neutrófilos é uma serina proteinase da mesma família quimotripsina. Durante a inflamação, os neutrófilos secretam essas proteinases que são capazes de destruir bactérias e tecidos dos hospedeiros (188). Em relação aos neutrófilos em bovinos resistentes e suscetíveis, estas células migram de maneira similar para pele desses hospedeiros infestados com carrapatos. Além disso, esses neutrófilos são encontrados em grandes quantidades no local de fixação do carrapato (189).

Já em relação a expressão de transcritos codificantes para inibidores de elastase de neutrófilos presentes no sialotransccriptoma de *R. microplus,* estes estão abundantemente expressos em bibliotecas de GSNRmR, GSNRmS (estágio intermediário) e GSFRmR (estágio adulto) (Tabelas suplementares 34 e 35). Em relação aos transcritos expressos em ninfas, há um aumento significativo ($p<0,001$) na expressão em NRmS, oposto o que acontece em fêmea, onde os transcritos estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em FRmR (Tabela suplementar 33). Juntos estes resultados sugerem indiretamente que os neutrófilos apresentam funções importantes em infestações de carrapato, principalmente em hospedeiros resistentes que apresentam transcritos para inibidores de elastases de neutrófilos nos estágios intermediário (ninfa) e adulto (fêmea). Em adição, sugerimos que a elastase secretada pelo neutrófilo pode ser prejudicial para o carrapato durante a refeição sanguínea, portanto, esses inibidores podem ser antígenos em potenciais para compor uma vacina multicomponente contra os carrapatos, uma vez que foram encontrados também na saliva.

Outra informação importante é que outras 13 CDS extraídas de 281 reads apresentaram 30% de similaridade em 60% do comprimento das sequências que codificam para hebreaina / microplusina / ricinusina e para inibidores de elastase de neutrófilo, portanto, estas foram anotadas e classificadas como família de sequências intermediárias que podem apresentar ambas funções ou ter função desconhecida (Tabela suplementar 2).

Proteínas ligantes de imunoglobulina G (PLIgGs)

O presente sialotranscriptoma de *R. microplus* recuperou um total de 12 CDS (9 sequências completas) que codificam para PLIgGs, extraídas de 2.810 reads. Em análise de comparação de transcritos de acordo com origem de refeição sanguínea e por estágio de desenvolvimento do carrapato, observa-se que a expressão desses transcritos estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em bibliotecas de RmR (Tabela 9). Essa diferença de expressão ocorre principalmente entre as bibliotecas de GSM, na qual mostra que em MRmR possuem significativamente mais transcritos ($p<0,001$) do que MRmS (Tabela suplementar 33). Além disso, todas as 12 sequências (PLIgGs) estão presentes em ambas as bibliotecas (GSMRmR e GSMRmS), dessas apenas 5 sequências completas (Rm-nr-20979, Rm-nr-20983, Rm-nr-21408, Rm-nr-20978 e Rm-nr-25946) estão significativamente diferente entre as bibliotecas. Vale citar que essas importantes proteínas também foram recuperadas dos proteomas de GSMRmR e GSMRmS.

Em relação às PLIgGs, a literatura mostra que estas são produzidas exclusivamente pelos carrapatos machos (190), porém, nesse sialotranscriptoma havia a presença de algumas reads nas bibliotecas de LNARmR, GSFRmR e GSFRmS. Além disso, trabalhos anteriores tinham descrito que a PLIgG da classe C é a única proteína desta família a ser secretada na saliva do carrapato *R. appendiculatus* (190), contrastando com os nossos resultados em que PLIgGs das classes A, B e C apresentaram peptídeo sinal e, portanto, também podem estar presentes saliva de *R. microplus*.

Um alinhamento *ClustalW* e análise filogenética *neighbor-joining* foram realizados empregando 9 sequências completas e 3 sequências PLIgGs previamente depositadas no banco de dados do NCBI (Figura 6). A análise filogenética revela relativamente 3 grandes clados apresentando forte suporte de *bootstrap* (I, II e III grupos). O grupo I tem 4 PLIgGs de *R. microplus* com alta similaridade com PLIgG da classe B previamente depositadas no banco de dados do NCBI. No grupo II apresenta 1 sequência com alta similaridade com PLIgG da classe C e o grupo III que apresenta 3 sequências com alta similaridade com

PLIgG de *I. scapularis*. No grupo IV, a sequência Rm-tb2-25242 é muito divergente das outras sequências, possivelmente devido ao seu tamanho (peso molecular de 49,65 kDa), mas apresenta uma similaridade com PLIgG da classe A previamente depositadas no banco de dados NCBI. Além disso, como acontece em outras famílias de proteínas, esta variedade de sequências agrupadas em uma mesmo clado podem representar alelos do mesmo gene ou pode refletir um mecanismo do carrapato para gerar diversidade entre as PLIgGs. Como na família lipocalina, é possível que os membros do mesmo clado compartilham a mesma função e reflete em duplicação de genes, que podem ser expressas em diferentes tempos, conforme necessidade. Portanto, sugerimos que os carrapatos utilizam essa estrátegia para evadir respostas de anticorpos de seus hospedeiros.

Em relação à resposta humoral, tem sido mostrado que anticorpos dos hospedeiros são prejudiciais para as infestações de carrapatos por neutralizar os seus componentes salivares que são inoculados na pele do hospedeiro durante o processo de alimentação sanguínea (22, 24). Sugerimos que as PLIgGs têm um papel fundamental para que isso ocorra, pois podem interromper a ligação da IgG ao receptor neonatal, o qual promove a reciclagem de IgG e aumenta a sua meia-vida. Modificações nas IgG inibem essa interação que leva à uma rápida diminuição nos níveis plasmáticos (191, 192). Além disso, infestação de carrapato suprime resposta de anticorpos IgG em hospedeiros susceptíveis (88), sugerindo a participação das PLIgGs. Por outro lado, os hospedeiros resistentes apresentam níveis mais baixos de imunoglobulinas totais em comparação com hospedeiros suscetíveis, mas mesmo assim os soros de hospedeiros resistentes reconhecem um número maior de antígenos salivares do carrapato do que os hospedeiros suscetíveis (193). Devido esses fatos, sugerimos que as PLIgGs são produzidas em maior quantidade por MRmR para contornar a efetiva resposta de anticorpos desses hospedeiros.

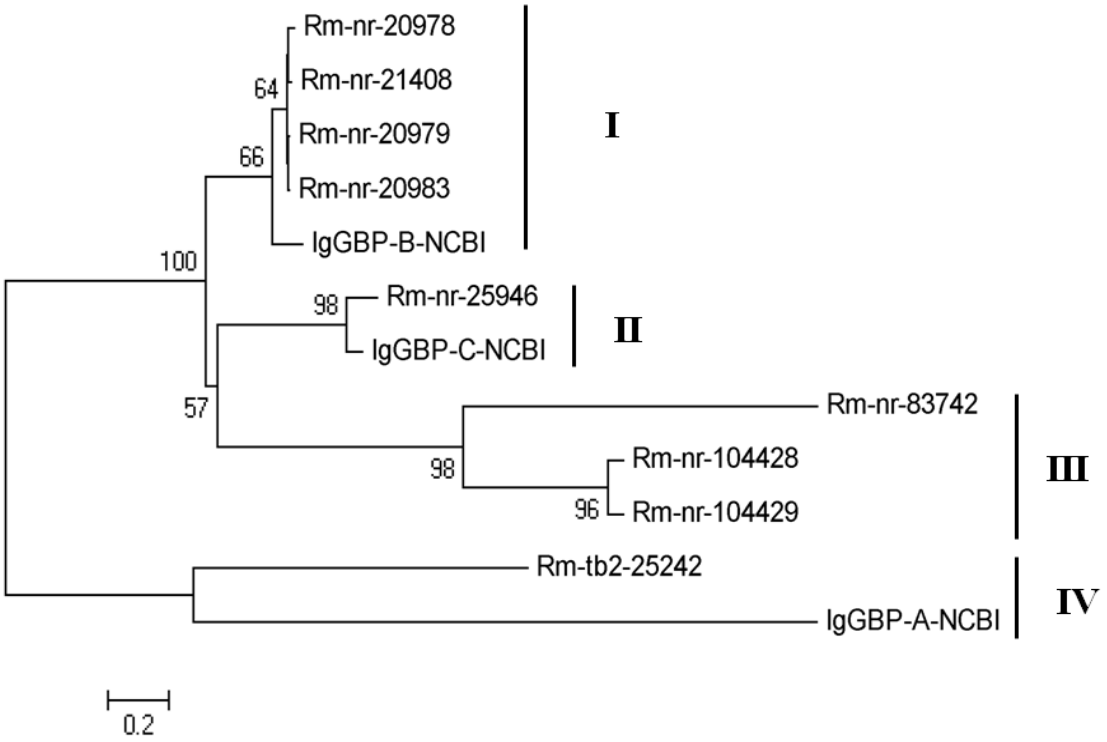


Figura 6. Análise filogenética de proteínas ligantes de imunoglobulinas G em *R. microplus*. Filograma *bootstrapped* (1.000 interações) resultando do alinhamento de 9 sequências completas contendo peptídeo sinal, bem como 3 sequência de PLIgGs (gi|2352274, gi|145693007 e gi|2352270) previamente caracterizadas e depositadas nas bases de dados do NCBI. Os números sobre os nós indicam o suporte do *bootstrap*, e a barra na parte inferior indica 20% de divergência de aminoácido. As clades maiores de 60% de suporte de *bootstrap* são indicadas por I, II, III e IV.

Proteínas imunossupressoras DAP-36 e evasina

Membros dessas importantes famílias de imunomoduladores foram reunidos em 16 CDS assembladas de 468 reads codificando para proteínas imunossupressoras DAP-36 e 36 CDS assembladas de 1.114 reads codificando para evasina. Das sequências presentes nas famílias das proteínas imunossupressoras DAP-36 e evasinas, 8 CDS e 29 CDS são sequências completas, respectivamente. A proteína DAP-36 foi previamente identificada como um imunossupressor de 36 kDa presente na saliva do carrapato *Dermacentor andersoni* (194, 195), enquanto que a evasina foi previamente identificada no carrapato *R.*

sanguineus como proteína ligante de quimiocina, implicada na redução da migração celular (171, 196).

Em geral, esses transcritos estão mais expressos significativamente (*p<0,001*) em bibliotecas de RmS (Tabela 9). Ao comparar os transcritos de acordo origem de refeição sanguínea e por estágio de desenvolvimento do carrapato, observa-se que nas bibliotecas de ninfa, macho e fêmea alimentados em hospedeiros suscetíveis possuem significativamente mais transcritos (*p<0,001*) para esta família (Tabela suplementar 33). Comparando apenas os transcritos das bibliotecas de RmS, esses estão aumentando significativamente ao longo do ciclo parasitário, larvas não alimentadas para ninfa, de ninfa para macho e de ninfa para fêmeas (Tabela suplementar 35). Já comparando apenas os transcritos das bibliotecas de RmR, observa-se um aumento significativo (*p<0,001*) da expressão na fase adulta (bibliotecas de macho e fêmeas) (Tabela suplementar 34). De modo interessante, o aumento da expressão destes transcritos associados com imunomoduladores está concomitante ao aumento do ingurgitamento das fêmeas, especialmente em hospedeiros suscetíveis, tornando esses representantes alvos em potencial para compor uma vacina multicomponente anticarrapato.

Famílias de proteínas específicas para carrapato

Sialotranscriptomas de artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos, têm revelado uma abundância de proteínas ricas em glicina, muitos das quais são utilizadas pelo carrapato para fixar na pele dos seus hospedeiros, tais como proteína salivar semelhante à seda, cola, elastina, cutícula e cimento (197, 198) e são consideradas alvos em potenciais para compor uma vacina muticomponente anticarrapato (199). Em nossa análise 14 sequências completas que codificam para proteínas do tipo cutícula assembladas de 357 reads contendo peptídeo sinal foram recuperadas. Outras 49 CDS assembladas de 27.527 reads foram associadas à proteínas de cimento, bem como 5 CDS assembladas de 243 reads codificando para elastina. Cinco CDS que codificam para proteínas do tipo cola foram extraídas a partir de 217 reads, além de 2 CDS anotadas como proteínas semelhante à seda derivadas de 45 reads. Curiosamente, todas as famílias mencionadas acima apresentam diferenças significativas nos níveis de expressão entre as bibliotecas de RmS e RmR, e surpreendentemente, todas as famílias estão significativamente mais expressas em bibliotecas de RmR (Tabela 9).

É notável que o nível de resistência à carrapatos em bovinos pode estar associado com o grau de concentração de eosinófilos e desgranulação dessas células no local da fixação dos carrapatos, também conhecida como *pool* de alimentação sanguínea (200). A quantidade de histamina presente nestes locais também pode estar associado à resistencia (159). A histamina pode auxiliar na rejeição dos carrapatos, entre vários fatores, por aumentar o comportamento de auto-limpeza causados por estes mediadores inflamatórios. Portanto, sugere-se que o aumento significativo da expressão desses representantes em bibliotecas de RmR pode ser devido ao um maior comportamento de auto-limpeza desses hospedeiros durante a infestação, exigindo portanto, uma maior quantidade dessas proteínas associadas à fixação para os carrapatos possam permanecer fixados nesses hospedeiros.

Proteínas semelhante à cutícula

A cutícula é parte do tegumento externo, cobrindo todo o corpo do carrapato externamente, incluindo os seus ductos de glândulas salivares (201). Além disso, devido à grande variedade de sequências de cutícula apresentando peptídeo de sinal, os membros desta família podem ser secretados na saliva do carrapato para auxiliar-los durante a fixação na pele dos seus hospedeiros.

Cimento

As proteínas salivares de cimento têm mostrado ser essencial para o sucesso da fixação dos carrapatos nas peles de seus hospedeiros durante o parasitismo, e sua expressão depende tanto da anatomia de suas partes bucais (Curta - Brevirostrata ou Longa - Longirostrata) e número de hospedeiros que os carrapatos se alimentam durante o seu ciclo de vida parasitária (1 hospedeiro- monóxenos ou 2 ou mais hospedeiors - heteroxénos) (198). Além disso, proteínas dessa família induzem fortes respostas de anticorpos e apresentam reatividade cruzada antigênicas, por isso podem ser consideradas alvos em potenciais para compor uma vacina anticarrapato (199, 202).

No carrapato *R. microplus*, um brevirostrata monóxeno, os transcritos de cimento estão abundantemente expressos em todas as fases de desenvolvimento do carrapato de ambos grupos de bibliotecas, seja RmS e RmR (Tabela 9). Como já mencionado, estes transcritos estão significativamente mais expressos em bibliotecas de RmR ($p<0,001$), especialmente em carrapatos machos (Tabela suplementar 33). Já comparando apenas os

transcritos das bibliotecas de GSMRmS e GSMRmR, esses estão significativamente mais expressos em MRmR (*p<0,001*) (Tabela suplementar 33). Além disso, proteínas de cimento também foram encontradas nos proteomas de GSFRmS, GSMRmS e GSMRmR.

Uma explicação para a presença desses transcritos em todos os estágios de desenvolvimento do *R. microplus*, pode ser pelo fato que esta espécie de carrapato é monóxeno, portanto, necessitam de permanecer fixos por algumas semanas na pele de seu hospedeiros, e portanto necessitam dessas proteínas durante todo o período. Já em relação à abundância de transcritos encontrados em machos, isto pode ser devido ao seu comportamento em procurar e fixar próximas as fêmeas, possivelmente para auxiliá-las na completa obtenção de sangue. A explicação desses transcritos estarem mais expressos em bibliotecas de RmR, principalmente em macho, pode ser devido ao comportamento de autolimpeza que esses hospedeiros exercem durante a infestação, além da composição de sua pele que dificulta à sua fixação (153).

Elastina, cola, seda e proteínas contendo repetições em GGY e GYG

Proteínas pertecentes à família de elastina, cola e seda também podem estar associadas com a fixação dos carrapatos devido às suas propriedades, tais como viscosidade, elasticidade, resistência e adesiva semelhante à cola (203, 204). Estas proteínas geralmente ajudam a pele a voltar à sua posição original quando é empurrado ou comprimido e também podem retomar a sua forma após alongamento ou contracção, características que podem ser importantes para *R. microplus*, um carrapato brevirostrata monóxenos. Além disso, esta ampla classe de proteínas de fixação inclui as proteínas contendo repetições de GGY e GYG, que são proteínas abundantemente encontradas em carrapatos, incluindo *R. microplus* (198). Nesse sialotranscriptoma, 11 CDS assembladas de 311 reads foram anotadas como GGY e 10 CDS assembladas de 145 reads como GYG. Além dessas, outras 84 CDS pertencentes à família de proteínas ricas em glicina foram extraídas de 12,590 reads (muitas com peptídeo sinal). No caso dessa última família, também foram encontrados representantes nos proteomas de GSNRmR, GSNRmS, GSMRmR, GSMRmS e GSFRmS.

Salp-15

Três membros assemblados de 88 reads pertecentes à família Salp-15 contendo peptídeo sinal foram encontrados no sialotranscriptoma de *R. microplus*. Proteínas desta

família foram previamente caracterizadas em carrapatos *I. scapularis* como proteínas salivares apresentando características imunossuprressoras. Essas propriedades imunossupressoras facilitam a persistência do artrópode sobre o hospedeiro e facilita a transmissão de doenças, por inibir ativação das células T $CD4^+$ (205, 206) facilitando a transmissão da doença de Lyme (207). Esses transcritos são produzidos de modo semelhante entre as bibliotecas de RmS e RmR (Tabl6 9).

Superfamília de proteínas de cauda básica e ácida

Proteínas salivares presentes nesta família apresentam repetições de aminoácidos básicos na sua região carboxi-terminal, além de apresentar propriedades anticoagulantes (64). Estas têm sido previamente encontradas em outros sialotranscriptomas de carrapatos (51, 54, 56, 75). Outros membros com uma cauda ácida, bem como proteínas de 18,3 kDa foram encontrados e podem estar relacionados com os membros desta superfamília (53). O sialotranscriptoma de *R. microplus* revelou CDS para 29 membros desta superfamília extraídas de 1.201 reads, apresentando semelhanças com sequências dessa família ou apresentando o TSGP1 na base de dados PFAM. Destas, 16 são sequências completas contendo peptídeo sinal, além de algumas sequências apresentar vários possíveis sítios de glicosilação, indicando que estas também podem ser mucinas.

Esses representantes estão significativamente mais expressos ($p<0,001$) em bibliotecas RmS (Tabela 9), especialmente em ninfas e machos (Tabela suplementar 33). Anticoagulantes são importantes na fase adulta do carrapato, quando ingerem grande quantidade de sangue (208, 209). De fato, carrapatos adultos alimentados em hospedeiros suscetíveis apresentam um aumento da expressão desses possíveis anticoagulantes, o que coincide com a eficiente ingestão de sangue desses carrapatos, ao contrário do que acontece com os carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes.

Famílias de proteínas de 8,9 kDa, 9,4 kDa e 10 kDa

Vinte e sete CDS anotadas de 8.354 reads recuperadas do carrapato *R. microplus* foram identificadas como membros desta família. Estes apresentam similaridade na base de dados NR com peptídeos secretados de peso molecular de aproximadamente 10 kDa. Os membros desta família foram encontrados exclusivamente em carrapatos duros, entretanto suas funções são desconhecidas (25).

Similar à família de proteína Ixodidae

Quatrocentos setenta e quatro CDS recuperadas do sialotranscriptoma do carrapato *R. microplus* foram assembladas a partir de 19.681 reads, e posteriormente agrupadas em sete sub-famílias, devido à similaridade com sequências de proteínas deduzidas dos carrapatos *R. microplus, R. appendiculatus, Am. maculatum, Am. variegatum, Am. americanum, I. scapularis e D. andersoni*. Duzentos quarenta e três CDS anotadas de 11.045 reads foram associadas com proteínas de *R. microplus*. Destas, 184 CDS são sequências completas e 21 sequências completas apresentam peptídeo sinal. Membros dessa família foram encontrados nos proteomas de GSN (RmR e RmS), GSM (RmR e RmS) e SalivaS.

Outras 113 CDS anotadas de 5.089 reads apresentam similaridade com proteínas de *R. appendiculatus*. Cinquenta e nove são sequências completas e 21 das quais apresentam peptídeo sinal. Membros desta família também foram recuperadas dos proteomas de GSN (RmR e RmS), GSM (RmR e RmS) e GSFRmS.

Sessenta e uma CDS foram relacionados com proteínas do carrapato *Amblyomma*, 49 CDS relacionadas com proteínas do *Am. maculatum*, 6 CDS para proteínas do *Am. variegatum* e 6 CDS para proteínas do *Am. americanum*. Proteínas relacionadas com *I. scapularis* também foram recuperadas deste sialotranscriptoma, representando 12 CDS assembladas de 918 reads. Membros desta família também foram recuperadas dos proteomas de GSN (RmR e RmS), GSMRmS e GSFRmS. Por fim, 45 CDS assembladas de 1.148 reads associadas à proteínas do carrapato *D. andersoni* foram recuperadas.

Outras proteínas secretadas

Quarenta e três CDS assembladas de 1.409 reads apresentando similaridade com outras proteínas foram agrupadas no item "outras proteínas secretadas", as quais podem apresentar várias funções. Destas, 13 CDS são sequências completas apresentando peptídeo sinal indicativo de secreção. Proteínas presentes nos proteomas de GSNRmS e GSFRmS apresentaram similaridade com proteínas inseridas aqui.

Outras proteínas secretadas não caracterizadas

Na tabela suplementar 2 exibe 1.432 sequências de proteínas não caracterizadas assembladas a partir de 136.204 reads, apresentando baixa similaridade com outras sequências depositadas em banco de dados NR. Destas, 716 são sequências completas e apresentam peptídeo sinal. Em adição, proteomas de GSNRmS e GSNRmR apresentaram proteínas que possuem similaridade com sequências presentes nesse agrupamento de sequências do sialotranscriptoma. Além disso, foram recuperadas 2.822 CDS assembladas de 331.738 reads apresentando nenhuma similaridade com proteínas com função conhecidas, portanto foram classificadas como proteínas desconhecidas. Destas proteínas desconhecidas, 63 CDS apresentam peptídeo sinal indicativo de secreção. Assim, sugere-se que estas proteínas não caracterizadas podem ser associadas com a função celular e / ou de modulação de respostas dos seus hospedeiros, por ser constituintes salivares e apresentar peptídeo sinal, podendo estar presentes na saliva.

4.3.3. Categoria ET: Elemento transponíveis

Sequências codificantes associadas à transposão também foram encontradas no presente sialotranscriptoma de *R. microplus*. Estas CDS foram anotadas como classe I, totalizando 444 CDS assembladas de 9.479 reads, classe II com 51 CDS assembladas de 1.897 reads e 123 CDS anotados como outros elementos transponíveis, derivados de 2.763 reads. A presença destes elementos pode representar eventos remanescentes de transposição ativos no genoma do carrapato ou mesmo funcionar como reguladores de transposição, no entanto, a recente atividade de elementos transponíveis é uma outra possibilidade para explicar a presença destes elementos no sialotranscriptoma de *R. microplus*.

4.3.4. Categoria V: possíveis proteínas virais

Recuperamos 7 CDS extraídas de 286 reads apresentando similaridade com proteínas virais. Recentemente, nosso grupo analisou o sialotranscriptoma anterior do *R. microplus* (Tecnologia SANGER, estratégia SMART) e evidenciou a presença de sequências que apresentavam homologia com proteínas não estruturais de vírus pertecente

à família Flaviviridae (210). Sabendo disso, diferentes grupos de carrapatos foram coletados de bovinos de várias regiões do Brasil e, posteriormente, foram analisados e confirmou-se à presença de sequências específicas homóloga à proteínas não estruturais de vírus Flaviviridae. Em adição, uma análise refinada dos transcritos derivados de culturas de células tratadas com extratos de carrapatos, sugere a identificação de um novo membro Flaviviridae (210) que o carrapato *R. microplus* alberga. Porém, necessita de mais estudos para saber se o *R. microplus* é o vetor desse novo vírus identificado.

Portanto, a identificação e anotação de novos transcritos virais é importante para identificação de novos vírus. Nesse sentido, é importante notar que três contigs presentes no sialotranscriptoma anterior do *R. microplus* (caracterizado por contig_2343, contig_390 e contigs_2934) (50) apresentam homologias com CDS nomeados como Rm-tb2-1978, RM-nr-103652 e Rm-NR-10.521 identificadas no presente sialotranscriptoma de *R. microplus*. Assim, seria importante avaliar se as sequências codificantes identificadas aqui poderia apontar para informaçôes relevante sobre novos patógenos trasmitidos pelo carrapato *R. microplus*.

Considerações gerais sobre o sialotranscriptoma

Em resumo, os transcritos presentes neste novo sialotranscriptoma de *R. microplus* aparecem diferencialmente expressos de acordo com a origem de refeição sanguínea, se hospedeiros resistentes ou suscetíveis, corroborando com outros estudos (211).

Aqui, das 121 famílias anotadas, 93 são diferencialmente expressas, destas 59 famílias são significativamente mais expressas em bibliotecas de RmR e 34 famílias em bibliotecas de RmS (Tabela 9). Apesar dessa diferença, a maioria das famílias da categoria S que apresentam funções associadas com a facilitação de obtenção sanguínea como família de proteínas contendo domínio kunitz, metaloproteases, cistatinas, domínio kazal, inibidor de carboxipeptidase, chimadanina, proteínas contendo cauda básica ou ácida, lipocalinas, bem como as famílias de proteínas associadas com a modulação da resposta imune do hospedeiro, como DAP-36 imunossupressora, evasinas e longicornsinas são significativamente mais expressas em bibliotecas de RmS.

Já em relação às famílias associadas com a fixação do carrapato, como cimento, cutícula, cola, seda e elastina são significativamente mais expressa em bibliotecas de RmR

(Tabela 9). Assim, em conjunto, sugerimos que os RmR estão tentando se manter fixos na pele desse hospedeiro, enquanto que os RmS fazem isso mais facilmente e apresentam maior eficiência na modulação das respostas inflamatória, imune e hemostática.

Outra observação importante sobre a biologia do carrapato refere-se a famílias de proteínas secretadas em bibliotecas de larvas não alimentadas. Nessas, foi observado que 36 famílias são diferencialmente expressas e, surpreendentemente, todos elas estão em LNARmR (Tabela suplementar 33). Além disso, os transcritos de categoria constitutivo, anotados como maquinaria de exportação de proteínas e maquinaria de síntese protéicas também estão significativamente mais expressos nesta biblioteca (Tabela 9). Assim, sugerimos que as larvas oriundas de fêmeas alimentadas em hospedeiros resistentes possuem maior quantidade desses transcritos devido à dificuldade que suas progenitoras enfrentaram em infestações anteriores quando infestaram esses hospedeiros resistentes, assim estas estão prontas para uma possível infestação nestes mesmos hospedeiros. Portanto, estes resultados sugerem que LNARmR têm uma capacidade de reprogramar a sua atividade de transcrição para se adaptar a cada situação. É digno de nota que, apesar de esses moduladores estarem abundantemente expressos em LNARmR, as infestações nesses hospedeiros resistentes muitas vezes não progridem.

Por fim, sugerimos que os carrapatos machos apresentam importantes funções durante às infestações de carrapatos. Os transcritos de *R. microplus* anotados como proteínas secretadas foram significativamente mais expressos em carrapatos machos, em relação aos outros estágios, e essa expressão diferencial acontecem independentemente da origem de refeição sanguínea do macho (Tabelas suplementares 34 e 35). Das 55 famílias de transcritos diferencialmentes expressos em carrapatos machos, 43 famílias foram significativamente mais expressas em MRmS e apenas 12 famílias apresentaram expressões mais elevadas em MRmR (Tabela suplementar 33). Além disso, a expressão de transcritos anotados como maquinaria de exportação de proteínas e maquinaria de síntese protéica também apresentaram aumentos significativos em bibliotecas de RmS (Tabela 9), principalmente em ninfas e machos alimentados nesses hospedeiros suscetíveis (Tabela suplementar 33).

Em conjunto, estes resultados sugerem que os carrapatos machos são essenciais para uma eficiente infestação e podem ser o principal responsável pela modulação das respostas dos seus hospedeiros, especialmente em hospedeiros suscetíveis. Em adição, os resultados mostram uma abundância de transcritos expressos por machos associados com

peptídeos antimicrobianos, imunossupressores, antiinflamatórios e antihemostático. Portanto, estes carrapatos machos podem ser alvos de futuras intervenções para controlar a infestação de carrapatos em bovinos.

4.4. DIGE

Outra estrátegia utilizada para identificação e busca de possíveis alvos vacinais contra o carrapato *R. microplus* empregada neste estudo foi a análise diferencial em gel 2D-DIGE. Esta tecnologia permite o estudo de proteínas diferencialmentes expressas em duas amostras diferentes, por exemplo, LNARmR e LNARmS; GSNRmR e GSRmS; e GSFRmR e GSFRmS. A identificação de proteínas diferencialmente expressas nessas amostras salivares de carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes ou suscetiveis pode ser fundamental para seleção de novos alvos para compor uma vacina multicomponente anticarrapato.

4.4.1. Análise 2-D DIGE de proteínas salivares do *R. microplus*

Como já mencionado, foram realizadas 3 comparações entre amostras de RmR e RmS. No experimento entre as amostras de LNARmR e LNARmS, um total de 749 spots foram sobrepostos entre os dois géis analíticos (Figura 7). Nesta análise revelou que dos 749 spots encontrados, apenas 59 spots (7,87% dos spots) estavam diferencialmente expressos entre as amostras (*p=0,025*) (Figura 7A-E). Destes, apenas 37 spots protéicos foram sobreprostos e recuperados entre os 2 géis analíticos e o gel preparativo (Figura 7F e Figura suplementar 1). Dos 37 spots, 30 spots estavam mais expressos em LNARmS e apenas 7 em LNARmR.

No experimento DIGE entre GSNRmR e GSNRmS, foram anotados 842 spots apresentando *match* entre os 2 géis analíticos (Figura 8). A análise de expressão diferencial entre os 842 spots revelou que apenas 58 spots (6,88% dos spots) estavam diferencialemnte expressos (*p=0,025*) entre as amostras (Figura 8A-E). Destes 58 spots, 30 foram sobreprostos e recuperados entre os 2 géis analíticos e o gel preparativo (Figura 8F e Figura suplementar 2). Desse total, 16 spots estão mais expressos em GSNRmS, enquanto que 14 spots estão mais em GSNRmR.

Por fim, no experimento DIGE entre as amostras de GSFRmR e GSFRmS foram anotados 917 spots apresentando *match* entre os 2 géis análiticos (Figura 9). A análise 2D-DIGE desse experimento revelou que 174 spots (19% dos spots) estavam diferencialmente expressos (*p=0,025*) entre as amostras (Figura 9A-E). Desse total, 95 spots apresentaram *match* entre os 2 géis analíticos e o gel preparativo (Figura 9F e Figura suplementar 3), sendo que 50 spots estavam mais expressos em GSFRmS e 45 mais em GSFRmR.

Os 37, 30 e 95 spots protéicos selecionados em LNA, GSN e GSF, respectivamente, foram separados a partir dos géis preparativos e visualizados por coloração com deep purple (GE Healthcare, USA). Os pedaços dos géis contendo essas proteínas de interesse previamente selecionadas por análise DIGE foram coletados usando o robô Spot Picker (GE Healthcare, USA) e submetidos à sequenciamento de massa por LC-MS (do inglês, Liquid Chromatography–Mass Spectrometry) e as proteínas identificadas serão descritas abaixo.

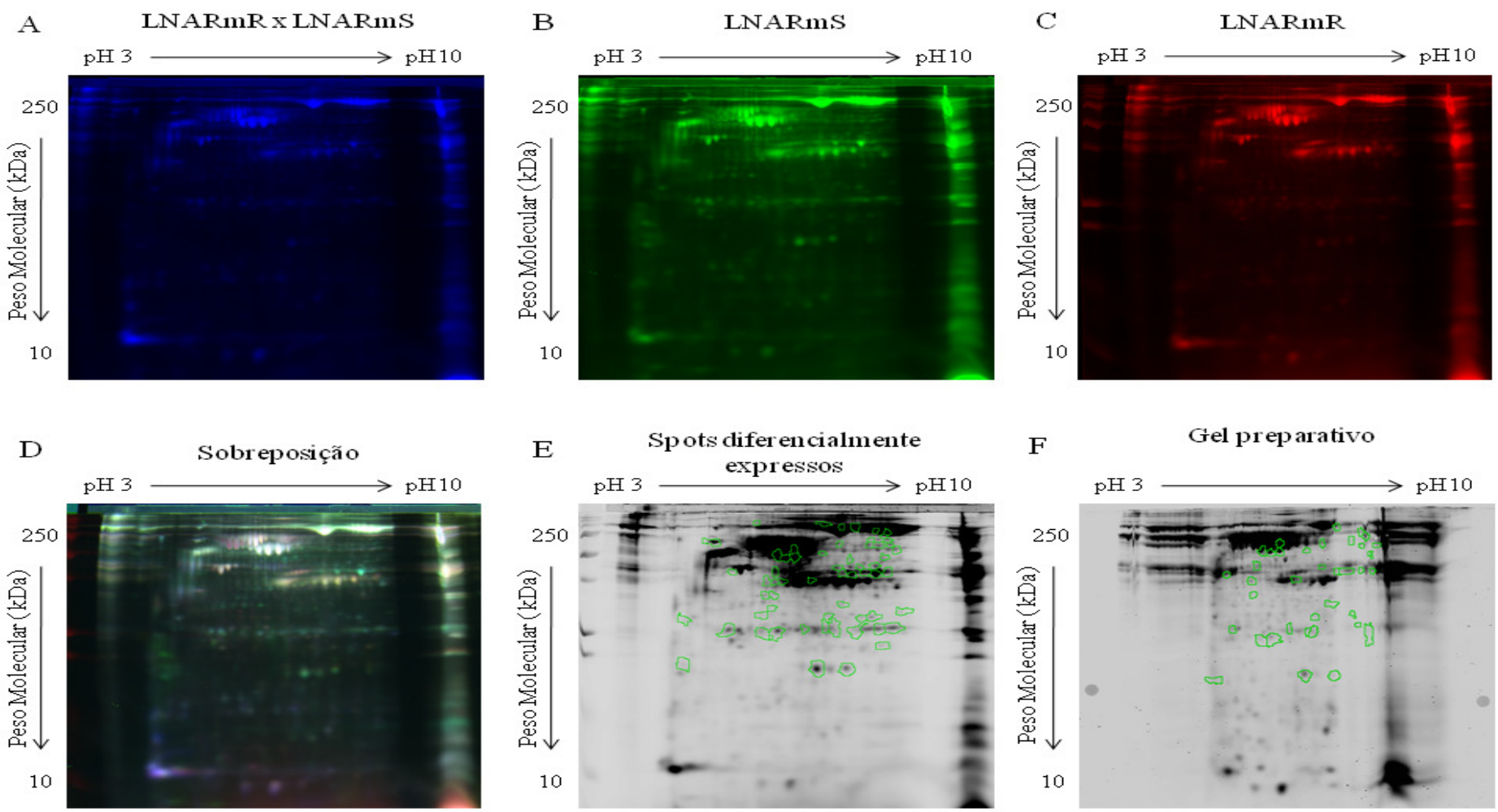


Figura 7. Análise DIGE entre as amostras de LNARmR e LNARmS. Esta figura representa o gel 2 do experimento de LNA. A tira empregada foi de pH3-10 linear que recebeu 50µg de proteína do extrato LNARmR + 50µg de proteína do extrato LNARmS, marcados da seguinte maneira:

em A) Extrato de LNARmR + LNARmS marcado com Cy2-azul (controle interno); B) Extrato de LNARmS marcado com Cy3-verde; C) Extrato de LNARmR marcado com Cy5-vermelho. D) Sobreposição das imagens A, B e C. E) Representa análise diferencial (*p<0,025*) entre os spots da amostra de LNARmR e LNARmS. F) Gel preparativo empregado na retirada dos spots selecionados na análise diferencial. O gel preparativo contém 150µg de proteína do extrato LNARmR + 150µg de proteína do extrato LNARmS. A solução de trabalho dos CyDyes foi 400pmol/ul.

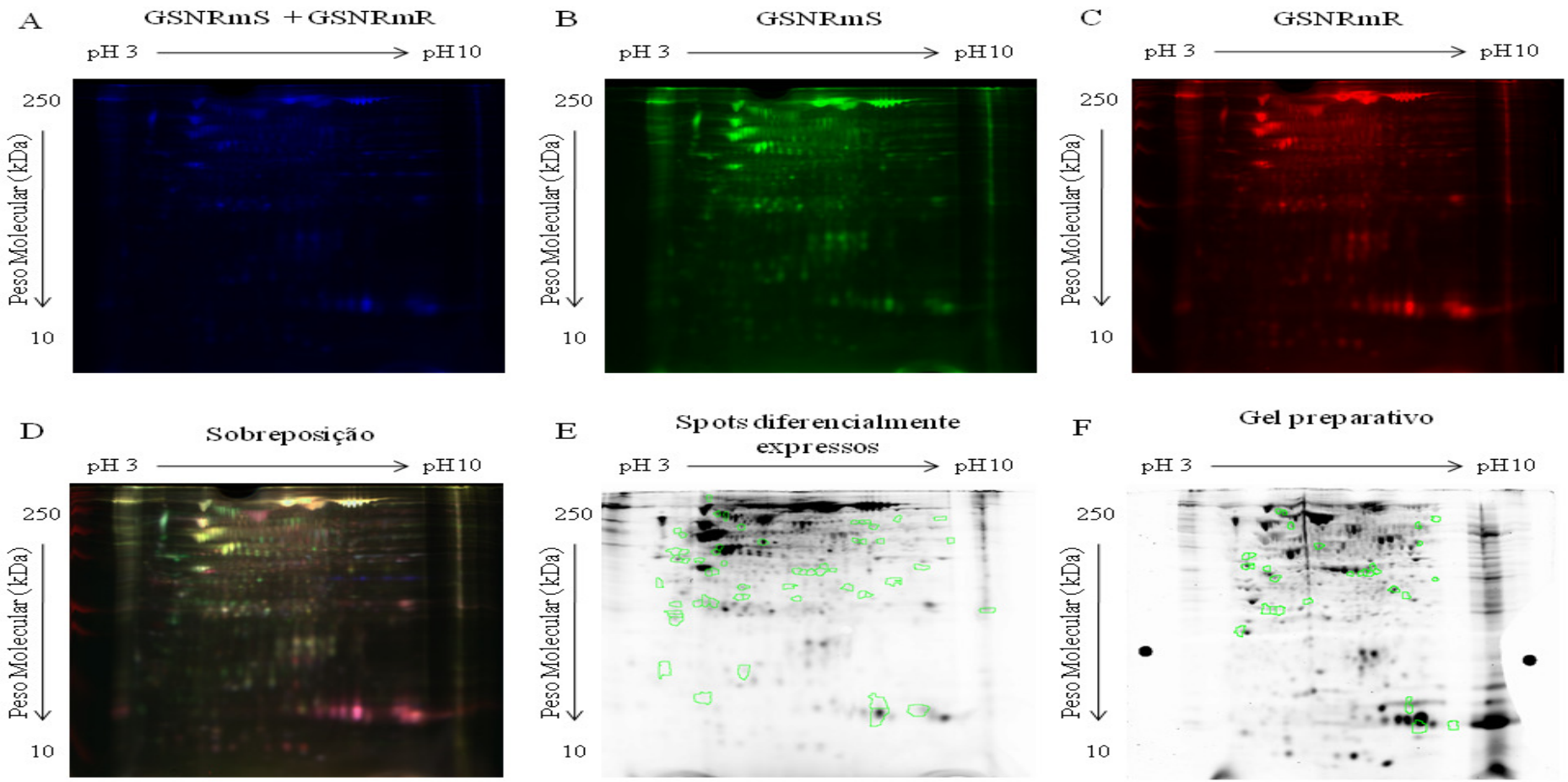


Figura 8. Análise DIGE entre as amostras de GSNRmR e GSNRmS. Esta figura representa o gel 1 do experimento de GSN. A tira empregada foi de pH3-10 linear que recebeu 50µg de proteína do extrato GSNRmR + 50µg de proteína do extrato GSNRmS, marcados da seguinte maneira:

em A) Extrato de GSNRmR + GSNRmS marcado com Cy2-azul (controle interno); B) Extrato de GSNRmS marcado com Cy3-verde; C) Extrato de GSNRmR marcado com Cy5-vermelho. D) Sobreposição das imagens A, B e C. E) Representa análise diferencial (*p<0,025*) entre os spots da amostra de GSNRmR e GSNRmS. F) Gel preparativo empregado na retirada dos spots selecionados na análise diferencial. O gel preparativo contém 150µg de proteína do extrato GSNRmR + 150µg de proteína do extrato GSNRmS. A solução de trabalho dos CyDyes foi 400pmol/ul.

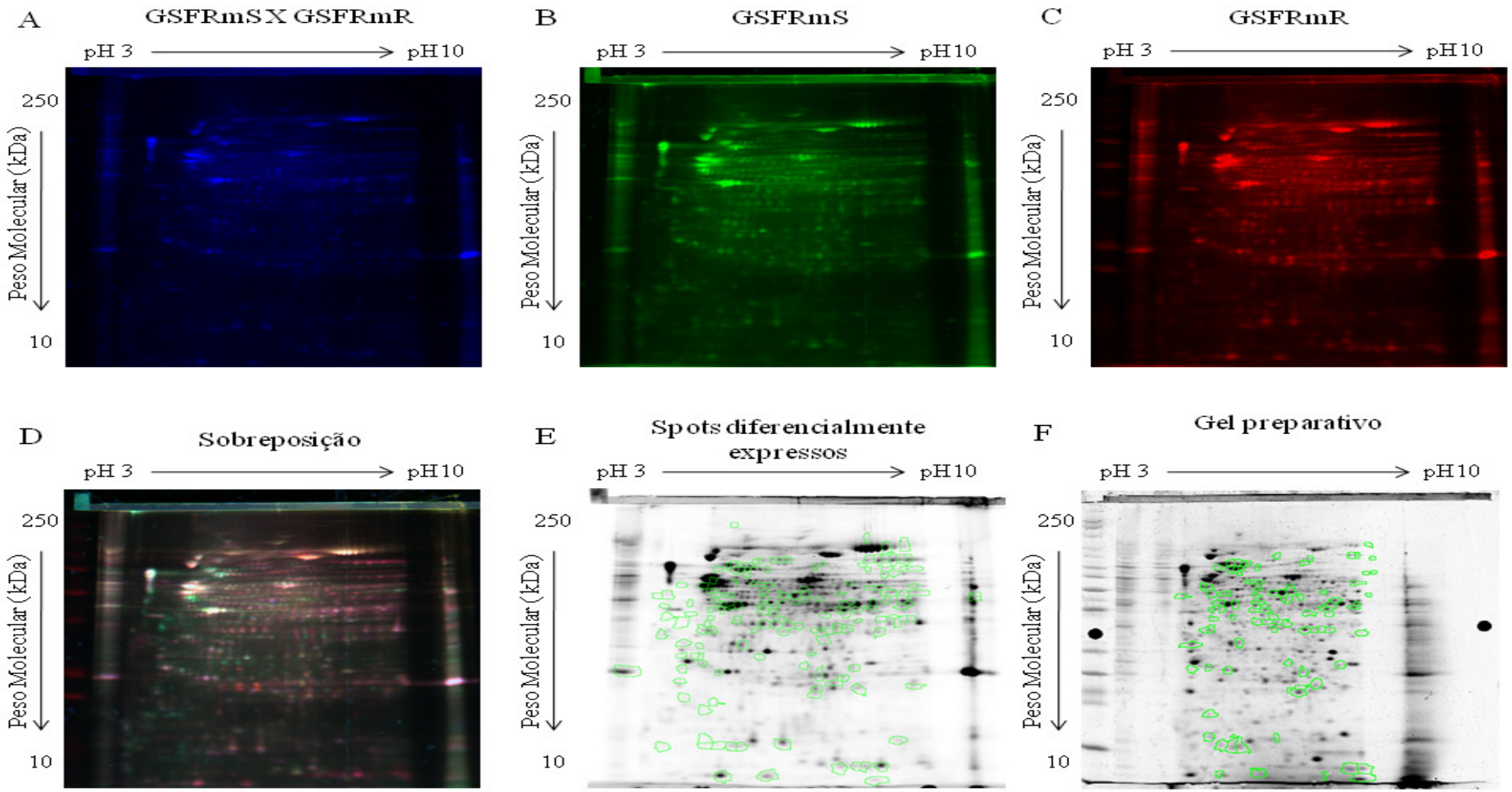


Figura 9. Análise DIGE entre as amostras de GSFRmR e GSFRmS. Esta figura representa o gel 1 do experimento de GSF. A tira empregada foi de pH3-10 linear que recebeu 50µg de proteína do extrato GSFRmR + 50µg de proteína do extrato GSFRmS, marcados da seguinte maneira: em

A) Extrato de GSFRmR + GSFRmS marcado com Cy2-azul (controle interno); B) Extrato de GSFRmS marcado com Cy3-verde; C) Extrato de GSFRmR marcado com Cy5-vermelho. D) Sobreposição das imagens A, B e C. E) Representa análise diferencial (*p<0,025*) entre os spots da amostra de GSFRmR e GSFRmS. F) Gel preparativo empregado na retirada dos spots selecionados na análise diferencial. O gel preparativo contém 150µg de proteína do extrato GSFRmR + 150µg de proteína do extrato GSFRmS. A solução de trabalho dos CyDyes foi 400pmol/ul.

4.4.2. Identificação das proteínas de LNA, GSN e GSF do *R. microplus*

Dos 162 spots protéicos selecionados para o sequenciamento de massa, 126 foram identificados nesses experimentos, a saber: 20 proteínas (55%) em LNA, 27 proteínas (90%) em GSN e 79 proteínas (80%) em GSF, porém 36 spots não foram identificados pelo sequenciamento de massa (17 spots de LNA, 3 spots de GSN e 16 spots de GSF), possivelmente devido a perdas durante o processamento. As proteínas identificadas nesses experimentos estão listadas nas tabelas 10, 11 e 12.

Além disso, no DIGE de LNA, das 20 proteínas identificadas apenas 3 proteínas estão significativamente mais expressas em LNARmR, enquanto que 17 proteínas estão significativamente mais expressas em LNARmS (Tabela 10). No DIGE de GSN, das 27 proteínas identificadas, 13 proteínas estão significativamente mais expressas em GSNRmR, enquanto que 14 proteínas estão significativamente mais expressas em GSNRmS (Tabela 11). Já no DIGE de GSF, 35 proteínas estão significativamente mais expressas em GSFRmR, enquanto que 44 proteínas estão significativamente mais expressas em GSFRmS (Tabela 12). Estes dados podem ser visualizados em resumo na Tabela 13, a qual mostra que carrapatos alimentados em hospedeiros suscetiveis (em todos os estágios do parasitismo) têm a expressão de diferentes proteínas mais elevadas em relação aos carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes.

Vale citar que as proteínas identificadas e mostradas nestas análises foram as sequências que apresentaram maiores números de peptídeos únicos durante o sequenciamento, pois muitas vezes em um mesmo spot protéico foram identificadas mais de uma proteína.

As proteínas identificadas foram associadas com proteínas conservadas desconhecidas (47%; 59 proteínas), maquinaria de modificação protéica (18%; 23 proteínas), citoesqueleto (11%; 14 proteínas), secretadas (8%; 10 proteínas), metabolismo (5.5%; 7 proteínas), síntese protéica (5%; 6 proteínas), desintoxicação (2%; 3 proteínas), maquinaria proteassoma (1,5%; 2 proteínas), transdução de sinal (1%; 1 proteína) e transportadores e armazenagem (1%; 1 proteína) (Figura 10 e Tabelas 10-12).

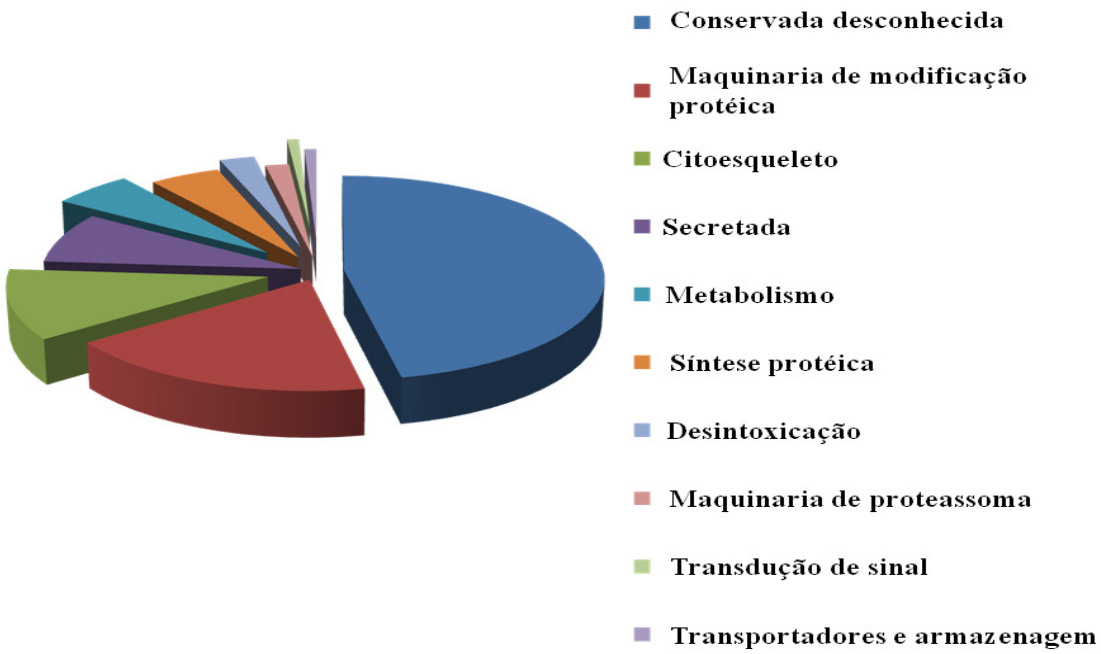


Figura 10. Distribuição funcional (por família) das 126 proteínas identificadas nas análises DIGE.

A maioria das proteínas identificadas pertence à categoria de proteínas constitutivas associadas com proteínas estruturais e intracelulares, tais como actinas, tubulinas, tropomiosinas, proteínas ligantes de DNA e RNA, histonas, enolases, fator de elongação, fator de iniciação da transdução, chaperonas, profilina, transaldolase, proteínas do citocromo, proteínas ribossomal, dentre outras (Tabelas 10-12). A presença dessas proteínas já era esperada devido aos tipos de amostras utilizadas nesses experimentos (extratos de larvas não alimentadas e glândulas salivares).

Apesar disso, proteínas associadas com o parasitismo e alimentação sanguínea, como por exemplo, serpina-3 (inibidor de serina proteinase) e serina endopeptidase foram recuperadas e estavam mais expressas em LNARmR e GSNRmR, respectivamente. Já longipaína, precursor de serpina-2 e fator de liberação de histamina estavam mais expressas em GSNRmS. A tiredoxina peroxidase e tiropina também estavam mais expressas em RmS. Já as catalases e peroxiredoxinas estão presentes em amostras de RmS e RmR. Além disso, outras proteínas cujas funções são desconhecidas (proteínas secretadas, peptídeo de glândula salivar e proteínas hipotéticas) também estavam presentes.

Tabela 10. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em LNA por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE.

N° do spot [a)]	N° de acesso [b)]	Identificação das proteínas	Origem das amostras [c)]	Valor da expressão diferencial [#)]	Peso Molecular / pI [d)]	N° de peptídeos únicos	% Cobertura da sequência	Função putativa	Função Molecular [e)]
450	70729	chaperonin complex component, tcp-1 delta subunit,	S	1.45	24/9.8	2	15	pm	chaperone activity
521	25106	Enolase	S	1.36	43/5,6	5	20	uc	oxidoreductase activity
541	75791	aldehyde dehydrogenase	R	1.76	39/5.9	1	4	uc	catalytic and oxidoreductase activity
630	18420	Actin	S	1.54	42/5.3	2	13	cs	structural constituent of cytoskeleton
634	21956	heat shock protein,	S	1.75	71/5.4	3	5	pm	chaperone activity
670	54776	putative thyropin precursor	S	2.43	23/6.3	2	17	s/protinh	evidence at transcript level
710	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	R	3.06	43/5.4	1	5	s/protinh	serine-type endopeptidase inhibitor activity
741	19532	rna-binding protein musashi subunit hrp1	R	2.02	21/9.4	1	7	uc	nucleic acid binding
761	13120	dna-binding protein, putative	S	1.61	24/5.8	5	25	uc	dna binding/ oxidoreductase activity
867	35491	20-hydroxysteroid dehydrogenase, putative	S	2.03	34/6.9	2	7	met/lipd	prostaglandin-e2 9-reductase activity/ oxidoreductase activity
936	36333	electron transfer flavoprotein, alpha subunit, putative	S	2.03	35/8.2	11	36	uc	electron carrier activity
1053	8103	secreted salivary gland peptide	S	3.37	25/7.8	2	15	s	unknown
1076	47306	Peroxiredoxin	S	1.88	24/nc	2	10	uc	peroxidase activity
1079	8103	secreted salivary gland peptide	S	1.72	25/7.8	3	23	s	unknown
1087	12217	myosin alkali light chain	S	1.75	18/4.6	2	18	cs	structural molecule activity-muscle
1089	8103	secreted salivary gland peptide	S	3.07	25/7.8	2	15	s	unknown
1093	13120	dna-binding protein, putative	S	1.52	24/5.8	3	9	uc	dna binding/ oxidoreductase activity

1121	23644	thioredoxin peroxidase	S	1.65	19/5.4	4	27	uc	peroxidase activity
1128	23644	thioredoxin peroxidase	S	1.57	19/5.4	2	15	uc	peroxidase activity
1288	36428	secreted protein	S	2.38	18/6.0	3	12	s	unknown

a) Número do spot recuperado do gel preparativo de LNA. b) Número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus*. c) Origem da amostra que tem significativamente mais proteína; S: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino suscetível; R: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino resistente. #) Representa valor de expressão diferencial. d) Peso molecular e ponto isoelétrico (pI). O pI foi calculado em ExPASy (http://expasy.org/proteomics). e) Os sites do Gene Ontology e Uniprot foram usados para identificar a função molecular prevista.

Tabela 11. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em GSN por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE.

N° do spot [a)]	N° de acesso [b)]	Identificação das proteínas	Origem das amostras [c)]	Valor da expressão diferencial [#)]	Peso Molecular / pI [d)]	N° de peptídeos únicos	% Cobertura da sequência	Função putativa	Função Molecular [e)]
306	22614	heat shock 70 kda protein 5	S	2.57	62/5.2	7	19	pm	chaperone activity
322	80925	elongation factor -1 beta	S	2.96	24/4.9	3	23	ps	translation activity
382	35666	Tropomyosin	R	2.25	29/5.5	3	20	cs	structural molecule activity-muscle
477	36620	60 kda chaperonin 2	R	1.54	23/5.0	8	41	pm	chaperone activity
485	53275	Catalase	R	2.11	47/7.7	11	30	detox/ox	catalase activity
666	24213	ubiquinol--cytochrome c reductase	S	1.81	48/8.0	9	27	met/energy	electron transport
692	6955	serpin-2 precursor	S	2.81	36/nc	4	11	uc	serine-type endopeptidase inhibitor activity
786	105623	hypothetical protein brafldraft	S	4.37	37/4.9	1	6	uc	unknown
807	5446	Tropomyosin	S	2.33	37/nc	8	36	cs	structural molecule activity-muscle
888	80925	elongation factor 1-beta	S	1.30	24/4.9	3	31	ps	translation activity
910	53275	Catalase	S	1.53	47/7.7	3	16	detox/ox	catalase activity
933	68150	acetyl-coa hydrolase, putative	R	1.98	40/nc	3	17	uc	hydrolase/ acetyl-coa hydrolase activity
936	109440	salivary sulfotransferase, putative	R	1.52	36/nc	10	41	s/	transferase
945	45597	glutamine synthetase, putative	R	1.90	45/8.0	5	18	uc	atp binding
954	131287	serine-type enodpeptidase, putative	R	2.15	12/5.5	5	49	s/serprot	hydrolase/ serine-type endopeptidase activity
959	81478	stress-induced-phosphoprotein 1	R	1.54	36/6.4	17	54	uc	binding
1005	109902	hypothetical protein brafldraft	R	2.95	35/5.1	6	25	uc	unknown
1109	16406	secreted protein	S	1.90	27/7.6	14	58	s/	unknown
1150	74798	reductase, putative	R	3.18	25/6.7	5	25	uc	binding/ oxidoreductase activity

1209	122308	Longipain	S	1.52	33/5.3	4	23	uc	cysteine-type endopeptidase activity
1259	80925	elongation factor 1-beta	S	2.21	24/4.9	4	40	ps	translation activity
1261	22614	heat shock 70 kda protein 5	S	2.20	62/5.2	11	24	pm	chaperone activity
1262	5446	Tropomyosin	S	2.52	37/nc	11	26	cs	structural molecule activity-muscle
1394	35416	histamine release factor	S	3.20	20/4.6	2	18	uc	induces the release of histamine by basophils
1676	76983	histone 2b	R	3.44	14/10.5	3	33	uc	structural component of chromatin
1754	130087	histone 1 h4c	R	2.88	11/11.3	5	45	uc	structural component of chromatin
1757	37405	ftp3	R	3.08	45/8.2	2	8	uc	unknown

a) Número do spot recuperado do gel preparativo de GSN. b) Número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus e* . c) Origem da amostra que tem significativamente mais proteína; S: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino suscetível; R: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino resistente. #) Representa valor de expressão diferencial. d) Peso molecular e ponto isoelétrico (pI), NC - pI não foi computado. O pI foi calculado em ExPASy (http://expasy.org/proteomics). e) Os sites do Gene Ontology e Uniprot foram usados para identificar a função molecular prevista.

Tabela 12. Proteínas diferencialmente expressas identificadas em GSF por espectometria de massa, após análises de gel 2-D DIGE.

N° do spot [a)]	N° de acesso [b)]	Identificação das proteínas	Origem das amostras [c)]	Valor da expressão diferencial [#)]	Peso Molecular / pI [d)]	N° de peptídeos únicos	% Cobertura da sequência	Função putativa	Função Molecular [e)]
5665	91634	aconitase cg9244-pb	R	3.02	58/nc	2	6	uc	lyase
5673	33705	radixin, moesin, putative	R	2.02	70/nc	2	4	uc	cytoskeletal protein binding
5680	103346	wd-repeat protein	R	3.80	66/6.1	6	16	uc	myosin heavy chain kinase activity
5730	64496	glycyl-trna synthetase	R	2.24	41/5.9	3	14	uc	atp binding
5742	36885	heat shock 70 kda protein cognate, putative	S	1.77	75/5.9	26		pm	chaperone activity
5749	36885	heat shock 70 kda protein cognate, putative	S	1.75	75/5.9	33	47	pm	chaperone activity
5753	22614	heat shock 70 kda protein 5	S	2.84	62/5.2	34	51	pm	chaperone activity
5781	21956	heat shock protein, putative	R	1.69	71/5.4	18	28	pm	chaperone activity
5807	21956	heat shock protein, putative	S	1.51	71/5.4	30	50	pm	chaperone activity
5813	21956	heat shock protein, putative	S	2.34	71/5.4	18	31	pm	chaperone activity
5817	21956	heat shock protein, putative	S	2.20	71/5.4	36	50	pm	chaperone activity
5847	36885	heat shock 70 kda protein cognate, putative	R	1.64	75/5.9	4	8	pm	chaperone activity
5850	22614	heat shock 70 kda protein 5	R	1.68	62/5.2	8	17	pm	chaperone activity
5854	36885	heat shock 70 kda protein cognate, putative	S	1.92	75/5.9	30	47	pm	chaperone activity
5943	60742	alpha tubulin	S	1.48	50/4.9	2	6	cs	structural constituent of cytoskeleton
5946	67765	aldehyde dehydrogenase, putative	S	1.37	35/6.2	13	61	uc	catalytic and oxidoreductase activity
5953	21956	heat shock protein, putative	S	1.19	71/5.4	7	18	pm	chaperone activity
5957	21956	heat shock protein, putative	R	2.04	71/5.4	1	3	pm	chaperone activity
5987	27512	glutamate carboxypeptidase	R	2.12	53/6.1	15	41	met/aa	carboxypeptidase activity/ protease
5999	22306	beta tubulin	S	1.12	50/4.7	19	63	cs	structural constituent of cytoskeleton

6005	22306	beta tubulin	S	3.32	50/4.7	29	61	cs	structural constituent of cytoskeleton
6029	25106	Enolase	S	1.90	43/5.6	8	26	uc	oxidoreductase activity
6060	25106	Enolase	S	1.68	43/5.6	3	13	uc	oxidoreductase activity
6079	25106	Enolase	R	1.68	43/5.6	30	77	uc	oxidoreductase activity
6082	25106	Enolase	R	2.37	43/5.6	27	74	uc	oxidoreductase activity
6085	61652	26s protease regulatory subunit 6b	S	1.60	46/nc	8	25	st	intracellular degradation activity
6087	4388	f0f1-type atp synthase, beta subunit, putative	S	12.27	59/nc	21	59	uc	hydrogen ion transporting atp synthase activity, rotational mechanism
6090	10535	protein disulfide isomerase-2	S	3.14	41/6.1	5	14	uc	electron carrier activity
6095	25106	Enolase	R	1.75	43/5.6	38	85	uc	oxidoreductase activity
6100	25106	Enolase	R	2.34	43/5.6	1	4	uc	oxidoreductase activity
6104	77958	rpt1 cg1341-pa	S	1.35	49/nc	16	47	uc	intracellular degradation activity/ proteasome
6110	25106	Enolase	S	3.73	43/5.6	4	19	uc	oxidoreductase activity
6115	25106	Enolase	S	3.63	43/5.6	8	29	uc	oxidoreductase activity
6138	81413	hypothetical protein isoform 3	S	1.97	47/nc	5	16	uc	unknown
6146	13811	fructose 1,6-bisphosphate aldolase, putative	S	3.24	38/7.9	12	43	uc	fructose-bisphosphate aldolase activity/ lyase
6163	87792	hsc70-interacting protein	R	1.41	40/4.9	1	5	pm	chaperone activity
6177	25106	Enolase	S	2.68	43/5.6	18	58	uc	oxidoreductase activity
6184	18420	Actin	S	1.78	42/5.3	8	24	cs	structural constituent of cytoskeleton
6189	18420	Actin	S	2.76	42/5.3	14	54	cs	structural constituent of cytoskeleton
6198	18420	Actin	S	2.29	42/5.3	8	35	cs	structural constituent of cytoskeleton
6200	13811	fructose 1,6-bisphosphate aldolase, putative	R	1.92	38/7.9	15	51	uc	fructose-bisphosphate aldolase activity/ lyase
6201	18420	Actin	S	1.52	42/5.3	7	33	cs	structural constituent of cytoskeleton
6203	81413	hypothetical protein isoform 3	R	1.83	47/nc	5	15	uc	unknown
6220	45058	hypothetical protein brafldraft_280706	S	1.79	42/8.1	11	32	uc	oxidoreductase activity
6240	47213	pyruvate dehydrogenase, putative	R	2.95	45/8.6	10	21	uc	oxidoreductase activity
6246	18420	Actin	R	1.81	42/5.3	8	39	cs	structural constituent of cytoskeleton
6256	90985	gtp-specific succinyl-coa synthetase, beta subunit, putative	R	1.81	45/5.4	11	34	uc	atp binding/ligase

6260	25379	Enolase	S	2.96	42/5.5	1	5	uc	oxidoreductase activity
6263	40054	isocitrate dehydrogenase, putative	S	1.41	42/8.0	6	28	uc	nad binding/ oxidoreductase activity
6306	18871	m20 domain-containing peptidase, putative	S	1.39	43/5.8	1	5	s/serprot	hydrolase activity
6319	28662	elongation factor 2 (ef-2) isoform 1	S	2.36	91/5.8	7	11	ps	translation activity
6329	50820	hypothetical protein brafldraft_82840	S	3.65	38/nc	6	22	uc	unknown
6354	30303	sulfotransferase, putative	R	1.82	39/5.7	2	7	met/int	transferase
6355	30303	sulfotransferase, putative	R	1.99	39/5.7	1	4	met/int	transferase
6356	35730	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	R	1.71	42/6.0	4	12	uc	oxidoreductase activity
6405	32144	proteasome subunit alpha type, putative	S	1.75	28/nc	6	30	prot	intracellular degradation activity
6413	99081	Transaldolase	R	4.01	35/6.4	7	30	uc	transferase
6420	99081	Transaldolase	R	7.85	35/6.4	9	33	uc	transferase
6421	23358	bip3; atp binding	S	11.58	61/nc	2	6	pm	atp binding
6424	23358	bip3; atp binding	S	4.05	61/nc	6	18	pm	atp binding
6425	106301	hypothetical protein brafldraft_268698	S	1.77	25/4.8	2	14	uc	ubiquitin thiolesterase activity
6426	40209	reticulocalbin, putative	S	1.71	34/5.0	10	52	uc	calcium ion binding
6511	33690	carbonic anhydrase, putative	S	1.16	31/5.3	3	14	tr	carbonate dehydratase activity/ zinc ion binding
6698	24206	proteasome alpha subunit	S	2.65	26/4.9	5	29	prot	intracellular degradation activity
6711	43455	eukaryotic translation initiation factor 6	R	1.50	26/4.7	2	12	ps	translation initiation factor activity/ protein biosynthesis
6724	47306	Peroxiredoxin	R	2.01	24/nc	11	54	uc	peroxidase activity
6738	54908	glutathione s-transferase, putative	R	1.53	27/6.4	2	12	detox	transferase
6847	104498	small heat shock protein, putative	R	1.39	20/6.1	4	34	pm	chaperone activity
6899	104498	small heat shock protein, putative	R	1.13	20/6.1	1	11	pm	chaperone activity

7041	119220	mitochondrial ribosomal protein l12	S	4.67	21/nc	4	22	ps	structural constituent of ribosome
7131	52223	cytochrome c oxidase subunit va	S	4.60	17/nc	1	7	met/energy	electron transport
7144	40096	actin depolymerizing factor, putative	R	1.71	17/5.7	1	8	cs	structural constituent of cytoskeleton
7170	47306	Peroxiredoxin	S	2.80	24/nc	1	5	uc	peroxidase activity
7187	29445	cytochrome b5, putative	R	1.36	17/5.6	3	18	met/energy	electron transport
7335	130087	histone 1, h4c	R	7.20	11/11.3	3	22	uc	structural component of chromatin
7346	130087	histone 1, h4c	R	3.87	11/11.3	1	12	uc	structural component of chromatin
7370	21573	profilin, putative	R	3.10	14/5.7	4	34	uc	cytoskeleton/ actin binding
7374	21573	profilin, putative	R	3.00	14/5.7	5	39	uc	cytoskeleton/ actin binding
7413	94545	heat shock protein	S	1.79	11/7.9	3	28	pm	chaperone activity

a) Número do spot recuperado do gel preparativo de GSF. b) Número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus*. c) Origem da amostra que tem significativamente mais proteína; S: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino suscetível; R: amostra veio do carrapato que se alimentou no bovino resistente. #) Representa valor de expressão diferencial. d) Peso molecular e ponto isoelétrico (pI), NC - pI não foi computado. O pI foi calculado em ExPASy (http://expasy.org/proteomics). e) Os sites do Gene Ontology e Uniprot foram usados para identificar a função molecular prevista.

É interessante notar que muitas proteínas (como actina, enolases, tubulina, proteína de choque térmico, entre outras) detectadas em mais de 1 spot com peso molecular similar, mas com pI diferente (e vice-versa), uma vez que foram coletados em diferentes regiões dos géis (Figuras suplementares 1-3). Esse aumento do peso molecular e *pI* do mesmo tipo de proteína pode estar associado com a glicosilação e fosforilação de parte da proteína, outras modificações pós-tradução ou representar diferente isoformas da mesma proteína.

Tabela 13. Distribuição das proteínas dos DIGE por classe funcional.

Classe funcional	Número de proteínas encontradas em cada amostra					
	LNARmS	LNARmR	GSNRmS	GSNRmR	GSFRmS	GSFRmR
Conservada desconhecida	7	2	4	8	18	20
Maquinaria de modificação protéica	2	-	2	1	11	7
Citoesqueleto	2	-	2	1	7	2
Secretada	5	1	1	2	1	-
Metabolismo	1	-	1	-	1	4
Síntese protéica	-	-	3	-	2	1
Desintoxicação	-	-	1	1	-	1
Maquinaria de proteassoma	-	-	-	-	2	-
Transdução de sinal	-	-	-	-	1	-
Transportadores e armazenagem	-	-	-	-	1	-

Um estudo avaliou inúmeras análises proteômicas e descobriu que algumas famílias de proteínas parecem predominar em todos as análises. Essa observação acontece independe do experimento, tecido ou da espécie estudada. As proteínas mencionadas são chamadas de proteínas "Déjà vu" (212). Estas proteínas "Déjà vu" estão presentes em vários proteomas de carrapatos (71, 213, 214) e também foram encontradas nas análises DIGE desse estudo: 44% das proteínas encontradas (56 proteínas) podem ser consideradas proteínas "Déjà vu". Estas proteínas estão associadas com citoesqueleto como actinas (7 proteínas, 5.6%), tubulinas (3 proteínas, 2.4%) e tropomiosinas (3 proteínas, 2.4%); atividade oxidoredutase como as enolases (11 proteínas, 8.7%); atividade de chaperona e

antioxidante como as proteínas de choque térmico (10 proteínas, 15.1%) e glutationa transferase (1 proteína, 0.8%); atividade de peroxidase como peroxiredoxina (3 proteínas, 2.4%); atividade de tradução como fator de elongação (4 proteínas, 3.2%); proteassoma como as proteínas de subunidade do proteassoma (3 proteínas, 2.4%); anidrase carbônica (1 proteína, 0,8%) e piruvato desidrogenase (1 proteína, 0.8%), entre outras que podem ser consideradas proteínas "Déjà vu" ou apresentar função desconhecida. Sugerimos que estas famílias de proteínas podem representar respostas comuns de estresse celular ou pode ser um reflexo das limitações da técnica de gel 2-D.

Algumas proteínas consideradas proteínas "Déjà vu", tais como actina e tubulinas encontradas nos RmS e RmR, podem fazer parte das estruturas de larvas não alimentadas e de vesícula do citoesqueleto da glândula salivar que podem ser liberadas com o conteúdo granulares salivares. Além disso, estas proteínas podem estar participando da secreção holocrina ou apócrina que ocorre nas glândulas salivares, como ocorre em carrapato *Argas persicus* (215).

Em relação às proteínas intracelulares encontradas em grandes quantidades nos experimentos DIGE de RmS e RmR (praticamente em todas as amostras), tais como chaperoninas, proteínas ligantes de RNA e DNA, histonas, enolase, fator de alongamento, fator de iniciação da tradução, profilina, transaldolase, proteínas do citocromo e proteína mitocondrial, estas podem estar associadas com a produção de novas proteínas necessárias durante o parasitismo e/ou para manter as estruturas das glândulas salivares, além de estar também associadas ao tipo de amostras usadas (LNA, GSN e GSF).

Exemplo que confirma a observação acima é a presença de proteínas com atividade de chaperona, como proteína delta TCP-1 (Tailless Complex Polypeptide 1) encontrada mais expressa em LNARmS. Essa proteína foi previamente descrita como uma proteína altamente conservada conhecida por atuar como uma chaperona de tubulinas, actinas e possivelmente outras proteínas (216). Outro exemplo é a presença da proteína dissulfeto isomerase-2 que em geral é uma oxiredutase que cataliza a formação, redução e isomerização das ligações dissulfureto nas proteínas presentes no retículo endoplasmático (217, 218). Essas proteínas participam do enovelamento de outras proteínas em conformações necessárias para a estabilidade, atividade catalítica e tráfico (219).

É importante notar a presença da frutose 1,6-bifosfato aldolase, mais expressas em GSFRmR e RmS, embora não existe ligação concreta da função desta enzima em carrapato, tem sido associada a ligar e sequestrar formas soluvéis de Fe (II) (220) e esta

função pode ser requerida em carrapatos, uma vez que as fêmeas necessitam de Fe para maturação dos ovos durante o processo de oviposição.

Já em relação a outras proteínas encontradas que podem apresentar importantes funções durante o parasitismo, como é o caso da serina endopeptidase, serpina-3 (inibidor de serina proteinase), precursor de serpina-2, longipaína, fator de liberação de histamina, catalases, tioredoxina peroxidase, peroxiredoxina e precursor de tiropina estas serão discutidas em mais detalhes abaixo, apesar dessas famílias de proteínas já terem sido descritas no item 4.3 desta seção.

No caso das serina endopeptidases, também conhecidas como serina proteases pertencem ao grupo das proteases que apresentam diversas funções fisiologicas, incluindo digestão, resposta imune, coagulação sanguínea e reprodução. Essas proteínas estão mais expressas em GSNRmR, possivelmente ocorre para facilitar a alimentação sanguínea, digestão do sangue adquirido e transmissão de patógenos por esses carrapatos.

Além disso, LNARmR e GSNRmS expressam serpina-3 e precursor de serpina-2, respectivamente. Algumas serpinas têm sido identificadas e caracterizadas em ovos e larvas de *R. microplus* (221) e estão sendo utilizadas em testes de imunizações. Testes mostram que carrapatos alimentados em coelhos imunizados com serpinas recombinantes apresentaram redução do ingurgitamento e do peso da massa de ovos em relação ao controle. Portanto, este resultado sugere que serpina do carrapato pode ser utilizado como antígeno candidato a uma vacina anticarrapato (106, 222).

Em outro estudo de vacinação em coelho com uma serpina-2 recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (rHLS2) mostra conferir imunidade protetora contra carrapatos (62). Além disso, foi observado em estudo de imunização em bovinos usando a combinação de serpina-3 e serpina-4 de *R. appendiculatus* (RAS-3 e RAS-4), além de uma proteína imunodominante de 36-kDa também de *R. appendiculatus* (RIM36) um aumento nos níveis de anticorpos contra todas as proteínas recombinantes e o antisoro reagiu com antígenos salivares do carrapato. Esses bovinos imunizados mostraram imunidade protetora contra carrapatas fêmeas após desafio (223). Portanto, os carrapatos podem estar usando as serpinas para auxiliá-los durante a obtenção sanguínea em seus hospedeiros. Assim como outras proteínas salivares, as serpinas geralmente não são naturalmente reconhecidas pelos seus hospedeiros, e o motivo pelo qual isso acontece permanece desconhecido.

Também foi observado em GSNRmS um aumento na expressão de longipaína, uma cisteína protease multifuncional que mostra ser essencial para sobrevivência do carrapato e pode desempenhar uma função importante no controle da transmissão de *Babesia ssp* (224). Esta proteína também esta envolvida na digestão do sangue dos seus hospedeiros.

Carrapatos nos quais esse gene foi silenciado apresentaram um aumento no número de hemoparasitas *Babesia ssp* em relação aos carrapatos que continham o gene funcional, sugerindo que a longipaína exerce um efeito protetor contra parasitas de *Babesia* em carrapatos (225).

Outra proteína presente em GSNRmS é o fator de liberação de histamina (HRP). Mulenga e colaboradores (2003) mostraram que HRP é uma proteína citoplasmática envolvida na estrutura de microtubulos que pode ser encontrada na saliva do carrapato (226). Essa proteína quando presente nos espaços extracelulares, como em células mortas, induz degranulação em mastócitos. Em *I. scapularis*, a expressão de HRF coincide com a fase rápida de alimentação de sangue, além de ser concomitante com transmissão de *B. burgdorferi* (158), portanto, essa proteína é crítica para o ingurgitamento e transmissão de patógenos. Interferir na função do HRF, por meio de imunização ativa ou passiva do hospedeiro, reduz o ingurgitamento do carrapato e a carga de *B. burgdorferi* em camundongo (158). Sugerimos que essa proteína esta sendo produzida mais em GSNRmS para facilitar o parasitismo, bem como a transmissão de patógenos. Esse aspecto pode esclarecer a dúvida atual que existe sobre o mecanismo por meio do qual os bovinos zebuínos seriam mais resistentes às doenças causadas por hemoparasitas do que os bovinos taurinos, se por resistência maior ao hemoparasita em si ou por menor exposição ao vetor realizando hematofagia. Esse resultado indica que, além da menor exposição do hospedeiro ao vetor, este vetor também não possui o arsenal proteico que facilitará a transmissão dos hemoparasitas.

Sabemos que em *R. microplus* a digestão é intracelular e que a hidrólise da hemoglobina ocorre em vesícula digestiva resultando em liberação de grande quantidade de heme. Este, junto com H_2O_2, pode participar da reação de Fenton e liderar para produção de radicais hidroxila. Por causa disso, os carrapatos necessitam de catalases para desintoxicação de H_2O_2. Em adição, no DIGE de GSN apresenta uma proteína significativamente mais expressas em GSNRmR e outra proteína em GSNRmS.

Outros estágios do desenvolvimento do carrapato também podem expressar catalases, inclusive fêmeas. Nesse sentido, quando se inibe a função da catalase em fêmeas

ingurgitadas usando 3-amino-1 ,2,4-triazol (AT), o H_2O_2 é aumentado no intestino, junto com aumento da mortalidade e a baixa taxa de postura de ovos. A mortalidade foi revertida empregando injeções exógenas de catalase, confirmando que o aumento de morte de carrapato foi devido a inibição desta enzima por AT (227). Portanto, esta proteína pode ser empregada para desenvolver novo método de controle do carrapato.

Além das catalases, as peroxiredoxinas presentes em GSFRmS e RmR e as tiorredoxinas peroxidases em LNARmS podem ajudar o carrapato na desintoxicação durante o parasitismo/hematofagia, uma vez que estas proteínas foram encontradas diferencialmente expressas em estágios iniciais (LNA) e finais (GSF). O sistema tiorredoxina peroxidase é um sistema conservado e importante na redução de peróxidos, tais como na desintoxicação de H_2O_2. Um estudo utilizando peroxiredoxina recombinante de *H. longicornis* mostrou por análise de imunoblot de gel 2-D que soro de coelho infestado repetidas vezes com *H. longicornis* reage com extrato de carrapato adulto. A análise também revelou que a localização dessa proteína foi altamente expressa em glândula salivar do carrapato, como observado nas análises DIGE desse estudo. Além disso, análise de Northern blot mostrou que o nível dessa proteína estava aumentada durante a alimentação de sangue (224). Assim, estas enzimas podem ser utilizadas pelo carrapato durante alimentação de sangue em uma infestação para auxiliar na desintoxicação, ocasionada pela digestão do sangue.

Uma outra proteína importante encontrada na análise DIGE de LNA, que pode ajudar estas durante o estágio inicial da infestação, foi um precursor de tiropina. Essa proteína está expressa em LNA independente da origem de alimentação sanguínea se resistente ou suscetível. Essa proteína tem função de inibir proteinase dependente de cation ou cisteína, além de participar no controle do processo de apresentação de antígenos (107), conforme descrito no item 4.3.2.

Considerações gerais sobre as análises por DIGE

Em resumo, as análises DIGE mostraram que as diferentes imunidades dos hospedeiros bovinos afetam a composição e expressão proteíca dos carrapatos durante uma infestação. Além disso, identificamos algumas proteínas importantes que os carrapatos usam durante uma infestação em diferentes hospedeiros (resistentes e suscetíveis), tais como serino endopeptidase, serpina-3, serpina-2, longipaína, fator de liberação de histamina, catalase, tiorredoxina peroxidase, peroxiredoxina e tiropina. Estas proteínas

podem ser alvos em potenciais para novas estratégias para o controle do carrapato nos bovinos.

É importante notar também que, embora padronizamos o tempo de coleta das amostras utilizadas nas análises DIGE, devemos estar cientes de que os carrapatos alteram a expressão de genes durante uma infestação, consequentemente o repertório de proteínas. Isso ocorre devido à vários fatores como o clima, tempo e hospedeiro, portanto isso deve ser levado em consideração para futuros estudos.

Outra informação importante é sobre o custo e benefício da análise por DIGE: apesar de revelar muitas informações, esta não mostrou ser tão eficiente como as análises de transcriptomas (454 sequencing) e proteomas (MudPIT), uma vez que o DIGE perde resolução quando são utilizados extratos protéicos complexos, como é o caso das amostras utilizadas nesse estudo. Caso se opte por análise DIGE utilizando extratos protéicos complexos, realizar as focalizações e os géis em tiras de 18 cm ou 24 cm para aumentar a resolução das análises.

4.5. Imunoproteoma

4.5.1. Western Blot de SalivaS, GSFRmS e GSFRmR

Para identificar quais são as proteínas salivares do carrapato *R. microplus* imunogênicas, ou não, em bovinos resistentes ou suscetíveis, foram realizados Western Blots de géis 2D de salivaS, GSFRmS e GSFRmR seguido de espectrometria de massa. Na Figura 11 e nas Figuras suplementares 4 e 5 poderão ser visualizados quais os spots salivares que foram reconhecidos pelos soros dos bovinos resistentes ou suscetíveis e quais foram selecionados para o sequenciamento nas amostras de salivaS, GSFRmS e GSFRmR, respectivamente. Haverá casos em que a visualização do spot está fraca devido à coloração utilizada nos géis preparativos (comassie R-350) que limita a visualização. Além disso, a limitação dos aparelhos empregados na captação das imagens também favorece para essa resolução prejudicada, além do que pode haver diferença entre uma tira/gel para outra. Portanto, alguns spots podem estar representados e identificados nos Western Blots, mas não nos géis ou vice-versa. Nessa situação, os spots foram coletados, sequenciados e serão apresentados a seguir.

Na amostra de salivaS foram identificados aproximadamente 101 spots protéicos, destes, surpreendemtemente, apenas 41 spots foram reconhecidos por soros bovinos, enquanto que 60 spots mesmo presentes na saliva do carrapato não foram reconhecidos por nenhum soro (Figura 11). No Western Blot de salivaS, soros de bovinos suscetíveis não infestados (SSN) reconheceram 14 spots protéicos (a saber, 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 18, 22, 23, 27, 28, 29 e 38) (Figura 11B), sendo que os soros dos mesmos bovinos, porém agora infestados (SSI), reconheceram novamente 14 spots protéicos (a saber, 1, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 26, 28 e 29) (Figura 11C), muito dos quais já tinham sido reconhecidos por estes bovinos antes da infestação (a saber, os spots 1, 5, 6, 7, 11, 28 e 29) (Figura 11B e C). Em adição, os spots 2, 9, 18, 22, 23, 27 e 38 deixam de ser reconhecidos por soros de bovinos suscetíveis após infestação, enquanto que os spots 8, 12, 13, 14, 15, 19 e 26 passaram a ser reconhecidos por estes soros.

Já os soros de bovinos resistentes não infestados (SRN) conseguem reconhecer 19 spots protéicos (1, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 16, 17, 24, 25, 27, 29, 31, 32, 33, 34, 36 e 37), mesmo nunca ter entrado em contato com carrapato (Figura 11D). Após a infestação desses mesmos bovinos (SRI), estes além de permanecer reconhecendo os spots acima (exceto o spot 25), passam a reconhecer também outros 20 spots (a saber, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 30, 35, 39, 40 e 41) (Figura 11E).

Desses spots reconhecidos, apenas 2 spots (28 e 38) foram reconhecidos exclusivamente por soros de bovinos suscetíveis, enquanto que 20 spots (a saber, 2, 3, 10, 16, 17, 20, 21, 24, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35 36, 37, 39, 40 e 41) foram reconhecidos exclusivamente por soros de bovinos resistentes. Em comum, foram reconhecidos 19 spots (a saber, 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 26, 27 e 29) (Figura 11). A identificação e a possivel função de todos esses spots citados acima, bem como de outros não citados estão descritos na Tabela 14 que será descrita no próximo item.

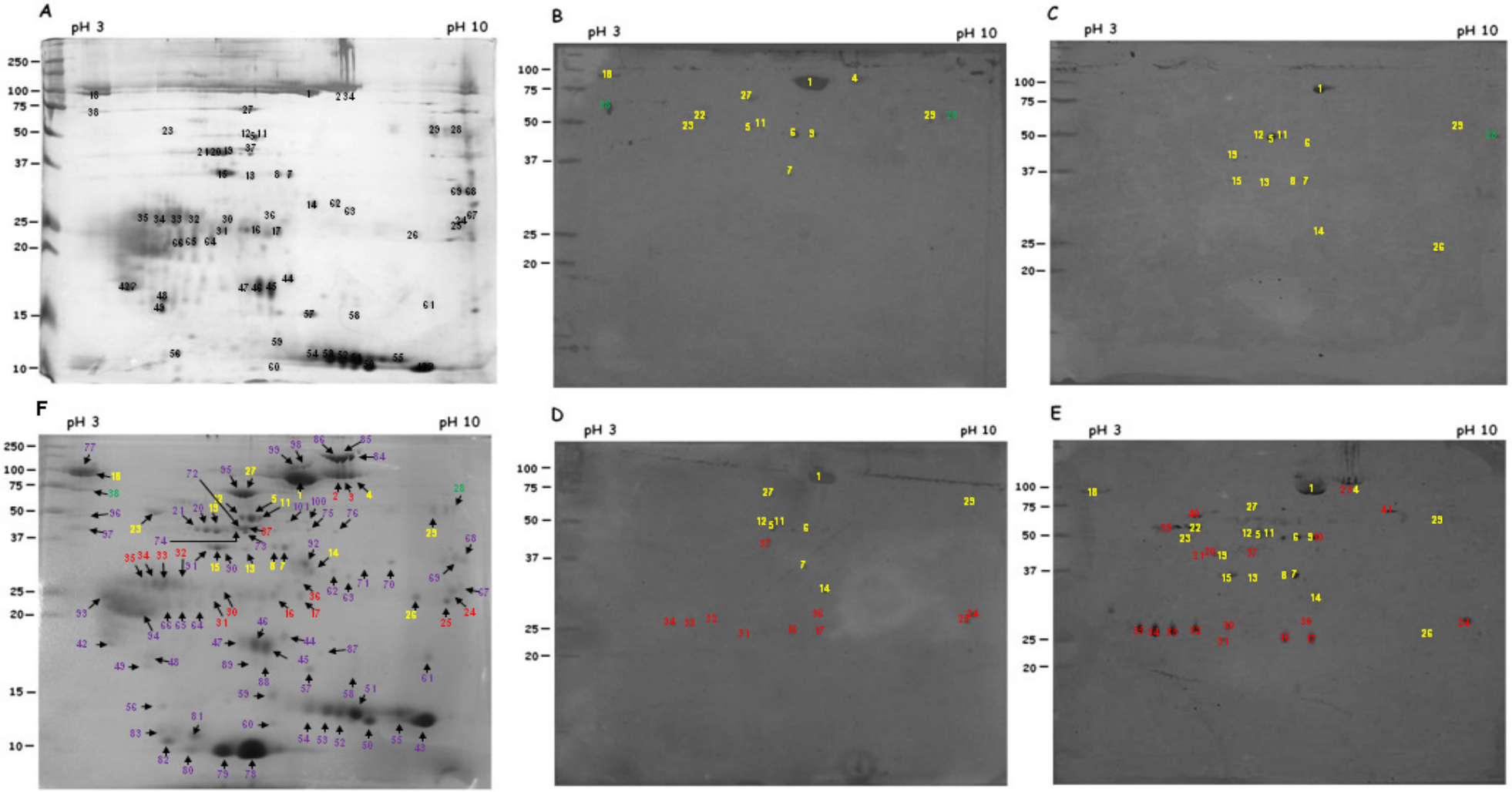


Figura 11. Western Blot 2D de salivaS. SalivaS foi focalizada usando tiras de 13cm pH3-10L. Peso molecular (kDa) está indicado ao lado esquerdo de cada figura. A) Gel de acrilamida 12,5% contendo 100µg de proteína foi corado com prata. B-E) Géis similares ao mostrado em (A),

porém contendo 400µg de proteína foram transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com soros (diluídos 1:100 em forma de *pool)* de bovinos suscetíveis (B e C) ou resistentes (D e E), antes (não infestado) e depois da infestação (larva, ninfa e adulto), respectivamente. Proteína-G conjugada com peroxidase (1:2000) foi usada para o reconhecimento IgGs bovinas. Os spots reconhecidos estão destacados em (F, realizado da mesma maneira que os géis de B-E) e foram recuperados e analisados por sequenciamento de massa. Spots em amarelo são reconhecidos por soros de bovinos suscetíveis e resistentes, em verde são reconhecidos exclusivamente por soros de bovinos suscetíveis, em vermelho exclusivamente por soros de bovinos resistentes e em roxo por nenhum soro. Alguns spots identificados nos Western blot não aparecem em F (ou vice-versa) devido à resolução/qualidade da imagem.

Já em relação aos imunoproteomas empregando amostras de GSFRmS e GSFRmR, estes apresentaram centenas de spots, porém pouquíssimo spots foram reconhecidos pelos soros bovinos (Figuras suplementares 4 e 5). É importante citar que devido à quantidade de spots presentes nesses extratos, muito dos quais confluentes, ficou extremamente difícil de fazer as combinações/sobreposições entre os géis preparativos com os respectivos Western Blots. Os spots duvidosos não foram coletados. Apesar disso, alguns spots reconhecidos, ou não, por soros bovinos foram identificados, selecionados e sequenciados.

No Western blot de GSFRmS, dos inúmeros spots presentes apenas 12 foram reconhecidos por SSN (a saber, 102, 103, 104, 105, 109, 113, 114, 116, 123, 138, 139 e 140) (Figura suplementar 4B). Destes apenas os spots 104, 105, 109 e 116 continuaram sendo reconhecidos por SSI, além de outros 9 spots (a saber, 108, 120, 121, 122, 124, 125, 126, 127 e 128) (Figura suplementar 4C). Os SRN reconheram 17 spots (a saber, 102, 103, 104, 105, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121 e 122). Já os SRI continuaram reconhecendo os spots 104, 105, 108, 111, 109 e 120 além dos spots 106, 107 e 115, sendo que os demais spots deixaram de ser reconhecidos (Figura suplementar 4D).

Em geral, os spots 114, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 138, 139 e 140 foram reconhecidos exclusivamente por soros de bovinos suscetíveis, enquanto que os spots 106, 107, 110, 111, 112, 115, 117, 118 e 119 foram reconhecidos apenas por soros de bovinos resistentes. Já os spots 102, 103, 104, 105, 108, 109, 113, 116, 120, 121 e 122 foram reconhecidos tanto por bovinos resistentes quanto por bovinos suscetíveis. Além desses, outros 12 spots (a saber, 133, 134, 136, 137, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147 e 148) foram recuperados aleatóriamente por não ter sido reconhecido por nenhum soro bovino.

Por fim, no imunoproteoma de GSFRmR, diferentemente o que acontece com as amostras oriundas de carrapatos alimentados em hospedeiros suscetíveis, este apresentou poucos spots reconhecidos por soros bovinos. Além disso, dos poucos que foram reconhecidos ficaram difícil de identificar o seu correspondente no gel preparativo, consequentemente difícil de coletar e sequenciar. Resumidamente, os SSN reconheceram aproximadamente 6 spots, porém apenas 1 foi identificado (135) (Figura suplementar 5B), já os SSI reconheceram aproximandamente 21 spots, porém apenas 5 spots foram identificados (129, 130, 131, 132 e 135) (Figura suplementar 5C). Já os SRN reconheceram aproximadamente 2 spots, porém nenhum foi identificado (Figura suplementar 5D), e os SRI reconheceram aproximadamente 17 spots, mas apenas 3 foram identificados (129, 130 e 131) (Figura suplementar 5E). Os spots 135 e 132 foram

identificados exclusivamente por soros de bovinos suscetíveis, enquanto que os spots 129, 130 e 131 foram reconhecido por ambas as raças (Figura suplementar 5).

Em geral, nota-se que os bovinos resistentes, mesmo antes da infestação, conseguem reconhecer mais proteínas da saliva e GS de fêmeas alimentadas em bovinos suscetíveis, do que os próprios bovinos suscetíveis, mesmo após a infestação destes. Assim, esses resultados sugerem que o bovino resistente tem uma vantagem ao conseguir neutralizar, desde o início do ciclo parasitário, os componentes salivares enquanto que nos bovinos suscetíveis a neutralização é mais tardia permitindo que o carrapato se estabeleça mais facilmente. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, os quais mostram que hospedeiros bovinos resistentes apresentam níveis menores de imunoglobulinas totais em relação aos hospedeiros bovinos suscetíveis, e mesmo assim os resistentes possuem mais anticorpos específicos para proteínas salivares dos carrapatos do que os suscetíveis, inclusive de carrapato alimentado em hospedeiros bovinos suscetíveis (193).

O reconhecimento de spots por soros de bovinos não infestados possivelmente pode ocorrer devido à reação cruzada entre antígenos de outros artropódes que parasitam esses hospedeiros, tais como bernes e moscas do cifre, ou pode ser devido à presença de anticorpos naturais presentes na circulação desses bovinos. Em humanos estes anticorpos naturais são produzidos independente da estimulação antigênica e possivelmente estão associados com a resposta imune inata na defesa contra patógenos, uma vez que apresenta alta afinidade por grupos de carbonos presentes nas membranas de muitos patógenos (228). Já em ovinos, os animais que aguentam infestações com endoparasitas são aqueles que possuem níveis maiores de anticorpos naturais, anticorpos esses que parece confererir proteção contra os endoparasitas (229). Assim, a presença desses anticorpos naturais pode ser importante para a sobrevivência em ambientes naturais, onde os indivíduos são frequentemente expostos a parasitas, como é o caso dos bovinos em relação aos carrapatos. Portanto, independente de como acontece o reconhecimento de proteínas pelos soros desses bovinos sem exposição prévia de carrapato, isso ocorre com maior frequência em bovinos resistentes.

É durante o estágio inicial da fixação, especialmente no estágio de larva, em que acontece uma reação inflamatória nesses hospedeiros decorrente da lesão sofrida pela picada do carrapato. Essa reação inflamatória geralmente é mais intensa em hospedeiros resistentes (21). Também foi demonstrado que proteínas que apresentam atividades

antiinflamatórias são produzidas em maior quantidade em hospedeiros suscetíveis, enquanto que proteínas associadas com atividades proinflamatórias são produzidas mais por hospedeiros resistentes (17). Assim, estes resultados sugerem que os hospedeiros resistentes são mais eficientes em reconhecer proteínas salivares do carrapato, principalmente durante os estágios iniciais da infestação, consequentemente estes hospedeiros podem interfirir com mais eficiência a progressão da infestação por carrapato. Além disso, essas proteínas reconhecidas por soros de hospedeiros resistentes, bem como as não reconhecidas por nenhum soro bovino podem ser candidatos importantes para futuras alternativas de controle do carrapato.

A seguir serão apresentados os resultados da espectrometria de massa dos spots reconhecidos, ou não, por soros bovinos.

4.5.2. Resultados dos sequenciamentos dos spots previamente selecionados

Os spots reconhecidos, ou não, por soros bovinos estão descritos na Tabela 14. Esta tabela mostra os números dos spots com os seus respectivos número de acesso no sialotranscriptoma (Tabela suplementar 2), identificação das proteínas, peso molecular, soro que a proteína foi reconhecida, número de peptídeo único, porcentagem de cobertura da sequência e de qual imunoproteoma foi recuperada. Nota-se que em alguns spots existem mais de uma proteína identificada, isso pode ser devido à complexidade das amostras. Além disso, é importante informar que alguns spots selecionados não apresentaram resultados durante o sequenciamento devido problemas inerentes à técnica de sequenciamento, portanto não serão apresentados na Tabela 14.

A função no parasitismo de todas as proteínas identificadas nestes imunoproteomas já foi discutida anteriormente neste trabalho, portanto aqui destacaremos apenas as proteínas que são reconhecidas exclusivamente por soros de bovinos resistentes ou por soros de bovinos suscetíveis, bem como as proteínas que não são reconhecidas por nenhum soro, isto é, os antígenos silenciosos.

Das proteínas salivares reconhecidas exclusivamente por soros de bovinos suscetíveis estão proteínas constituivas do carrapato, como fator de tradução- alongamento EF-1 alfa-Tu (spot 28), proteína de choque térmico e proteína hipotética BRAFLDRAFT

(spot 38), microplusina e proteína ligante de RNA (spot 114), calponina, proteína choque térmico e ATP sintase (spots 123, 128 e 139), hidrolase (spots 125 e 126), glutamato dehidrogenase (spot 127), gluationa S transferase, peroxiredoxina e 14-3-3 CG17870-PA (spot 132) e calreticulina e AGAP008822-PA (spot 138).

Entre as proteínas reconhecidas exclusivamente por soros de bovinos resistentes estão as proteínas lospina 8 (apenas o spot 10), proteínas secretadas não caracterizadas (spots 16, 17, 31, 32, 33, 34, 35, 36 e 117), proteínas que interagem com lípideos (spots 16 e 17), serpinas, actina, longipaína e cisteinas proteinase B semelhante catepsina (spots 20, 21, 30), glutationa S transferasae, ENSANGP00000022132, peroxidase e proteínas secretadas (spot 24, 25), enolase (30), 14-3-3 CG17870-PA (spot 33, 34 e 115), vitelogenina-1, apolipoforina e filboina (spot 37), chaperonina e isomerases (spot 40, 107), espermidina sintáse, proteínas ribossomais e anidrase carbônica (spot 106), transaldolase (spot 110), proteína de choque térmico (spot 117) e tioredoxina peroxidase (spot 119).

Em relação as proteínas reconhecidas por ambos os hospedeiros estão anticoagulante rhipilin-1 e corepressor que interage com CBF1 (spot 1), proteínas secretadas hipotéticas e/ou não caracterizadas (spots 1, 8, 14, 15, 26, 27 e 102), lospina 8 (spots 5, 6, 7, 8, 11, 12 e 13), CRISP-3 (spot 9), proteína lissosomal (spot 11), serpinas (spots 12 e 19), tiropina (spot 14), vitelogenina-1 e apolipoforina (spot 18), longipaínas e cisteina proteina B semelhante catepsina (spot 19), tubulina, actina e ATP sintase (spots 22, 121 e 122), catepsina D2 e fator de tradução alongamento EF-1 alfa-Tu (spots 29, 121 e 122), proteína de choque térmico (spots 103, 105 e 116), enoil-CoA hidratase (spots 104, 105 e 108), isomerases e tropomiosina (spots 108 e 109), fosfoproteína 1 induzida por estresse (spot 109), proteína de calor pequena (spot 113), 14-3-3 CG17870-PA e fator de iniciação da tradução 3, subunidade G (spots 116, 130 e 131), acetil CoA acetiltransferase e frutose 1,6 bifosfata aldolase (spot 120), alanina aminotransferase e dehidrogenase dependente NADP (spot 122) e anidrase carbónica (spot 129).

Apesar de muitas proteínas importantes no parasitismo serem reconhecidas por soros de hospedeiros resistentes e suscetíveis, estas proteínas em hospedeiros resistentes são reconhecidas já em uma fase inicial, uma vez que SRN reconhecem muitas dessas proteínas e estas permanecem sendo reconhecidas após a infestação do carrapato (SRI). Já em hospedeiros suscetíveis esses reconhecimentos acontecem geralmente por SSI, ou seja, em uma fase mais tardia. Essa observação, juntamente com a observação encontrada no sialotranscriptoma onde foi visto que muitas familias de transcritos associadas com

modulação de respostas do hospedeiro estão mais expressos em RmS, sugere que os carrapatos conseguem suprimir com mais eficácia a imunidade que geraria anticorpos específicos neutralizantes da saliva. Além disso, as respostas humorais que efetivamente montam são especificas para proteínas que pouca ou nenhuma relevância têm no parasitismo. Surge, portanto, a possibilidade de que certas proteínas salivares seriam chamarizes cuja função seria desviar o foco da resposta imune.

No geral, 54 proteínas salivares (maracadas com * na tabela 14) podem estar diretamente associadas ao parasitismo, tais como anticoagulante rhipilin-1, CRISP3, chitinase, serpinas, tiropinas, longipaínas, cistatina, inibidores de elastase de neutrófilo, proteínas contendo domínio ML, proteínas de cimento e microplusinas. Dessas, 3 proteínas são reconhecidas exclusivamente por soros de hospedeiros resistentes (a saber, spots 20, 21 e 30), 1 proteína por soros de hospedeiros suscetíveis (a saber, spot 114), 5 proteínas por ambos os hospedeiros (a saber, spots 1, 9, 12, 14 e 19) e interessantemente 25 proteínas não são reconhecidas por nenhum soro (a saber, spots 44, 45, 46, 47, 54, 56, 57, 59, 60, 72, 73, 74, 75, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 88, 89, 92, 97, 98 e 141) (Tabela 14). Portanto, estas 54, bem como outras proteínas não caracterizadas reconhecidas por soros bovinos resistentes, tais como spots 16, 17, 24, 32 e outras, podem ser consideradas antígenos vacinais em potencial por serem antígenos silenciosos. A utilidade de proteínas com essa característica de conferir imunidade protetora contra infestações já foi demonstrado (30), sendo possível torná-las imunogênicas com adjuvantes que induzem anticorpos neutralizantes.

O que torna esses antígenos ainda mais intrigantes e interessantes é o fato de que algumas dessas proteínas foram recuperadas em regiões diferentes dos géis, portanto com peso molecular e pI diferentes, e não foram reconhecidas por nenhum soro, inclusive por soros de animais que as receberam (SSI). Por exemplo, as cistatinas, inibidores de elastase de neutrófilo, serpinas, longipaínas, microplusinas, proteínas contendo domínio ML, dentre outras. A presença dessas proteínas em diferentes regiões dos géis pode ser devido às modificações póstraducionais (glicosilações e fosforilações) que ocorrem em parte das proteínas ou pode representar isoformas diferentes da mesma proteína. Isso possivelmente esta sendo utilizado pelo carrapato como mecanismo de escape das respostas efetoras dos hospedeiros.

Outra informação importante se refere à presença de proteínas constitutivas/ intracelulares do carrapato em sua saliva, tais como actinas, tubulinas, chaperonas e outras proteínas intracelulares. Esses constituintes podem ser secretados por vias não

convencionais na saliva do carrapato, sendo que algumas dessas proteínas não são reconhecidas por nenhum soro, e outras são reconhecidas, inclusive por soro de bovinos resistentes infestados, como actina, tubulinas (spot 22), dentre outras. A função desses constituintes na saliva ainda permanece desconhecida. Esses constituintes também foram observados nos experimentos de DIGE.

Os resultados obtidos nos imunoproteomas foram importantissímos para confirmar alguns antígenos que já tinham sido pré-selecionadas nos proteomas e sialotranscriptomas do *R. microplus*. Essas proteínas podem ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas multicomponentes anticarrapato. Além disso, estes resultados serviram também para melhorar o entendimento de como as diferentes respostas imune humoral dos hospedeiros resistentes e suscetíveis se comportam frente aos antígenos salivares do carrapato em uma infestação.

Tabela 14. Identificação dos spots protéicos reconhecidos, ou não, nos imunoproteomas de SalivaS, GSFRmS e GSFRmR.

	N° do spot	N° acesso[a]	Identificação das proteínas	Peso molecular (kDa)[b]	Reconhecida por?[c]	N° de peptídeos únicos	% Cobertura da sequência	Amostra?
*		109972	anticoagulant protein rhipilin-1	17	SRN e SRI;	1	13	
	1	50205	CBF1-interacting corepressor	30	SSN e SSI	1	3	SalivaS
		110513	hypothetical protein	3		1	3	
	5	113489	lospin 8	43	SSI; SRN e SRI	20	47	SalivaS
	6	113489	lospin 8	43	SRN e SRI; SSN e SSI	5	18	SalivaS
	7	113489	lospin 8	43	SRN e SRI;	3	14	SalivaS
		38904	secreted protein	38	SSN e SSI	7	31	
	8	113489	lospin 8	43	SRI e SSI	2	9	SalivaS
		38904	secreted protein	38		5	23	
*	9	111414	CRISP3- cysteine-rich secretory protein	46	SSN e SRI	1	3	SalivaS
	10	113489	lospin 8	43	SRI	1	5	SalivaS
	11	113489	lospin 8	43	SRN e SRI;	8	30	SalivaS
		171727	lysosomal acid phosphatase	26	SSN e SSI	2	15	
*		39744	putative chitinase	45		2	7	
*	12	6955	serpin-2 precursor	36	SRN e I;	2	8	SalivaS
		113489	lospin 8	43	SSI	7	22	
	13	113489	lospin 8	43	SRI; SSI	4	13	SalivaS
		77570	putative salivary secreted protein	25		1	5	
		71787	hypothetical protein	22	SRN e I; SSI	2	15	
*	14	54776	putative thyropin precursor	23		2	17	SalivaS
		85307	putative salivary secreted protein	27		2	12	
	15	128399	putative salivary secreted protein	36	SRI e SSI	18	73	SalivaS
	16	128399	secreted protein, putative	36	SRN e SRI	7	40	SalivaS

		113785	salivary lipid interacting protein, putative	20		5	25	
	17	128399	secreted protein, putative	36	SRN e SRI	3	15	SalivaS
		113785	salivary lipid interacting protein, putative	20		7	31	
		43508	vitellogenin-1	97		2	14	
	18	31546	apolipophorin, putative	89	SRN e SRI	5	7	SalivaS
		43509	vitellogenin-1	182		7	7	
*		106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		3	30	
		18420	Actin	42		3	10	
*	19	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	SRI; SSI	11	33	SalivaS
*		122308	Longipain	33		6	25	
		39114	cathepsin L-like cysteine proteinase B	38		6	28	
*		106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		1	33	
		18420	Actin	42	SRI	4	15	
*	20	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		15	42	SalivaS
*		122308	Longipain	33		4	16	
		39114	cathepsin L-like cysteine proteinase B	38		1	5	
		39114	cathepsin L-like cysteine proteinase B	38		1	5	
*	21	122308	Longipain	33	SRI	3	15	
*		106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		15	42	SalivaS
		18420	Actin	42		6	22	
		22310	beta tubulin	35		1	5	
		7197	beta tubulin	53	SSN; SRI	2	10	
	22	18420	Actin	42		2	24	SalivaS
		4388	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	59		2	29	
		22306	beta tubulin	50		11	30	
		111630	glutathione S-transferase	31		1	3	
		67998	ENSANGP00000022132	25		2	11	
	24	83247	putative salivary secreted protein	25	SRN e SRI	2	13	SalivaS
		8103	secreted salivary gland peptide, putative	25		3	13	
		26121	selenium dependent salivary glutathione	18		12	68	

		peroxidase					
25	8103	secreted salivary gland peptide, putative	25	SRN	1	9	SalivaS
	111630	glutathione S-transferase	31		3	9	
26	8103	secreted salivary gland peptide, putative	25	SSI e SRI	8	32	SalivaS
27	8103	secreted salivary gland peptide, putative	25	SRN e SRI; SSN	2	13	SalivaS
28	13343	translation elongation factor EF-1 alpha-Tu	51	SSN e SSI	2	7	SalivaS
29	13343	translation elongation factor EF-1 alpha-Tu	51	SSN e SSI;	1	2	SalivaS
	14491	cathepsin D2	42	SRN e SRI	1	3	
*	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	SRI	1	8	
30	174664	putative secreted protein	21		1	7	SalivaS
	25106	Enolase	43		3	9	
	178127	putative secreted protein	21		2	10	
	164102	secreted protein	23	SRN e SRI	2	16	
31	32190	uncharecterized protein	17		2	18	SalivaS
	164103	secreted protein	23		2	24	
	174664	putative secreted protein	21		3	31	
32	171393	putative secreted protein	18	SRN e SRI	1	11	SalivaS
	174664	putative secreted protein	21		4	32	
	178127	putative secreted protein	21		2	16	
	164103	secreted protein	23	SRN e SRI	3	25	
33	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27		4	23	SalivaS
	171393	putative secreted protein	18		4	17	
	174664	putative secreted protein	21		4	32	
	174664	putative secreted protein	21		5	41	
34	178127	putative secreted protein	21	SRN e SRI	3	31	SalivaS
	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27		2	10	
	171393	putative secreted protein	18		1	11	
	178127	putative secreted protein	21		2	16	
35	171393	putative secreted protein	18	SRI	2	17	SalivaS

		108605	putative secreted protein	24		3	12	
	36	113785	salivary lipid interacting protein, putative	20	SRN e SRI	2	15	SalivaS
		4142	heavy-chain filboin, putative	44		1	3	
	37	31546	apolipophorin, putative	89	SRN e SRI	1	2	SalivaS
		43507	vitellogenin-1	158		2	3	
	38	121267	hypothetical protein BRAFLDRAFT_287019	45	SSN	2	8	SalivaS
		21956	heat shock protein, putative	71		5	11	
		9166	Protein disulfite isomerase-2	39		1	6	
	40	30215	chaperonin subunit, putative	65	SRI	4	12	SalivaS
		10534	protein disulfite isomerase-2	39		4	14	
	42	184392	putative secreted protein	20	-	2	17	SalivaS
*	44	172281	microplusin preprotein-like	15	-	2	12	SalivaS
		36482	secreted protein, putative	18		1	6	
*	45	172281	microplusin preprotein-like	15	-	1	10	SalivaS
*		172281	microplusin preprotein-like	15		2	16	
	46	188986	putative secreted protein	17	-	1	7	SalivaS
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12		3	25	
	47	188986	putative secreted protein	17		3	15	SalivaS
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12	-	2	23	
	50	43036	hypothetical protein AaeL_AAEL011663	63	-	1	1	SalivaS
*	54	125105	neutrophil elastase inhibitor	12	-	1	10	SalivaS
*	56	54809	putative secreted cystatin	15	-	2	24	SalivaS
		75296	alpha tubulin, putative	51		1	3	
*	57	125558	ML domain-containing protein, putative	12	-	2	21	SalivaS
		18420	Actin	42		4	14	
	59	34860	fatty acid-binding protein FABP, putative	15	-	2	10	SalivaS
*		117512	neutrophil elastase inhibitor	16		2	20	
*	60	117512	neutrophil elastase inhibitor	16	-	3	27	SalivaS
	62	77570	putative salivary secreted protein	25	-	3	9	SalivaS
	63	85307	putative salivary secreted protein	27	-	2	12	

	64	174664	putative secreted protein	21	-	1	8	SalivaS
		178117	putative secreted protein	20		5	17	
	65	178117	putative secreted protein	20	-	3	17	SalivaS
	66	178117	putative secreted protein	20	-	3	10	SalivaS
	67	83247	putative secreted protein	25	-	3	14	SalivaS
*	72	106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	7	23	SalivaS
*		6955	serpin-2 precursor	36		10	23	
*	73	106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	11	40	SalivaS
*		106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		8	27	
*		6955	serpin-2 precursor	36		11	27	
*	74	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	1	20	SalivaS
		39114	cathepsin L-like cysteine proteinase B	38		2	11	
		18420	Actin	42		2	9	
		10098	conserved hypothetical protein	39		2	9	
*	75	106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	4	15	SalivaS
*		6955	serpin-2 precursor	36		2	8	
	76	77570	putative salivary secreted protein	25	-	2	5	SalivaS
	77	43509	vitellogenin-1	182	-	3	2	SalivaS
*	78	149048	neutrophil elastase inhibitor	12	-	6	46	SalivaS
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12		10	71	
		75296	alpha tubulin, putative	51		1	3	
	79	22306	beta tubulin	50		3	10	
*		149048	neutrophil elastase inhibitor	12	-	6	46	SalivaS
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12		11	71	
*	80	149048	neutrophil elastase inhibitor	12	-	3	46	SalivaS
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12		7	71	
*	81	149048	neutrophil elastase inhibitor	12		1	10	
*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12	-	1	10	SalivaS
		92814	asparaginyl-tRNA synthetase	59		1	2	
*	82	149048	neutrophil elastase inhibitor	12	-	2	18	SalivaS

*		125105	neutrophil elastase inhibitor	12		5	33	
		133320	unnamed protein product	6		1	31	
		6026	ATP-dependent RNA helicase, putative	99		1	1	
		107453	guanylate-binding protein, putative	65		1	2	
*		8831	putative cement protein	27		1	5	SalivaS
	85	117585	Ras-associated protein 2-like CG3204-PA, isoform A	21	-	1	9	
		125369	hypothetical protein IscW_ISCW023265	37		1	3	
		57845	coatomer subunit delta	58		1	3	
		80968	ADP-ribosylation factor interacting protein, putative	27		1	5	
	87	106981	cyclophilin B precursor, putative	21	-	2	17	SalivaS
*	88	172281	microplusin preprotein-like	15	-	1	10	SalivaS
*	89	125105	neutrophil elastase inhibitor	12	-	2	23	SalivaS
		38904	secreted protein, putative	38		1	4	
	90	8303	matricellular protein osteonectin-SPARC-BM-40, putative	35	-	4	13	SalivaS
		128399	secreted protein, putative	36		10	43	
	91	128399	secreted protein, putative	36	-	9	40	SalivaS
		61864	putative salivary secreted protein	25		1	6	
		128399	secreted protein, putative	36		1	5	
	92	77570	putative salivary secreted protein	25	-	1	5	SalivaS
*		54777	putative thyropin precursor	23		5	30	
	93	178127	putative secreted protein	21	-	3	16	SalivaS
		174677	putative secreted protein	19		1	7	
		178117	putative secreted protein	20		2	7	
	94	203249	putative secreted protein	11	-	2	23	SalivaS
		178127	putative secreted protein	21		3	16	
		176335	putative secreted protein	14		4	47	
	95	21956	heat shock protein, putative	71	-	3	4	

	96	171727	lysosomal acid phosphatase, putative	26	-	1	8	SalivaS
		113489	lospin 8	43		5	12	
*		122308	Longipain	33		1	4	
		39114	cathepsin L-like cysteine proteinase B	38		1	5	
*	97	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	2	24	SalivaS
		18420	Actin	42		3	15	
*		6955	serpin-2 precursor	36		6	16	
*		106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		7	25	
		6064	hypothetical protein IscW_ISCW004528	73		1	2	
*	98	106321	serine proteinase inhibitor serpin-3	43	-	1	5	
*		106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		2	14	SalivaS
		43509	vitellogenin-1	182		10	7	
	99	43509	vitellogenin-1	182	-	24	16	SalivaS
	100	105653	esterase, putative	60	-	13	31	SalivaS
	101	112943	cathepsin C precursor	51	-	2	3	SalivaS
		105653	esterase, putative	60		3	8	
	102	13935	hypothetical protein TcasGA2_TC009978	43	SRN ; SSN	4	9	GSFRm**S**
	103	94545	heat shock protein	11	SRN ; SSN	4	36	GSFRm**S**
	104	98961	enoyl-CoA hydratase, putative	31	SRN e SRI; SSN e SSI	4	18	GSFRm**S**
	105	21956	heat shock protein, putative	71	SRN e SRI;	4	8	
		98961	enoyl-CoA hydratase, putative	31	SSN e SSI	9	34	GSFRm**S**
		170244	spermidine synthase, putative	19		1	8	
	106	5934	ribosomal protein P0	35	SRI	2	10	GSFRm**S**
		33690	carbonic anhydrase, putative	31		4	16	
		9166	protein disulfide isomerase-2	39		1	23	
	107	10535	protein disulfide isomerase-2	41	SRI	7	27	GSFRm**S**
		30215	chaperonin subunit, putative	65		8	19	
		9167	protein disulfide isomerase-2	44		10	27	
		58147	glucose de-repression and pre-vacuolar sorting	25		1	6	

	108		protein, putative		SSI;			
		39539	translation initiation factor eIF3, p35 subunit, putative	20	SRN e SRI	1	8	GSFRm**S**
		9167	protein disulfide isomerase, putative	44		1	4	
		5447	Tropomyosin 1 CG4898-PA, isoform A	28		7	28	
	109	5447	Tropomyosin 1 CG4898-PA, isoform A	28	SRN e SRI;	1	5	
		81478	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70-Hsp90-organizing protein) isoform 1	36	SSN e SSI	2	8	GSFRm**S**
	110	99081	transaldolase	35	SRN	3	9	GSFRm**S**
	113	104498	small heat protein, putative	20	SRN ; SSN	4	27	GSFRm**S**
*	114	172281	microplusin preprotein-like	15	SSN	2	10	GSFRm**S**
		2989	RNA-binding protein musashi, putative	33		4	11	
	115	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27	SRI	1	6	GSFRm**S**
		111966	translation initiation factor 3, subunit G	32		1	3	
	116	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27	SSN e SSI;	1	6	GSFRm**S**
		21956	heat shock protein, putative	71	SRN	11	19	
	117	21956	heat shock protein, putative	71	SRN	4	8	GSFRm**S**
		16406	secreted protein, putative	27		2	7	
	119	23644	thioredoxin peroxidase	19	SRN	2	15	GSFRm**S**
	120	37286	acetyl-CoA acetyltransferase, putativ	51		3	9	GSFRm**S**
		13811	fructose 1,6-bisphosphate aldolase, putative	38	SSI; SRN e SRI	8	29	
		32058	alanine aminotransferase	58		2	7	
	121	49435	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	60	SSI e SRN	3	10	
		56055	hypoxia up-regulated protein, putative	98		3	4	GSFRm**S**
		13343	translation elongation factor EF-1 alpha-Tu	51		11	35	
		32058	alanine aminotransferase	58		3	10	
		49435	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	60		11	27	
	122	56055	hypoxia up-regulated protein, putative	98	SSI e SRN	2	3	GSFRm**S**
		13343	translation elongation factor EF-1 alpha-Tu	51		5	19	

	96482	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	50		1	3	
	7264	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	58		4	27	
	44848	calponin, putative	21		1	7	
123	104496	small heat shock protein, putative	22	SSN	1	7	GSFRm**S**
	49435	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	60		1	3	
125	68150	acetyl-CoA hydrolase, putative	40	SSI	2	8	GSFRm**S**
126	68150	acetyl-CoA hydrolase, putative	40	SSI	2	8	GSFRm**S**
127	21899	glutamate dehydrogenase, putative	62	SSI	4	10	GSFRm**S**
128	49435	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit	60	SSI	1	3	GSFRm**S**
129	33690	carbonic anhydrase, putative	31	SRI ; SSI	2	9	GSFRm**R**
130	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27	SRI ; SSI	2	12	GSFRm**R**
	49203	conserved hypothetical protein	14		2	22	
131	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27	SRI ; SSI	2	10	GSFRm**R**
	20757	14-3-3 CG17870-PA, isoform A isoform 2	27		1	6	
132	111631	glutathione S- transferase	22	SSI	1	4	GSFRm**R**
	47306	Peroxiredoxin	24		1	5	
133	36333	electron transfer flavoprotein, alpha subuni	35	-	3	13	GSFRm**S**
134	36333	electron transfer flavoprotein, alpha subuni	35	-	1	4	GSFRm**S**
	16406	secreted protein, putative	27		12	49	
136	21956	heat shock protein, putative	71	-	1	3	GSFRm**S**
	110265	electron transfer flavoprotein, beta subunit	28		4	24	
137	2534	Calreticulin	48	-	14	37	GSFRm**S**
138	2534	Calreticulin	48	SSN	2	8	GSFRm**S**
	97944	AGAP008822-PA	18		4	30	
139	79998	ATP synthase D chain	20	SSN	2	18	GSFRm**S**
	53913	heat shock protein HSP 90-alpha isoform 1	72		2	4	
141	21956	heat shock protein	71	-	2	4	
*	106322	serine proteinase inhibitor serpin-3	43		3	17	GSFRm**S**
	18420	actin	42		5	24	
	18420	actin	42		1	8	

142	25379	enolase	42	-	1	34	GSFRm**S**
	25106	enolase	43		14	47	
143	23358	BIP3; ATP binding	61	-	1	16	GSFRm**S**
	22614	heat shock 70 kDa protein 5	62		11	24	
	53915	heat shock protein HSP 90-alpha 90-kDa heat shock protein alpha	42	-	1	4	GSFRm**S**
144	46608	valosin containing protein	41		3	12	
	46609	valosin containing protein	59		9	21	
146	110619	thioredoxin-dependent peroxide reductase	27	-	1	4	GSFRm**S**
	23645	thioredoxin peroxidase	26		3	14	
147	47306	peroxiredoxin	24	-	4	19	GSFRm**S**
	56542	protein disulfide isomerase	57		1	15	
148	48968	chaperonin	59	-	1	2	GSFRm**S**
	56321	protein disulfide isomerase	45		13	36	

a- Número de acesso a sequência no sialotranscriptoma (Tabela suplementar 2). **b-** Peso molecular fornecido pelo software Scalfold. **c**- Proteína reconhecida por soro de bovinos resistentes ou suscetíveis infestados (SRI ou SSI, respectivamente),ou não (SRN ou SSN, respectivamente), com o carrapato. Critérios usados para identificação de cada sequência: mínimo de 1 peptídeo, 90% probabilidade de ser a proteína e 90% de probabilidade de ser o peptídeo. Os asteriscos (*) do lado esquerdo da tabela indicam as principais proteínas que possam estar associadas ao parasitismo/hematofagia.

CONCLUSÃO

5. Conclusão

As estratégias utilizadas foram adequadas para cumprir os objetivos propostos neste trabalho, obtendo resultados satisfatórios que permitiram concluir que:

- ❖ A resposta imune dos hospedeiros geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos afeta diferentemente a expressão de genes e a produção de proteínas dos constituintes salivares em *R. microplus*.
- ❖ O carrapado modifica os seus constituintes salivares de acordo com seu ciclo de vida e origem de refeição sanguínea.
- ❖ Os carrapatos modificam os seus constituintes salivares, possivelmente para evadir das respostas imunes de seus hospedeiros.
- ❖ Os carrapatos alimentados em hospedeiros resistentes apresentam uma maior expressão de transcritos associados com fixação (proteínas de cimento, cola, seda e outras), enquanto que os carrapatos alimentados em hospedeiros suscetíveis têm uma expressão maior de transcritos relacionados com função antihemostática, antiinflamatórias e imunossupressores (proteínas contendo domínio kunitz, metaloproteases, cistatinas, domínio kazal, inibidor de carboxipeptidase, chimadanina, proteínas contendo cauda básica ou ácida, lipocalinas e outras), e esse fato é confirmado em nível protéico.
- ❖ Os carrapatos alimentados em hospedeiros suscetíveis apresentam uma maior expressão de transcritos associados com a modulação da resposta imune do hospedeiro, como DAP-36 imunossupressora, evasinas e longicornsinas.
- ❖ Os carrapatos expressam grande quantidade de transcritos associados com peptídeos antimicrobianos, tais como microplusinas, defensinas, longicornsina, lisozima, ixoderina, e outros.
- ❖ Muitas proteínas moduladoras estão presentes na saliva do carrapato, porém muitas não são reconhecidas por soros bovinos resistentes e suscetíveis, inclusive após infestação.
- ❖ Os hospedeiros resistentes conseguem reconhecer de maneira mais eficiente e mais precoce antígenos salivares do carrapato.

- Os carrapatos machos apresentam maior número de famílias de transcritos diferencialmente expressos associados com o parasitismo, podendo assim desempenhar importante papel na refeição sanguínea, principalmente quando alimentados em hospedeiros suscetíveis.

- As análises proteômicas corroboram com as análises transcriptomicas.

Assim, este estudo permitiu a elaboração de uma base de dados de constituintes salivares do carrapato *R. microplus*, na qual pode ser identificadas inúmeras proteínas que podem ser consideradas antígenos em potencial a compor uma vacina multicomponente anticarrapato. Este estudo também melhorou o entendimento sobre a biologia do parasitismo exercida pelo carrapato *R. microplus* frente à infestação em hospedeiro resistente e suscetível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas[1]

1. Powell RT, Reid TJ. Project tick control. Queensland Agricultural Journal. 1982;108:279-300.
2. da Rocha CM, Leite RC, Bruhn FR, Guimaraes AM, Furlong J. Perceptions about the biology of Rhipicephalus (Boophilus) microplus among milk producers in Divinopolis, Minas Gerais. Rev Bras Parasitol Vet. 2011 Oct-Dec;20(4):289-94.
3. da Rocha CM, Leite RC, Bruhn FR, Guimaraes AM, Furlong J. Perceptions of milk producers from Divinopolis, Minas Gerais, regarding Rhipicephalus (Boophilus) microplus control. Rev Bras Parasitol Vet. 2011 Oct-Dec;20(4):295-302.
4. Gonzales JC. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. Mestre Jou. 1974:101p.
5. Gonzales JC. O controle dos carrapatos dos bovinos. Sulina. 1975.
6. Bennett GF. Oviposition of Boophilus microplus (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. Acarologia. 1974 Oct;16(2):251-7.
7. Bennett GF. Oviposition of Boophilus microplus (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. Acarologia. 1974 Jul;16(1):52-61.
8. Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feedings apparatus, salivary gland secretions and the host response. I. Physiology of ticks. 1982:119-67.
9. Furlong J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. Caderno técnico da Escola de Veterinária-UFMG. 1993;8:49-61.
10. Andreotti R, Malavazi-Piza KC, Tanaka AS. Controle do carrapato por meio de vacina- situação atual e perspectivas. Embrapa Gado de Corte. 2002:58.
11. Utech KBW, Wharton RH, Kerr DJ. Resistence to B. microplus (Canestrini) in different breeds of cattle. Australian Journal Agricultural Research. 1978;29:885-95.
12. Moraes FR. Ecologia de carrapato XV: Susceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuinos a B. microplus (Canestrini) (Acari: Ixodedae). Ars Veterinária. 1986;2:45-53.
13. Oliveira GP, Alencar MM. Resistência de bovinos ao carrapato B. microplus II. Infestação natural. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1989;24:1267-71.
14. Villares JB. Climatologia Zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e suceptibilidade genética dos bovinos ao B. microplus. Boletin de Indústria Animal. 1941;4:60-79.
15. Oliveira GP, Alencar MM. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandêz-Gurezá ao carrapato (Boophilus microplus) e ao berne (D. hominis). Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia. 1990;42:127-35.
16. Lee B. Resistence cattle for tick control. Rural Journal. 1979;105:4-7.
17. Carvalho WA, Bechara GH, More DD, Ferreira BR, da Silva JS, de Miranda Santos IK. Rhipicephalus (Boophilus) microplus: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, Bos taurus and Bos indicus. Exp Parasitol. 2008 Apr;118(4):587-91.
18. Brown SJ. Antibody- and cell-mediated immune resistance by guinea pigs to adult Amblyomma americanum ticks. Am J Trop Med Hyg. 1982 Nov;31(6):1285-90.
19. Brown SJ, Askenase PW. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by Amblyomma americanum ticks. Am J Trop Med Hyg. 1982 May;31(3 Pt 1):593-8.

[1]De acordo com Estilo Vancouver

20. Bechara GH, Morelli Junior J, Szabo MP. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. Ann N Y Acad Sci. 2000;916:570-5.
21. Veríssimo CJ. Resistência e suceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato Boophilus microplus. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UEP (Dissertação de Mestrado). 1991:170p.
22. Wikel SK. Host immunity to ticks. Annu Rev Entomol. 1996;41:1-22.
23. Ribeiro JM, Francischetti IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu Rev Entomol. 2003;48:73-88.
24. Ribeiro JM. How ticks make a living. Parasitol Today. 1995 Mar;11(3):91-3.
25. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM. The role of saliva in tick feeding. Front Biosci. 2009;14:2051-88.
26. Valenzuela JG. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. Parasitology. 2004;129 Suppl:S83-94.
27. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. Thromb Haemost. 2005 Jul;94(1):167-74.
28. Ribeiro JM. Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. Exp Parasitol. 1987 Dec;64(3):347-53.
29. Sauer JR, Essenberg RC, Bowman AS. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. J Insect Physiol. 2000 Jul 1;46(7):1069-78.
30. Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, et al. Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector Ixodes scapularis impairs its ability to feed. J Immunol. 2008 Oct 15;181(8):5209-12.
31. Sanders ML, Scott AL, Glass GE, Schwartz BS. Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari:Ixodidae). J Med Entomol. 1996 Jul;33(4):628-34.
32. Peterkova K, Vancova I, Hajnicka V, Slovak M, Simo L, Nuttall PA. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. Med Vet Entomol. 2008 Jun;22(2):167-71.
33. Wikel SK. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. Int J Parasitol. 1999 Jun;29(6):851-9.
34. Brown SJ, Askenase PW. Rejection of ticks from guinea pigs by anti-hapten-antibody-mediated degranulation of basophils at cutaneous basophil hypersensitivity sites: role of mediators other than histamine. J Immunol. 1985 Feb;134(2):1160-5.
35. Kennedy DG, Cannavan A, McCracken RJ. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. J Chromatogr A. 2000 Jun 16;882(1-2):37-52.
36. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech. 1994 Dec;13(4):1249-86.
37. FAO/WHO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Forty-fifty meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. 1996.
38. Trager W. Acquired immunity to ticks. Journal of Parasitology. 1939;25:57–81.
39. Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitol Today. 1999 Jul;15(7):258-62.
40. Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. Parasitology. 1995;110 Suppl:S43-50.
41. Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Luaces LL, Rubiera R, et al. Control of Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. Vet Parasitol. 1995 Apr;57(4):339-49.

42. de la Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, et al. Vaccination against ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. Genet Anal. 1999 Nov;15(3-5):143-8.
43. Massard CL, Fonseca AH, Bittencourt VR, Oliveira JB, Silva KM. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBM86-"GAVAC" contra o carrapato Boophilus microplus no Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. 1995;17:167-73.
44. Pruett JH. Immunological control of arthropod ectoparasites--a review. Int J Parasitol. 1999 Jan;29(1):25-32.
45. Frisch JE. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. Int J Parasitol. 1999;29:57-71.
46. Shi YP, Das P, Holloway B, Udhayakumar V, Tongren JE, Candal F, et al. Development, expression, and murine testing of a multistage Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate. Vaccine. 2000 Jun 15;18(25):2902-14.
47. Cai Q, Peng G, Bu L, Lin Y, Zhang L, Lustigmen S, et al. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a polyepitope Plasmodium falciparum candidate vaccine constructed by epitope shuffling. Vaccine. 2007 Jul 9;25(28):5155-65.
48. Alderson MR, Bement T, Day CH, Zhu L, Molesh D, Skeiky YA, et al. Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cells. J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):551-60.
49. Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7618-28.
50. Maruyama SRC. Estudo dos transcriptomas de glândulas salivares do carrapato do boi, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, alimentados em bovinos resistentes ou suscetíveis para obtenção de catálogo de genes afetados pela resposta imune do hospedeiro. Dissertação de Mestrado da FMRP-USP Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. 2008:159p.
51. Anatriello E, Ribeiro JM, de Miranda-Santos IK, Brandao LG, Anderson JM, Valenzuela JG, et al. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. BMC Genomics. 2010;11:450.
52. Ribeiro JM, Labruna MB, Mans BJ, Maruyama SR, Francischetti IM, Barizon GC, et al. The sialotranscriptome of Antricola delacruzi female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. Insect Biochem Mol Biol. 2012 May;42(5):332-42.
53. Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks. Insect Biochem Mol Biol. 2006 Feb;36(2):111-29.
54. Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM. Exploring the sialome of the tick Ixodes scapularis. J Exp Biol. 2002 Sep;205(Pt 18):2843-64.
55. Valenzuela JG. Exploring the messages of the salivary glands of Ixodes ricinus. Am J Trop Med Hyg. 2002 Mar;66(3):223-4.
56. Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, Amblyomma variegatum. BMC Genomics. 2011;12:136.
57. Aljamali MN, Hern L, Kupfer D, Downard S, So S, Roe BA, et al. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). Insect Mol Biol. 2009 Apr;18(2):129-54.

58. Almazan C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, et al. Characterization of three Ixodes scapularis cDNAs protective against tick infestations. Vaccine. 2005 Aug 15;23(35):4403-16.
59. de la Fuente J, Almazan C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, et al. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. Vaccine. 2006 May 8;24(19):4082-95.
60. Seixas A, Oliveira P, Termignoni C, Logullo C, Masuda A, da Silva Vaz I, Jr. Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Jul 15;148(1-2):149-56.
61. Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against Rhipicephalus appendiculatus ticks. Vaccine. 2006 Mar 20;24(13):2230-7.
62. Imamura S, da Silva Vaz Junior I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine. Vaccine. 2005 Jan 26;23(10):1301-11.
63. Hajdusek O, Almazan C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. Vaccine. 2010 Apr 9;28(17):2993-8.
64. Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, et al. A novel family of anticoagulants from the saliva of Ixodes scapularis. Insect Mol Biol. 2002 Dec;11(6):641-50.
65. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector Ixodes scapularis. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 13;305(4):869-75.
66. Almazan C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, et al. Identification and characterization of Rhipicephalus (Boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. Parasitol Res. 2010 Jan;106(2):471-9.
67. Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Gardinassi LG, Banin TM, Horackova J, et al. Vaccination of Cattle with Recombinant Salivary Antigens of Rhipicephalus microplus Selected by Reverse Immunovaccinology Reduces Tick Infestations. Manuscrito em preparação.
68. Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, et al. BmiGI: a database of cDNAs expressed in Boophilus microplus, the tropical/southern cattle tick. Insect Biochem Mol Biol. 2005 Jun;35(6):585-95.
69. Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, et al. CattleTickBase: an integrated Internet-based bioinformatics resource for Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Int J Parasitol. 2012 Feb;42(2):161-9.
70. Maruyama SRC. Antígenos salivares recombinantes de Rhipicephalus microplus selecionados por imunovacinologia reversa: efeito da vacinação de bovinos no controle das infestações por carrapatos. Tese de Doutorada FMRP-USP- Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. 2012:154p.
71. Kongsuwan K, Josh P, Zhu Y, Pearson R, Gough J, Colgrave ML. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (Rhipicephalus (Boophilus) microplus). J Insect Physiol. 2010 Feb;56(2):212-26.
72. Klopfleisch R, Gruber AD. Transcriptome and proteome research in veterinary science: what is possible and what questions can be asked? ScientificWorldJournal. 2012;2012:254962.

73. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol. 2001 Mar;19(3):242-7.
74. Lambert JD, Chan XY, Spiecker B, Sweet HC. Characterizing the embryonic transcriptome of the snail Ilyanassa. Integr Comp Biol. 2010 Nov;50(5):768-77.
75. Karim S, Singh P, Ribeiro JM. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, Amblyomma maculatum. PLoS One. 2011;6(12):e28525.
76. Lewis S, Ashburner M, Reese MG. Annotating eukaryote genomes. Curr Opin Struct Biol. 2000 Jun;10(3):349-54.
77. Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 1;30(1):281-3.
78. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):231-4.
79. Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics. 2003 Sep 11;4:41.
80. Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):263-6.
81. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
82. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9.
83. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput Appl Biosci. 1992 Jun;8(3):275-82.
84. Yatsuda AP, Krijgsveld J, Cornelissen AW, Heck AJ, de Vries E. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite Haemonchus contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):16941-51.
85. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010 Jan;11(1):31-46.
86. Vaz Junior Ida S, Ozaki LS, Masuda A. Serum of Boophilus microplus infested cattle reacts with different tick tissues. Vet Parasitol. 1994 Mar;52(1-2):71-8.
87. Vaz Junior Ida S, Martinez RH, Oliveira A, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, et al. Functional bovine immunoglobulins in Boophilus microplus hemolymph. Vet Parasitol. 1996 Mar;62(1-2):155-60.
88. Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proenca L, Carvalho WA, et al. Boophilus microplus: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. Exp Parasitol. 2005 May;110(1):12-21.
89. Carvalho WA, Ianella P, Arnoldi FG, Caetano AR, Maruyama SR, Ferreira BR, et al. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. Immunogenetics. 2011 May;63(5):319-24.
90. Andersen JF, Pham VM, Meng Z, Champagne DE, Ribeiro JM. Insight into the sialome of the Black Fly, Simulium vittatum. J Proteome Res. 2009 Mar;8(3):1474-88.
91. Campbell CL, Vandyke KA, Letchworth GJ, Drolet BS, Hanekamp T, Wilson WC. Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae). Insect Mol Biol. 2005 Apr;14(2):121-36.

92. Wilson AD, Heesom KJ, Mawby WJ, Mellor PS, Russell CL. Identification of abundant proteins and potential allergens in Culicoides nubeculosus salivary glands. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Mar 15;122(1-2):94-103.
93. Francischetti IM, Mans BJ, Meng Z, Gudderra N, Veenstra TD, Pham VM, et al. An insight into the sialome of the soft tick, Ornithodorus parkeri. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Jan;38(1):1-21.
94. Maruyama SR, Brandão LG, Garcia GR, Anderson JM, Anatriello E, Ferreira BF, et al. Comparative analysis of ESTs from Rhipicephalus microplus ticks fed on bovine hosts genetically susceptible or resistant to the infestations reveals differential pattern of transcripts related to parasitism. Manuscrito em preparação.
95. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, Ixodes scapularis. Thromb Haemost. 2004 May;91(5):886-98.
96. Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, et al. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. Thromb Haemost. 2006 Jul;96(1):7-13.
97. Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the Rhipicephalus haemaphysaloides tick. J Insect Physiol. 2011 Feb;57(2):339-43.
98. Paesen GC, Siebold C, Dallas ML, Peers C, Harlos K, Nuttall PA, et al. An ion-channel modulator from the saliva of the brown ear tick has a highly modified Kunitz/BPTI structure. J Mol Biol. 2009 Jun 19;389(4):734-47.
99. Castaneda O, Harvey AL. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. Toxicon. 2009 Dec 15;54(8):1119-24.
100. Kwong PD, McDonald NQ, Sigler PB, Hendrickson WA. Structure of beta 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. Structure. 1995 Oct 15;3(10):1109-19.
101. Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization. Vet Parasitol. 2008 Aug 1;155(1-2):133-41.
102. Mulenga A, Tsuda A, Onuma M, Sugimoto C. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, Rhiphicephalus appendiculatus; cDNA cloning and preliminary characterization. Insect Biochem Mol Biol. 2003 Feb;33(2):267-76.
103. Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E. Protective immunity against Ixodes ricinus induced by a salivary serpin. Vaccine. 2007 Apr 30;25(17):3284-92.
104. Leboulle G, Crippa M, Decrem Y, Mejri N, Brossard M, Bollen A, et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. J Biol Chem. 2002 Mar 22;277(12):10083-9.
105. Chmelar J, Oliveira CJ, Rezacova P, Francischetti IM, Kovarova Z, Pejler G, et al. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. Blood. 2011 Jan 13;117(2):736-44.
106. Muleng A, Sugino M, Nakajim M, Sugimoto C, Onuma M. Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. J Vet Med Sci. 2001 Oct;63(10):1063-9.
107. Lenarcic B, Bevec T. Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. Biol Chem. 1998 Feb;379(2):105-11.
108. Galesa K, Pain R, Jongsma MA, Turk V, Lenarcic B. Structural characterization of thyroglobulin type-1 domains of equistatin. FEBS Lett. 2003 Mar 27;539(1-3):120-4.

109. Lenarcic B, Ritonja A, Strukelj B, Turk B, Turk V. Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from Actinia equina, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. J Biol Chem. 1997 May 23;272(21):13899-903.
110. Lenarcic B, Turk V. Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):563-6.
111. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins. Biochem Soc Symp. 2003(70):179-99.
112. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. J Mol Evol. 1990 Jan;30(1):60-71.
113. Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, et al. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick Ornithodoros moubata. Biochem J. 2010 Jul 1;429(1):103-12.
114. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS Lett. 1991 Jul 22;285(2):213-9.
115. Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IM, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JM. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick Ixodes scapularis. J Biol Chem. 2006 Sep 8;281(36):26298-307.
116. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol. 2006 Apr;28(4):131-41.
117. Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev Comp Immunol. 1999 Jun-Jul;23(4-5):291-301.
118. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem J. 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16.
119. Schlott B, Wohnert J, Icke C, Hartmann M, Ramachandran R, Guhrs KH, et al. Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. J Mol Biol. 2002 Apr 26;318(2):533-46.
120. Watanabe RM, Soares TS, Morais-Zani K, Tanaka-Azevedo AM, Maciel C, Capurro ML, et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from Aedes aegypti with thrombin coagulant inhibitory activity. Biochimie. 2010 Aug;92(8):933-9.
121. Li KC, Zhang FX, Li CL, Wang F, Yu MY, Zhong YQ, et al. Follistatin-like 1 suppresses sensory afferent transmission by activating Na+,K+-ATPase. Neuron. 2011 Mar 10;69(5):974-87.
122. Arolas JL, Lorenzo J, Rovira A, Castella J, Aviles FX, Sommerhoff CP. A carboxypeptidase inhibitor from the tick Rhipicephalus bursa: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. J Biol Chem. 2005 Feb 4;280(5):3441-8.
123. Arolas JL, Popowicz GM, Lorenzo J, Sommerhoff CP, Huber R, Aviles FX, et al. The three-dimensional structures of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with A/B carboxypeptidases reveal a novel double-headed binding mode. J Mol Biol. 2005 Jul 15;350(3):489-98.
124. Gong H, Zhou J, Liao M, Hatta T, Harnnoi T, Umemiya R, et al. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick Haemaphysalis longicornis. J Insect Physiol. 2007 Oct;53(10):1079-87.
125. Nakajima C, Imamura S, Konnai S, Yamada S, Nishikado H, Ohashi K, et al. A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from Haemaphysalis longicornis salivary gland. J Vet Med Sci. 2006 May;68(5):447-52.
126. Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):535-40.

127. Mans BJ, Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schwan TG, Pham VM, et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Jan;38(1):42-58.
128. Turner AJ, Brown CD, Carson JA, Barnes K. The neprilysin family in health and disease. Adv Exp Med Biol. 2000;477:229-40.
129. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. Bioessays. 2001 Mar;23(3):261-9.
130. Yang XF, Chatellard C, Lazure C, Crine P, Boileau G. Insertion of hydrophilic amino acid residues in the signal peptide/membrane anchor domain of neprilysin (neutral endopeptidase-24.11) results in its cleavage: role of the position of insertion. Arch Biochem Biophys. 1994 Dec;315(2):382-6.
131. Ribeiro JM, Mather TN. Ixodes scapularis: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. Exp Parasitol. 1998 Jun;89(2):213-21.
132. Xu X, Yang H, Ma D, Wu J, Wang Y, Song Y, et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. Mol Cell Proteomics. 2008 Mar;7(3):582-90.
133. Motobu M, Tsuji N, Miyoshi T, Huang X, Islam MK, Alim MA, et al. Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. FEBS J. 2007 Jul;274(13):3299-312.
134. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. [Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine]. Science. 1968 May 24;160(3830):892-3.
135. Valnickova Z, Thaysen-Andersen M, Hojrup P, Christensen T, Sanggaard KW, Kristensen T, et al. Biochemical characterization of bovine plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). BMC Biochem. 2009;10:13.
136. Sojka D, Hajdusek O, Dvorak J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, et al. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick Ixodes ricinus. Int J Parasitol. 2007 Jun;37(7):713-24.
137. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Huang X, Hatta T, et al. HlLgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of the ixodid tick Haemaphysalis longicornis, is involved in blood-meal digestion. J Insect Physiol. 2008 Mar;54(3):573-85.
138. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Fujisaki K. Legumains from the hard tick Haemaphysalis longicornis play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. Int J Parasitol. 2009 Jan;39(1):97-107.
139. Abdul Alim M, Tsuji N, Miyoshi T, Khyrul Islam M, Huang X, Motobu M, et al. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. Insect Biochem Mol Biol. 2007 Sep;37(9):911-22.
140. Ribeiro JM, Mans BJ, Arca B. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. Insect Biochem Mol Biol. 2010 Nov;40(11):767-84.
141. Hostomska J, Volfova V, Mu J, Garfield M, Rohousova I, Volf P, et al. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly Phlebotomus arabicus. BMC Genomics. 2009;10:282.
142. Calvo E, Ribeiro JM. A novel secreted endonuclease from Culex quinquefasciatus salivary glands. J Exp Biol. 2006 Jul;209(Pt 14):2651-9.
143. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2007 Feb;10(1):52-6.

144. Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jan 31;92(3):694-8.
145. Stutzer C, Mans BJ, Gaspar AR, Neitz AW, Maritz-Olivier C. Ornithodoros savignyi: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. Exp Parasitol. 2009 Aug;122(4):318-27.
146. Sun D, McNicol A, James AA, Peng Z. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. Platelets. 2006 May;17(3):178-84.
147. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. Thromb Haemost. 2008 Mar;99(3):466-72.
148. Kuroki M, Minakami S. Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Jul 14;162(1):377-80.
149. O'Flaherty JT, Cordes JF. Human neutrophil degranulation responses to nucleotides. Lab Invest. 1994 Jun;70(6):816-21.
150. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Arch Microbiol. 2000 Nov;174(5):362-74.
151. Fahmy AS, Abdel-Gany SS, Mohamed TM, Mohamed SA. Esterase and lipase in camel tick Hyalomma dromedarii (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2004 Feb;137(2):159-68.
152. You M, Fujisaki K. Vaccination effects of recombinant chitinase protein from the hard tick Haemaphysalis longicornis (Acari: Ixodidae). J Vet Med Sci. 2009 Jun;71(6):709-12.
153. Franzin MF, Oliveira RP, Maruyama SRC, Garcia GR, Ribeiro JM, Maia AM, et al. Responses in host skin and in a hematophagous ectoparasite differ according to the genetic composition of the host: genomic and histological insights. Manuscrito em preparação.
154. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature. 2007 May 3;447(7140):92-U7.
155. Bohm S, Schwab I, Lux A, Nimmerjahn F. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. Semin Immunopathol. 2012 May;34(3):443-53.
156. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. Arthritis Res Ther. 2009;11(6):R193.
157. Mans BJ, Louw AI, Neitz AW. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, Ornithodoros savignyi, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. Mol Biol Evol. 2003 Jul;20(7):1158-67.
158. Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for Ixodes scapularis engorgement and transmission of the lyme disease agent. PLoS Pathog. 2010;6(11):e1001205.
159. Willadsen P, Wood GM, Riding GA. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, Boophilus microplus. Z Parasitenkd. 1979 Jun 13;59(1):87-93.
160. Sangamnatdej S, Paesen GC, Slovak M, Nuttall PA. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. Insect Mol Biol. 2002 Feb;11(1):79-86.

161. Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus. Biochem J. 1995 May 15;308 (Pt 1):243-9.
162. Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, et al. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick Ornithodoros moubata. J Immunol. 2005 Feb 15;174(4):2084-91.
163. Mans BJ, Ribeiro JM, Andersen JF. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. J Biol Chem. 2008 Jul 4;283(27):18721-33.
164. Francischetti IM, Andersen JF, Ribeiro JM. Biochemical and functional characterization of recombinant Rhodnius prolixus platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. Biochemistry. 2002 Mar 19;41(11):3810-8.
165. Mans BJ, Ribeiro JM. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Sep;38(9):841-52.
166. Mans BJ, Ribeiro JM. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Sep;38(9):862-70.
167. Boisbouvier J, Albrand JP, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, et al. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. J Mol Biol. 1998;283(1):205-19.
168. Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. J Exp Med. 2008 Sep 1;205(9):2019-31.
169. Fogaca AC, Lorenzini DM, Kaku LM, Esteves E, Bulet P, Daffre S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick Boophilus microplus: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Dev Comp Immunol. 2004 Mar;28(3):191-200.
170. Zhang H, Zhang W, Wang X, Zhou Y, Wang N, Zhou J. Identification of a cysteine-rich antimicrobial peptide from salivary glands of the tick Rhipicephalus haemaphysaloides. Peptides. 2011 Mar;32(3):441-6.
171. Frauenschuh A, Power CA, Deruaz M, Ferreira BR, Silva JS, Teixeira MM, et al. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick Rhipicephalus sanguineus. J Biol Chem. 2007 Sep 14;282(37):27250-8.
172. Kopacek P, Hajdusek O, Buresova V, Daffre S. Tick innate immunity. Adv Exp Med Biol. 2010;708:137-62.
173. Silva FD, Rossi DC, Martinez LR, Frases S, Fonseca FL, Campos CB, et al. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against Cryptococcus neoformans. FEMS Microbiol Lett. 2011 Nov;324(1):64-72.
174. Silva FD, Rezende CA, Rossi DC, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34735-46.
175. Lu X, Che Q, Lv Y, Wang M, Lu Z, Feng F, et al. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, Haemaphysalis longicornis. Protein Sci. 2010 Mar;19(3):392-7.
176. Tanaka T, Kawano S, Nakao S, Umemiya-Shirafuji R, Rahman MM, Boldbaatar D, et al. The identification and characterization of lysozyme from the hard tick Haemaphysalis longicornis. Ticks Tick Borne Dis. 2010 Dec;1(4):178-85.
177. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. J Invest Dermatol. 2012 Mar;132(3 Pt 2):887-95.

178. Inohara N, Nunez G. ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. Trends Biochem Sci. 2002 May;27(5):219-21.
179. Sterba J, Dupejova J, Fiser M, Vancova M, Grubhoffer L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. Parasit Vectors. 2011;4:127.
180. Rego RO, Hajdusek O, Kovar V, Kopacek P, Grubhoffer L, Hypsa V. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick Ornithodoros moubata and the hard tick Ixodes ricinus. Insect Biochem Mol Biol. 2005 Sep;35(9):991-1004.
181. Horackova J, Rudenko N, Golovchenko M, Havlikova S, Grubhoffer L. IrML - a gene encoding a new member of the ML protein family from the hard tick, Ixodes ricinus. J Vector Ecol. 2010 Dec;35(2):410-8.
182. Milne TJ, Abbenante G, Tyndall JD, Halliday J, Lewis RJ. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31105-10.
183. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol. 2006;44:135-62.
184. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. Endocr Rev. 2008 Dec;29(7):865-97.
185. Li WF, Ma GX, Zhou XX. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. Peptides. 2006 Sep;27(9):2350-9.
186. Fogaca AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick Boophilus microplus with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides. 2006 Apr;27(4):667-74.
187. Sasaki SD, de Lima CA, Lovato DV, Juliano MA, Torquato RJ, Tanaka AS. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from Boophilus microplus, with activity toward Pr1 proteases from the fungus Metarhizium anisopliae. Exp Parasitol. 2008 Feb;118(2):214-20.
188. Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. Science. 2000 Aug 18;289(5482):1185-8.
189. Carvalho WA, Franzin AM, Abatepaulo AR, de Oliveira CJ, More DD, da Silva JS, et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. Vet Parasitol. 2010 Feb 10;167(2-4):260-73.
190. Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. Cell Mol Life Sci. 1999 Oct 15;56(3-4):286-95.
191. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, Ward ES. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8.
192. Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, et al. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):6213-6.
193. Garcia GR, Maruyama SR, Oliveira CJ, Gardinassi LG, Maia AM, Natsui AP, et al. The kinetics of the humoral immune response during Rhipicephalus microplus tick infestation in resistant and susceptible hosts. Manuscrito em preparação.
194. Bergman DK, Palmer MJ, Caimano MJ, Radolf JD, Wikel SK. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni salivary gland. J Parasitol. 2000 Jun;86(3):516-25.

195. Bergman DK, Ramachandra RN, Wikel SK. Characterization of an immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) salivary glands. J Med Entomol. 1998 Jul;35(4):505-9.
196. Oliveira CJ, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS, et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. Int J Parasitol. 2008 May;38(6):705-16.
197. Chinery WA. The nature and origin of the "cement" substance at the site of attachment and feeding of adult Haemaphysalis spinigera (Ixodidae). J Med Entomol. 1973 Jul 31;10(4):355-62.
198. Maruyama SR, Anatriello E, Anderson JM, Ribeiro JM, Brandao LG, Valenzuela JG, et al. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Rhipicephalus sanguineus and Amblyomma cajennense. BMC Genomics. 2010;11:363.
199. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. Vaccine. 2005 Jul 29;23(34):4329-41.
200. Schleger AV, Lincoln DT, Kemp DH. A putative role for eosinophils in tick rejection. Experientia. 1981 Jan 15;37(1):49-50.
201. Hackman RH. Structure and function in tick cuticle. Annu Rev Entomol. 1982;27:75-95.
202. Bishop R, Lambson B, Wells C, Pandit P, Osaso J, Nkonge C, et al. A cement protein of the tick Rhipicephalus appendiculatus, located in the secretory e cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. Int J Parasitol. 2002 Jun 15;32(7):833-42.
203. Blackledge TA, Scharff N, Coddington JA, Szuts T, Wenzel JW, Hayashi CY, et al. Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 31;106(13):5229-34.
204. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. J Cell Sci. 2002 Jul 15;115(Pt 14):2817-28.
205. Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R, et al. Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. Immunity. 2002 Jun;16(6):849-59.
206. Juncadella IJ, Garg R, Ananthnarayanan SK, Yengo CM, Anguita J. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007 Apr;49(3):433-8.
207. Hojgaard A, Biketov SF, Shtannikov AV, Zeidner NS, Piesman J. Molecular identification of Salp15, a key salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from Ixodes persulcatus and Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2009 Nov;46(6):1458-63.
208. Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, Alim MA, Hatta T, Yamaji K, et al. Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick Haemaphysalis longicornis, is required for acquisition of host blood-meals. Int J Parasitol. 2010 May;40(6):721-9.
209. Anisuzzaman, Islam MK, Alim MA, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, et al. Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. PLoS Pathog. 2011 Mar;7(3):e1001312.
210. Maruyama SR, Castro-Jorge LA, Ribeiro JM, Gardinassi LG, Garcia GR, Brandão LG, et al. Molecular detection and characterization of NS3 and NS5 protein sequences

from a divergent flavivirus present in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. Manuscrito submetido para publicação no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.
211. Rodriguez-Valle M, Lew-Tabor A, Gondro C, Moolhuijzen P, Vance M, Guerrero FD, et al. Comparative microarray analysis of Rhipicephalus (Boophilus) microplus expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on Bos indicus and Bos taurus cattle. BMC Genomics. 2010;11:437.
212. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, et al. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. Proteomics. 2008 May;8(9):1744-9.
213. Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. Proteomic profiling of Rhipicephalus (Boophilus) microplus midgut responses to infection with Babesia bovis. Vet Parasitol. 2008 Apr 15;152(3-4):294-313.
214. Villar M, Torina A, Nunez Y, Zivkovic Z, Marina A, Alongi A, et al. Application of highly sensitive saturation labeling to the analysis of differential protein expression in infected ticks from limited samples. Proteome Sci. 2010;8:43.
215. Coons LB, Roshdy MA. Ultrastructure of Granule Secretion in Salivary Glands of Argas (Persicargas) arboreus During Feeding. Z Parasitenkd. 1981; 234:65:225.
216. Ellis J. Protein folding. Cytosolic chaperonin confirmed. Nature. 1992 Jul 16;358(6383):191.
217. Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. Science. 2000 Nov 24;290(5496):1571-4.
218. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta. 2004 Jun 1;1699(1-2):35-44.
219. Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. Trends Biochem Sci. 2006 Aug;31(8):455-64.
220. Bajic A, Zakrzewska J, Godjevac D, Andjus P, Jones DR, Spasic M, et al. Relevance of the ability of fructose 1,6-bis(phosphate) to sequester ferrous but not ferric ions. Carbohydr Res. 2011 Feb 15;346(3):416-20.
221. Andreotti R, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Torquato RJ, Gomes A, Tanaka AS. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick Boophilus microplus: purification and biochemical characterization. J Protein Chem. 2001 Jul;20(5):337-43.
222. Jittapalapong S, Kaewhom P, Pumhom P, Canales M, de la Fuente J, Stich RW. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female Rhipicephalus microplus. Transbound Emerg Dis. 2010 Apr;57(1-2):103-6.
223. Imamura S, Konnai S, Vaz Ida S, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus. Jpn J Vet Res. 2008 Aug;56(2):85-98.
224. Tsuji N, Kamio T, Isobe T, Fujisaki K. Molecular characterization of a peroxiredoxin from the hard tick Haemaphysalis longicornis. Insect Mol Biol. 2001 Apr;10(2):121-9.
225. Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K. A cysteine protease is critical for Babesia spp. transmission in Haemaphysalis ticks. PLoS Pathog. 2008 May;4(5):e1000062.
226. Mulenga A, Macaluso KR, Simser JA, Azad AF. The American dog tick, Dermacentor variabilis, encodes a functional histamine release factor homolog. Insect Biochem Mol Biol. 2003 Sep;33(9):911-9.

227. Citelli M, Lara FA, da Silva Vaz I, Jr., Oliveira PL. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Mol Biochem Parasitol. 2007 Jan;151(1):81-8.
228. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. Autoimmun Rev. 2010 Mar;9(5):A259-66.
229. Graham AL, Hayward AD, Watt KA, Pilkington JG, Pemberton JM, Nussey DH. Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. Science. 2010 Oct 29;330(6004):662-5.
230. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus Boophilus (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp Appl Acarol. 2006;38(2-3):219-35.
231. Rajput ZI, Hu SH, Chen WJ, Arijo AG, Xiao CW. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. J Zhejiang Univ Sci B. 2006 Nov;7(11):912-21.
232. Barre N, Uilenberg G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. Rev Sci Tech. 2010 Apr;29(1):149-60, 35-47.
233. de Castro JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. Vet Parasitol. 1997 Jul 31;71(2-3):77-97.
234. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. Parasitol Today. 1988 Jul;4(7):196-8.
235. Wikel SK. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: utilization of novel antigens. Vet Parasitol. 1988 Sep;29(2-3):235-64.
236. Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines--a reality? Vet Parasitol. 2001 Jul 12;98(1-3):149-67.
237. Jones LD, Matthewson M, Nuttall PA. Saliva-activated transmission (SAT) of Thogoto virus: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of Rhipicephalus appendiculatus, Amblyomma variegatum, and Boophilus microplus ticks. Exp Appl Acarol. 1992 Mar;13(4):241-8.
238. Kovar L. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. Folia Microbiol (Praha). 2004;49(3):327-36.
239. Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunol. 2006 Apr;28(4):155-63.
240. Wambura PN, Gwakisa PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA. Breed-associated resistance to tick infestation in Bos indicus and their crosses with Bos taurus. Vet Parasitol. 1998 May;77(1):63-70.
241. Maruyama SR, Castro-Jorge LA, Ribeiro JM, Gardinassi LG, Garcia GR, Brandão LG, et al. Molecular detection of NS3 and NS5 protein sequences from a divergent flavivirus present in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. Manuscrito submetido para Ticks and Tick-Borne Diseases.

MANUSCRITO

7. Manuscrito

Neste item está inserido um manuscrito em preparação oriundo de resultados parciais obtidos nesse estudo, intitulado "The sialotranscriptome of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, resolved by 454-based RNA-seq". O manuscrito ainda não foi submetido a periódicos científicos, assim como outros que serão informados abaixo, devido ao fato de que os resultados descritos envolvem resultados sujeitos à proteção de propriedade intelectual.

O pedido de patente está em tramitação sob o protocolo 12.1.17.78.17.3 na Agência USP de Inovação, conforme descrito no item 8 desta tese. É necessário salientar que a Agência solicitou para não submetamos manuscritos relacionados à tese devido ao prazo de retorno das revistas, que tem sido rápido. Isso reduziria demais o prazo de avaliação do pedido de patente e quando o mesmo se tornaria público. Como o pedido de patente tem outras instituições envolvidas, inclusive o NIH dos EUA que na experiência da Agência é morosa, ela receia que o prazo seja insuficiente.

Dessa forma, seria mais prudente aguardarmos o posicionamento final das outras instituições envolvidas.

- **Instruções para visualização o manuscrito "The sialotranscriptome of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, resolved by 454-based RNA-seq"**: No presente manuscrito quando ler Additional file 1, por favor ver Tabela suplementar 1 que está no DVD em anexo (item 9-Materiais suplementares), pois é a sua representante nesta tese. Isso esta sendo feito para evitar repetições de tabelas grandes que não cabem em arquivos Word. O mesmo acontece nas outras situações abaixo.
-

Additional file 2, ver Tabela Suplementar 2
Additional Table 1, ver Tabela Suplementar 33
Supplementary table 1, ver Tabela Suplementar 34
Supplementary table 2, ver Tabela Suplementar 35

Outros manuscritos em preparação que também empregam parte dos resultados obtidos nesse estudo não estão anexados nesta tese, pois esta ficaria ainda mais extensa.

Os seguintes manuscritos estão em preparação:

1) Differential in gel electrophoresis identifies differences in the proteomic profile produced by salivary and larval proteins of *Rhipicephalus microplus* ticks fed on susceptible or resistant bovine hosts.

2) Responses in host skin and in a hematophagous ectoparasite differ according to the genetic composition of the host: genomic and histological insights.

3) RNA interference of selected tick salivary secreted proteins reduces fitness of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, to complete blood feeding and reproduce.

Title:

THE SIALOTRANSCRIPTOME OF THE CATTLE TICK, *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*, RESOLVED BY 454-BASED RNA-SEQ

Running Title:

THE NEW *R.MICROPLUS* SIALOTRANSCRIPTOME

Gustavo Rocha Garcia[1], Sandra Regina Maruyama[1], Alessandra Mara Franzin[1], Luiz Gustavo Gardinassi[1], Beatriz R. Ferreira[2], José Marcos Ribeiro[3], Isabel K. F. de Miranda Santos[1*].

[1]Departament of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

[2]Ribeirão Preto School of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

[3]Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

[*]Corresponding author:

Depto. de Bioquímica e Imunologia

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Avenida Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Tel.: +55 16 36023267

fax: +55 16 3602-4590

E-mail address: imsantos@fmrp.usp.br

Abbreviations:

RmS: *R. microplus* tick fed on Susceptible bovine hosts, RmR: *R. microplus* tick fed on Resistant bovine hosts, UFLs: Unfed Larvae, FSGRmR: Female Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Resistant bovine hosts, FSGRmS: Female Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Susceptible bovine hosts, MSGRmR: Male Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Resistant bovine hosts, MSGRmS: Male Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Susceptible bovine hosts, NSGRmR: Nymph Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Resistant bovine hosts, NSGRmS: Nymph Salivary Gland from *R. microplus* tick fed on Susceptible bovine hosts, SGs: Salivary Glands, tRNA: Total RNA, UFL: Unfed Larvae, UFLRmR: Unfed Larvae from *R. microplus* tick fed on Resistant bovine hosts, UFLRmS: Unfed Larvae from *R. microplus* tick fed on Susceptible bovine hosts, ESTs: Expressed Sequence Tag.

Abstract

Rhipicephalus microplus, known as cattle tick, is considered to be the most important tick parasite of livestock in the world. This can be found worldwide in subtropical and tropical regions. The *R. microplus* causes great economic losses on agricultural systems globally due to exploitative actions caused by tick bites during blood meal and transmission of a variety pathogens to their hosts. The ticks use their saliva to facilitate both the blood meal as well as enhance pathogen transmission. In *R. microplus* ticks, the taurine breeds are considered susceptible hosts, while the zebu breeds are considered resistant hosts and these contrasting phenotypes have been shown to be highly heritable, serving as useful model to analyze the mechanisms involved in susceptibility or resistance against *R. microplus.* In this way, we employed the next generation sequencing technology for obtaining new information about the *R. microplus* biology and of its salivary constituents. So, we have obtained 1,999,086 reads by pyrosequencing of the larvae and salivary glands cDNA libraries from *R. microplus* ticks at different tick developmental stages, larval, nymph and adults - female and male, fed on resistant or susceptible bovine hosts. These transcripts were assembled and obtained 40,735 sequences larger than 149 nucleotides, of these sequences were extracted 11,676 coding sequences (CDS). The 3,600 CDS were classified in 72 families related with putative secreted proteins that can plays important role in blood meal, such as antimicrobial, anti-haemostitics, anti-inflammatory and immunomodulators. In addition, approximately 40% (1,450 CDS) have no known function. This annotated catalogue is available as hyperlinked spreadsheets. These annotated data representing the deepest analysis of any sialotranscriptome performed so far with *R. microplus* ticks, principally about salivary constituents from *R. microplus* being affected by host´s immunology. These should represent a knowledge platform for the discovery of novel vaccine targets as well as novel pharmacologically active proteins that can assists in treatment of the medical and veterinary pathologies.

Introduction

The cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, is a hard tick that can be considered the most economically important tick that parasite a variety of livestock species in the world. *R. microplus* is usually found in tropical and subtropical regions (230) infesting mainly the cattle, deer and buffalo, but it can also be found on horses, goats, sheep, donkeys, dogs, pigs and some wild mammals. The great economic losses on agricultural systems globally is due to exploitative actions and physical damage caused by tick bites during blood meal, as well as transmission of a variety pathogens, including *Babesia ssp*. and *Anaplasma marginale* (babesiosis and

anaplasmosis, respectively) that affect animals infested (231-233). The annual economic losses attributable to *R. microplus* infestation are estimated US$13-18 billion globally (233), while in Brazil, the largest producer of livestock in the world, is approximately US$2 billion, followed by Australia AUS$175 million.

The tick control currently consists of two commercial vaccines (40, 41), based in strategies of the concealed antigens (234, 235), and by chemical agents, but both methods are inefficient. On one hand, the vaccines have partial and transient effects against infestations and other hand the chemical agents result in environmental contamination, residues in food animal products and promote acaricide-resistant ticks (236). Thus, there is currently a demand urgent and necessary to develop new technologies for tick control, therefore it is necessary to a better understanding of the tick/ hosts interactions.

The ticks use a complex mixture of pharmacologically active components present in their saliva during an infestation in their hosts (23, 24). This saliva has compounds that interact with host`s hemostaisis, inflammatory, immune responses facilitating blood meal for ticks (25). In addition, these salivary components can also enhance pathogen transmission (33, 237, 238). Because of this important role of saliva during tick infestation, the feeding and pathogen transmission, these salivary constituents have been proposed as potential target in tick vaccine (26, 116, 239). Regarding the bovine hosts of the *R. microplus* ticks, the success of their life cycle depends on the breed of the bovine host. In cattle, there is a contrasting phenotypes of tick burdens and have been shown to be highly heritable, therefore these offer in a single species, a useful model to analyze the mechanisms involved in susceptibility or resistance against *R. microplus* (240). The zebu breeds are considered the resistant hosts by suffer smaller infestations with few of feeding parasites, while taurine breeds are highly susceptible by has great amounts of engorging females that will go on to lay larger batches of eggs than females fed on resistant hosts.

In additional, the transcriptome and genome-based studies have been produced (68, 69, 94), however, none of these studies has involved so deeply analysis of the salivary constituents of *R. microplus* according to tick developmental stages, as well as the source blood meal, in hosts susceptible or resistant. Here, we report an complete annotated catalogue of unfed larva and salivary gland expressed transcripts from *R. microplus* ticks according the tick developmental stages and the blood meal origin, if genetically resistant or susceptible bovine hosts, resulting from approximately 2 million pyrosequencing sequences, representing the complete and extensive analysis of salivary constituents and biology from *R. microplus* ticks performed so far. This catalogue provided an insight into biology from *R. microplus* ticks, which can assist the new design to control of ticks and tick-borne diseases, novel vaccine targets as well as for the

searching of novel pharmacologically active proteins that may have potential use in medical and veterinary disorders.

Methods

Ticks and Sample Preparation

R. microplus engorged females (17-21 days post attachment) fed on susceptible (S: B*os Taurus,* Holstein breed) or resistant (R: *Bos indicus,* Nelore breed) bovine hosts were removed, washed and incubated, at 27–28 °C and 80–90% relative humidity, for 2 weeks until the egg laying. These eggs provided the UFLRmS and UFLRmR that were used to isolate total RNA (tRNA). Nymphs (11-14 days post attachment), adult Females (semi-engorged <4mm) and Males (17-21 day post attachment) fed on susceptible or resistant bovine hosts were collected to provide the NSGRmS, NSGRmR, FSGRmS, FSGRmR, MSGRmS and MSGRmR. The salivary glands (SGs) were collected within one hour after removal from the bovines using LEICA MZ 9.5 magnifying glass (Meyer Instruments, Inc., Houston, TX, USA) and sterile dissection materials. After dissection, the glands were washed gently in Phosphate Buffered Saline (PBS) and stored immediately in RNAlater (Ambion Inc., Austin, TX, USA) to tRNA extraction.

RNA extraction

To isolate tRNA from unfed larvae (UFLRm) and from SGs of *R microplus* ticks, SV Total RNA Isolation System Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was used according to manufacturer's protocol. The quantity and quality of the tRNA samples were determined by both Nanodrop® and lab-on-chip analysis using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA).

Library Preparation and Sequencing

Briefly, mRNA was isolated from 20ug of total RNA with the Oligotex kit (Qiagen, Valencia, CA). The mRNA-enriched fraction was converted to a primary cDNA library with barcoded adaptors compatible with the 454 system as previously published (74). After library construction, the libraries were quantified using a Qubit fluorometer (Invitrogen, CA) and average fragment sizes were determined by analyzing 1 µl of the samples on the Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) using a DNA 7500 chip. The libraries were diluted to $1x10^6$ molecules/µ and pooled. Emulsion-based clonal amplification and sequencing on a full plate on the 454 Genome Sequencer FLX system was performed in the W. M. Keck Center for Comparative and Functional Genomics, Roy J. Carver Biotechnology Center, University of Illinois at Urbana-

Champaign according to the manufacturer's instructions (454 Life Sciences, Branford, CT). Signal processing and base calling were performed using the bundled 454 Data Analysis Software version 2.3.

Bioinformatics tools and statistical analysis

Bioinformatics workflow of this study was performed as previously described (75, 153). Computer programs employed here were written and provided by JMCR in Visual Basic 6.0 (Microsoft, Redmond, Washington). The searches of the contigs against several databases were performed using blastx, blastn or rpsblast to obtain insight on the salivary transcripts from *R. microplus*. The databases used were the non redundant protein database (NR) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the gene ontology (GO) FASTA subset (76), the Swissprot database, the tick salivary sequences described in a previous review (25), custom databases from GenBank containing mitochondrial and rRNA nucleotide sequences and the conserved domains database of NCBI (77) containing the SMART (78), KOG (79) and PFAM (80) motifs. Multiple sequence alignments were performed using the Clustal W algorithm (81). Phylogenetic analyses were determined using Neighbor - Joining (NJ) method running with MEGA 5.05 software (82). Node support of each clade was evaluated using bootstrap analysis (1000 replicates) and the evolutionary distances were derived using the Jones-Taylor-Thornton (JTT) method (83). These analyses were only conducted on full length sequences which posses a predicted signal peptide indicative of secretion, in other words, only sequences starting from a Methionine (Met) to stop codon and having signal peptide were included. Complete sequences that present too many frame shifts were excluded from analyses.

The neutrophil counts in bovine skin

Neutrophils counts were performed in skin biopsy from resistant and susceptible bovines (6 and 4 animals, respectively) to infestation by *R. microplus* ticks. The paraffin-embedded skin sections of non-stressed skin (before bovine infestation), stressed skin (after bovine infestation, but skin biopsy without tick) and infested skin (skin biopsy together with ticks on the following stages: larvae, nymph, young and old adults ticks) were stained with May-Grunwald and Giemsa, and visualized on Nikon Eclipse 50i microscope with a DS-Fi1 high resolution microscope camera attached (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Stained neutrophils were counted from areas of 0.0625 mm^2 into the dermis of susceptible and resistant hosts. The mean neutrophil counting from each host was used for further analyses. The statistical analysis were performed using the

Student's *t* test or Mann–Whitney rank sum test to evaluate significance between resistant versus susceptible neutrophils. The *P* value <0.05 was used to establish the level of significance.

Ethics Statement

This study was approved by Animal Research Ethics Committee from Ribeirão Preto School of Medicine - USP, protocol #102/2009, according to Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Results and Discussion

Overview of the *R. microplus* assembled sialotranscriptome.

In order to obtain insights on sialotranscriptome of *R. microplus* fed on resistant or susceptible bovine hosts, in different developmental stages - "larval, nymph and adults - female and male", UFLRm and SGs were used to generate eight cDNA libraries (UFLRmR, NSGRmR, FSGRmR, MSGRmR, UFLRmS, NSGRmS, FSGRmS and MSGRmS). The cDNA libraries pyrosequencing resulted in a total of 2,413,950 reads, which were assembled into 348,707 contigs, including singletons. A subset of the assembled data was clustered into contigs containing a minimum of 4 sequences, each one constituted of at least 149 nucleotides in length. This process resulted in 40,734 contigs that contained 1,999,086 reads, approximately 83% of the total generated reads.

Final reads clustering shows that RmR libraries are constituted by 1,005,880 reads (50.3%), and distributed as follows: UFLRmR library was represented by 164,030 reads or 8.2% of assembled reads, followed by NSGRmR with 264,162 reads (13.2%), FSGRmR 196,336 reads (9.8%) and MSGRmR 381,352 reads (19%). Further, UFLRmS library accounted for 199,077 reads or 9.9% of assembled reads, followed by NSGRmS library with 321,163 reads (16%), FSGRmS with 215,093 reads (10.7%) and MSGRmS 257,873 reads (12.9%), totaling 993,206 reads (49,7%) present in RmS libraries. Taken together, refined transcripts clusters from the initial cDNA libraries originated the R. microplus sialotranscriptome database available in Additional file 1.

Subsequent clustering analysis of *R. microplus* sialotranscripts database resulted in the extraction of 11,676 coding sequences (CDS), which were derived from 931,698 reads, thus 39% of reads totality. From RmR libraries, 498,482 reads were annotated into 11,329 CDS, nevertheless, the assembling of the UFLRmR library into 6,018 CDS was composed by 5.8% of total reads; 12.8% of reads were derived from NSGRmR and assembled into 7,060 CDS; 27.3% of reads were derived from MSGRmR and assembled into 9,414 CDS and 7.5% of reads, assembled into 7,305 CDS, were from FSGRmR. Regarding the RmS libraries, the transcripts accounted for 10,667

CDS, which were assembled with 433,216 reads. 3,755 CDS of UFLRmS library were obtained from 9.2% of total reads, 5,425 CDS of NSGRmS from 16.2% of reads, 9,215 CDS of MSGRmS from 11.4% of reads and 2,238 CDS of FSGRmS from 9.5% of the reads totality. These data are displayed in Table 1 and Additional file 2.

Manual annotation of the 11,676 CDS present in *R. microplus* sialotranscriptome resulted in five principal categories: putatively secreted (S), housekeeping (H), unknown (U), transposable elements (TE) and viral (V) category (Additional file 2). The sequences derived from S category are composed of 278,351 reads, which were assembled with 3.600 CDS, with an average of 77 sequences per CDS (31% of total CDS). H category-related sequences accounted for 4,629 CDS (average of 66 reads per CDS), assembled with 307,184 reads; whereas 2,822 CDS assembled with 331,738 reads (average 117 reads per CDS) represent the U category. The TE category is composed of 618 CDS (average of 23 reads per CDS), assembled with 14,139 reads. Finally, the viral category contained 7 CDS assembled with 286 reads, which average 41 sequences per CDS (Summarized in Table 2). In addition, the classified CDS were subsequently grouped in 120 families according to function.

This annotated catalogue is available in additional file 2 and summarized in Table 3 and 4.

Comparison of *R. microplus* sialotranscriptomes generated by different technologies

Currently, there are some *R. microplus* transcriptomes available, such as the *R. microplus* sialotranscriptome obtained by SMART technology (94). Transcripts generated from cDNA libraries of UFLRmR, NSGRmR, FSGRmR, MSGRmR, UFLRmS, NSGRmS, FSGRmS and MSGRmS were clustered in 3,342 contigs (derived from 7,923 ESTs). Another work, performed from a mRNA *pool* of the different tick tissues (salivary glands, ovaries, gut, eggs and synganglia) and different environmental conditions (temperature, hemoparasite infection, exposure to the host's odour and acaricides) showed 42,512 ESTs available at BmiGI database (*Boophilus microplus* ESTs database) (68), nevertheless the information generated by the present study has greater quantitative and qualitative impact over other studies, mainly because of the sequencing platform used to obtain the transcripts. For example, the *R. microplus* sialotranscriptome previously performed by Maruyama and colabs. (94), using SMART technology, resulted in 53% newer information when compared to the published BmiGI. The *R. microplus* sialotranscriptome described here have been performed by 454-based RNA-Seq and achieved 9,243 newer CDS or 79% more information, mainly from salivary transcripts, when compared to the previous works.

Additionally, there is an available cattle tick database that presents 1.8 Gigabase pairs of DNA from gene-enriched regions of the *R. microplus* genome that used eggs and larvae as DNA

sources (69). However, this database lacks information on salivary constituents, tick biological processes when fed on genetically resistant or susceptible hosts, and also tick developmental stages. Such information has been addressed by the present *R. microplus* sialotranscriptome.

The new *R. microplus* annotated catalogue: the five broad categories (H, S, TE, V and U) and their families

The families found and annotated in *R. microplus* sialotanscriptome will be presented descriptively and comparisons of differential transcript expression had been done mainly for S category, which are present in all *R. microplus* libraries. The criterions for differential expression analysis were based on developmental stages and origin of blood meal (bovine hosts). For this proposal the following comparisons had been performed: libraries of the RmR vs libraries of the RmS, UFLRmR vs UFLRmS, NSGRmR vs NSGRmS, MSGRmR vs MSGRmS and FSGRmR vs FSGRmS, as well as UFL vs NSG, NSG vs MSG, NSG vs FSG and MSG vs FSG from RmR or RmS. Table 5, additional table 1 and supplementary tables 1 and 2 also include differential transcript expression of the H, U, TE and V category, nevertheless not addressed in details on discussion.

The following text serves as a guide for browsing Additional file 2.

Housekeeping category: H class of expressed genes

The 4,629 CDS annotated as H- category genes expressed in *R. microplus* sialotranscriptome were assembled from 307,184 reads and further characterized into 18 subgroups according to function (summarized in Table 3 and Additional file 2).

A group of transcripts associated to tick immunity composed by 5,378 reads and assembled on 52 CDS has more similarity with toll-like receptors, protein associated with interferon, alpha-2-macroglobulin and other native immunity proteins. It also was to recovered proteins that may be affecting the host immune response, such as macrophage migration inhibitory factor and immunoglobulin G binding proteins (IgGBPs). The results suggest the presence of such transcripts are essential for *R. microplus* own defense against pathogens, which may be present in the host`s blood or even the environment, as well as to intervene the immune response of their hosts during tick parasitism.

Cytosolic peptidases were also found, such as cathepsin, calpain, aminopeptidase, membrane protease, signal peptide peptidase, carboxypeptidase and other peptidases, totaling 42 CDS annotated from 1,501 reads. Regarding the structural constituents were identified and annotated as cytoskeletal protein group, represented by 284 CDS to tubulins, actins, spectrins,

myosins, among others also retrieved. A total of 245 CDS representing an important salivary function were annotated as protein export machinery.

Enzymes dealing with tick detoxification were retrieved and classified as sulfotransferases, glutathione transferase, dehydrogenases, O-methyl transferases, multidrug resistance transporters, totaling 58 CDS (assembled with 1,096 reads). Furthermore, 41 CDS (assembled with 867 reads) were annotated as enzymes dealing with oxidative detoxification, comprised by cytochrome P450 and catalase, as well as selenoproteins and superoxide dismutase that may be secreted and antagonize inflammatory host responses.

A total of 153 CDS with 18,777 reads code for proteins associated with extracellular matrix and adhesion were also retrieved. Regarding tick metabolism, the family proteins dealing with metabolism of amino acid, carbohydrate, energy, intermediate, lipid and nucleotide were recovered counting 589 CDS extracted from 61,488 reads. It also recovered the CDS associated with nuclear export group and nuclear regulation had 11 members assembled from 478 reads and 136 CDS from 4,633 reads, respectively.

The 220 CDS attributed to protein modification machinary group were assembled from 11,878 reads. Recently, our group demonstrated that the *R. microplus* ingests, modifies, and re-circulates the host´s proteins, thus this process may confer immunogenicity and self-recognizing by bovines (193). We suggest that protein members of this group may function as an evasin mechanism from the host protective responses, including immune response.

Annotation of proteasome machinery group derived 139 CDS extracted from 5,263 reads, whereas protein synthesis machinery group had 312 CDS extracted from 30,173 reads. From five hundred twenty-two CDS extracted from 19,438 reads and annotated as signal transduction, 42 CDS (2,070 reads) were associated to apoptosis. The sequences representing transcription factors, clustered in 93 CDS extracted from 5,258 reads, whereas transcription machinery group had 456 CDS assembled from 26,075 reads. The 214 CDS deriving from transporters and storage group represented only 4,63% of all CDS associated within the H class, extracted from 8,966 reads.

About 1,020 CDS were classified as either unknown conserved, having 988 CDS extracted from 76,328 reads, or unknown conserved secreted proteins with 32 CDS extracted from 1,448 reads. These conserved proteins of unknown function are possibly uncharacterized proteins associated with cellular function or modulation of host's responses, respectively. Annotated data from H category transcripts is available at Additional file 2 and summarized in Table 3.

Secreted category: Putatively secreted class of expressed genes

A total of 278.351 reads assembled into 3,600 CDS were associated with putatively secreted proteins from *R. microplus* ticks. Recent works had implicated such transcripts as coding for proteins important to blood feeding (25, 54, 75). Additional file 2 and Table 4 contains meticulous analyses and are annotation of this transcripts category. Annotated data include previously known gene families, such as lipocalins, metalloproteases, proteases, protease inhibitor domain-containing peptides, antimicrobial peptides, immuno-modulators, nucleases, cement, glue, silk-like and glycine rich proteins, basic and acid tail proteins, among others important protein families associated to tick blood meal.

The following annotation is a guide for browsing Additional file 2, Table 4 and 5, Additional table 1 and Supplementary tables 1 and 2.

Protease inhibitor-containing domains

This family represents 4% (11,502 reads) of reads annotated with putative secreted proteins, totalized 368 CDS for proteins containing domains associated with protease inhibitors, such as Kunitz, serpin, kazal or TIL domain-containing proteins, thyropin, cystatin, carboxypeptidase inhibitor and others. A more detailed discussion on this CDS families is presented bellow.

Kunitz domain-containing proteins

Kunitz-domain containing proteins are abundantly found in sialotranscriptomes of hematophagous arthropods, such as flies (25, 90-92) and ticks (51, 75, 93), including previous *R. microplus* sialotranscriptomas (94). These proteins containing Kunitz domain have already been described and functionally characterized as inhibitors of blood coagulation (95-97), vasodilator function (98) and protease inhibitor (99-101). Additional file 2 displays 201 kunitz domain-containing sequences deduced from 5,408 reads found in the present *R. microplus* sialotranscriptome, 69 of which are full length from starting methionine (Met) to stop codon and include a signal peptide indicative of secretion. These proteins contain one to six kunitz domains based on their SMART signature, classified as monolaris, bilaris, trilaris tetralaxis, pentalaris, hexalaris.

In general, the transcripts annotated as monolaris, bilaris and trilaris are significantly more expressed in RmS libraries ($p< 0.001$), whereas pentalaris and hexalaris are expressed in higher levels in RmR libraries ($p=0.003$ and $p<0.001$, respectively) and only tetralaris do not have

significant difference between libraries (Table 5). Concerning the analysis of transcripts by tick developmental stages, it is noteworthy that the hexalaris and pentalaris families are not expressed in the larval and females stages independent of the blood meal origin, if resistant or susceptible hosts (Additional table 1). The monolaris, bilaris and trilaris families are significantly more expressed at larvae originating from females (initial stage) while fed on resistant hosts ($p<0.001$, $p<0.001$ and $p=0.009$, respectively), however the ticks fed on susceptible hosts had higher levels of these transcripts expression during intermediate (nymph, $p<0.001$) and final (adult male, $p<0.001$) stages (Additional table 1).

This observation can be better visualized by comparing transcripts from each developmental stage of ticks fed on susceptible or resistant hosts. In general these transcripts are increasing significantly over the infestation course, which achieve higher expression in adult stage (Supplementary tables 1 and 2), period that the ticks need more of these constituents for blood feeding. Taken together, these findings suggest that larvae derived from females fed on resistant hosts show an increase of transcripts for this family, possibly due to the influence of their progenitors received of effective hosts responses during their feeding, thus suggesting that these larvae are prepared for a future infestation in these same resistant hosts. In addition, the few adult ticks found feeding on resistant hosts at final blood meal process have also significantly increased expression compared to premature stages of tick development (Supplementary table 1), similar to what happens in ticks fed on susceptible hosts (Supplementary table 2). Concerning the ticks fed on susceptible host, these are usually found in great numbers at the final infestation stage (adult), suggesting that these exhibit greater ease during the whole infestation course, especially at final blood meal process that have the higher levels of expression to these transcripts.

Serpins

Serpins or serine protease inhibitors belong to an ubiquitous protein family, which plays key roles in controlling blood coagulation and inflammation. These proteins have been abundantly identified in tick (25, 62, 75, 102). Member of this family has inhibitory effects of cathepsin G, chymase and vertebrate elastase as well as immunosuppressive activity in *I. ricinus* (103-105). Due to various functions assigned to serpins, these proteins have been considered as potential target antigens to the development of an anti-tick vaccine, including non-salivary expressed serpins (62, 106). Our sialotrancriptome analysis retrieved 15 CDS assembled from 954 reads that are associated to members of this family, seven of which are full length having predicted signal peptide indicative of secretion. In general, these transcripts are significantly more

expressed (*p<0.001*) in RmR libraries (Table 5), suggesting that this increased expression in RmR may be due to pressure suffered by these ticks to efficiency haemostatic responses of their hosts. When analyzed the transcripts by tick developmental stages, it is noteworthy that these transcripts are abundantly expressed in male libraries, despite all tick stages present transcripts for this family (Additional table 1). This higher expression in male ticks happen independently of the origin of blood meal, if resistant or susceptible host (Supplementary tables 1 and 2). So, when comparing only transcripts from male ticks libraries, these are significantly more expressed in male ticks fed on susceptible hosts (Additional table 1). Taken together, these results suggest that the male ticks play a fundamental role at final blood meal process, especially when feeding on susceptible hosts.

Thyropin (TY) domains

Thyropins is a term used to determine protein which has the ability to inhibit either cysteine or cation- dependent proteinases (107). These thyroglobulins and cysteine protease inhibitors are characterized by motifs of the actiniam-derived equistation protein (108-110), which has been implicated in protease inhibition (108), moreover, it is associated with the major histocompatibility complex (MHC) class II molecule supporting its involvement as a controlling factor in the process of antigen presentation (107). These proteins that are characterized by presence of the TY domain in SMART database have been previously indentified in *A. variegatum*, *A. maculatum, R. sanguineus* ticks (51, 56, 75), beyond previous *R. microplus* sialotranscriptome (SMART database) (94).

Additional file 2 shows four full length sequences assembled from 76 reads having predicated signal peptide indicative of secretion and TY domains in SMART database. All sequences exhibit better matches to a *R. sanguineus* salivary thyropin deposited in the NR database. Interestingly, as observed in *A. maculatum* sialotranscriptome, a sequence (Rm-nr-55483) with 26 potential galactosylation sites was recovered, indicative of thyropins and mucin domains (75). In general, members of this family are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmR libraries (Table 5). When the source of blood meal is resistant hosts, members of this family are expressed during all tick developmental stages, since when the source of blood meal is susceptible hosts only nymphs express transcripts to this family (Additional table 1).

Cystatins

Cystatins belong to a family of cysteine protease inhibitors generally containing four conserved cysteine residues, which form two disulfide bonds and typically present 115 amino acids (111-114). These were functionally characterized as inhibitors of cathepsins L and S that

possess anti-inflammatory and immunosuppressive activity (115), and are considered potential target for vaccines (30, 116). Thirty-four CDS to cystatins extracted from 941 reads were recovered from *R. microplus* sialotranscriptome, 21 of which appear full length, including predicted signal peptides indicative of secretion. Representatives of this family are present in all *R. microplus* libraries (Additional table 1) showing significantly higher expression (*p=0.009*) in RmS libraries (Table 5). In analysis of transcripts by tick development stages, these at the beginning of infestation are significantly more expressed in larvae originating from female fed on resistant hosts (*p=0.02*), whereas in the intermediate (nymph) and adult (male) stages these transcripts are significantly more expressed (*p<0.001*) in ticks fed on susceptible hosts (Additional table 1).

When analyzed only the transcripts from RmR libraries, these are significantly more expressed in male ticks (Supplementary table 1), whereas only transcripts from RmS libraries are significantly more expressed in nymph and male ticks (Supplementary table 2). Therefore, whatever the source of blood feeding, the ticks will always need to members of this family during the whole infestation course. In addition, the male tick are which stands in expression of this family, suggesting again that the male ticks have plays an important role at final process of blood meal.

Kazal domain

Kazal-containing peptides belong to an important family which are also considered serine protease inhibitor and affects other proteins with high affinity, as thrombin and plasmin as well as exhibit antimicrobial activity (117-120). In addition, in *Am. variegatum* sialotranscriptome the multidomain-containing proteins may present the kazal domain in tandem with the insulin growth factor binding domain, suggesting modulation function of signal transduction cascades (56). Representatives of this family were previously identified in other sialotranscriptomes of hematophagous arthropods, including *R. sanguineus, Am. Variegatum* and *Am. maculatum* ticks (51, 56, 75).

Our libraries retrieved six CDS assembled from 306 reads having predicted signal peptide annotated as Kazal domain-containing peptides. Three sequences (Rm-nr-88797, Rm-nr-113485 and Rm-nr-113484) are full length. The CDS named as Rm-nr-88797 of *R. microplus* sialotranscriptome had 99% identity and 73% coverage with CDS of *Am. maculatum* (Am-25261). Previous annotation of this transcript shows a kazal domain in its amino terminal region, an EFhand domain and a von Willebrand factor type C domain in the carboxyterminus. This protein presents an high identification with the follistatin-related protein (FRP) of the tick *Haemaphysalis longicornis*, which have been associated to housekeeping function (75). Similar proteins in

vertebrates had been associated to ion transport modulation in neurons, despite housekeeping function (121). In summary, these representatives are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmS libraries (Table 5). Concerning the analysis of tick developmental stages, these representatives show no significant difference between the larvae originating from female fed on resistant or susceptive hosts, while nymphs fed on resistant hosts have a significantly higher expression than nymphs fed on susceptible hosts (*p=0.01*) and at adult stages, the male and female ticks when fed on susceptible host exhibit significantly higher number of transcripts (*p<0.001*) than adults fed in resistant hosts (Additional table 1).

Carboxypeptidase inhibitors (CI**)**

Proteins present in this family have been identified and characterized in *R. bursa, R. sanguineus, H. longicornis and A. maculatum* ticks (51, 75, 122-124). The CI from *R. bursa* is a protein strongly constrained by disulfide bonds that shown stimulates fibrinolysis *in vitro* by inhibiting plasma carboxypeptidase B, also known as thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (122). A group of 17 sequences coding for CI assembled from 508 reads were retrieved from *R. microplus* sialotranscriptome. Of these, 13 CDS have predicted signal peptide indicating secretion. Seven CDS presented best match with *R. bursa* sequences, however five CDS had best match to *R. sanguineus*, further two CDS to *H. longicornis*, two CDS to *I. scapularis* and one CDS to *Cupiennius salei* specie, which indicate its diversity.

In general these representatives are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmS libraries (Table 5). Concerning the analysis of transcripts by tick developmental stages, these representatives do not show significant difference between unfed larvae libraries (UFLRmS and UFLRmR) as well as female libraries (FSGRMS and FSGRmR), whereas between the nymphs libraries (NSGRmS and NSGRmR) these representatives are significantly expressed in nymph when fed on susceptible host (*p<0.001*), as happens with male libraries that male ticks fed on susceptible hosts have significantly higher expression (*p<0.001*) to these transcripts (Additional table 1). Thus, we suggest these *R. microplus* representatives may be used to promote the thrombotic disorders in its hosts, especially in susceptible hosts.

Chimadanin proteins

Additional file 2 reveals four CDS assembled from 491 reads, three of which are full length and code for a thrombin inhibitor previously identified in *H. longicornis*, named as chimadanin. These proteins may play an important role in tick blood feeding because they present anticoagulant function with thrombin inhibitory activity (125). As other families associated to the facilitation of blood feeding, these also are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmS libraries

(Table 5). Member of this family is not present in unfed larvae libraries, and in nymph, male and female ticks this representative is significantly more expressed (*p<0.001*) when fed on susceptible hosts (Additional table 1). These results suggest that ticks when fed on susceptible hosts have more transcripts for this family which can facilitate the process of blood meal.

Phosphatidylethanolamine-binding protein family

The present *R. microplus* sialotranscriptome indentified only one CDS extracted from 31 reads associated to phosphatidylethanolamine-binding protein family. This protein belongs to another family associated to serine protease inhibition (126) and have been previously found in *A. maculatum* (75). Their role in tick remains to be determined.

Enzymes

Sequences containing enzyme signatures and signal of secretion were annotated as secreted enzymes. These represent 5% of the reads annotated as putative secreted proteins assembled in 302 CDS. It is important to note that some enzymes listed below could also be associated with H function, thus a more detailed discussion on these proteins are present as follows.

Protease

In the present *R. microplus* sialotranscriptome, secreted proteases represent the majority of the CDS coding for enzymes, in agreement with previous tick transcriptome (75). The metalloproteases represent the bulk of the extracted sequences coding for enzymes, totaling 172 CDS derived from 6,983 reads. The metalloproteases were sub-classified in (i) reprolysin family containing 115 CDS assembled from 5,686 reads, (ii) neprilysins family containing 44 CDS assembled from 958 reads and other metalloproteases containing 13 CDS assembled from 339 reads.

i) Reprolysin-type metalloprotease**:** The members of this family have abundantly been found in tick sialotranscriptomes (25, 65, 75, 127). In the present *R. microplus* sialotranscriptome, they were annotated as transcripts coding for proteins that contain the ZnMc_salivary_gland_MPs domain in CDD database. From a total of 115 CDS, 33 are full length sequences from Met to stop codon and contain predicted signal peptide indicative of secretion. Other 14 incomplete sequences also present predicted signal peptide. Reprolysin-type metalloproteases have been identified and characterized in saliva of *I. scapularis* tick as a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis, and further fibrinogenolytic activities (27, 65).

ii) Neprilysin-type metalloprotease: This group is represented by metalloprotease that present PFAM peptidase_M13_N motif, which plays an important role in turning off peptide signalling events at the cell surface (128, 129). The Neprilysins are integral plasma membrane ectopeptidases of type II and generally do not appear in tick saliva, because of a hydrophobic non-cleaved segment next to NH2 terminus, which forms a membrane anchor (128, 130). The loss of such membrane anchoring domains leads to their presence on tick saliva. Generally, these enzymes are involved in the metabolism of several peptides that regulates inflammation and the immune systems (129), therefore represent potential therapeutic targets (128). Twenty one CDS out of 44 CDS are full length, as shown on Additional file 2, but only 2 (Rm-tb2-59318 and Rm-tb2-14440) of these sequences carries predicted signal peptide indicative of secretion. Other 4 incomplete sequences also present signal peptide.

The reprolysin and neprilysin-type metalloproteases are expressed in all tick developmental stages (Additional table 1), thus concerning blood meal these representative are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmS libraries (Table 5), mainly in nymph and male ticks (Additional table 1). Analyzing these transcripts on RmR libraries, significantly higher levels of expression have been found in UFLRmR and FSGRmR libraries (Supplementary table 1). We suggest that the presence of these secreted enzymes could play an important role to degrade host inflammatory and immune peptides, which may be present in the hemorrhagic pool of tick attachment site.

Dipeptidyl peptidase / M2 domain family

The enzymes present in this family are called angiotensin I-converting enzymes due the presence of PFAM peptidase_M2 domain. The angiotensin converting enzyme is an exopeptidase circulating that participates in the renin-angiotensin system, which mediates extracellular volume and are directly associated to vasoconstriction by the conversion of angiotensin I into an active peptide angiotensin II. In *I. scapularis* saliva, these components have been involved in bradykinin degradation (131), favoring the vasoconstriction, since the bradykinin causes vasodilation. Members of this family were identified in the present *R. microplus* sialotranscriptome, totalizing 7 CDS assembled from 447 reads that achieved best match to *I. scapularis* on NR databases. Three sequences appear to be full length and two (Rm-nr-105343 and Rm-nr-105362) have predicted signal peptide indicative of secretion. Again, similar happing in metalloproteases families, this family is also significantly more expressed in RmS (Table 5), particularly by male ticks (Additional table 1).

Serine proteases

These trypsin-like enzymes have been abundantly been found in previous hematophagous arthropod sialotranscriptomes, including ticks (25, 53, 75). Such enzymes participate on inflammation or inhibitor of blood coagulation by affecting the reactive protein C or fibrinolysis pathways on their hosts (25, 132). Members of this family, recovered on the present study, were assembled in 74 CDS from 5,494 reads. Forty-four of which are full length sequences, but only 33 CDS have predicted signal peptides indicative of secretion. While this family is significantly more expressed in RmR libraries (Table 5), male ticks fed on susceptible hosts express significantly more serine proteases (*p<0,001*) than males fed on resistant hosts (Additional table 1). Nevertheless, these enzymes are important during all time in tick infestation, independent of the origin of blood meal.

Serine carboxypeptidases

The serine carboxypeptidases are characterized by present the PFAM Peptidase_S10 domain. This enzyme was identified in midgut from the hard tick *H. longicornis* and its expression was up-regulated during the course of blood-feeding. This enzyme is supposed to localize at lysosomal vacuoles and on the surface of epithelial cells. In enzymatic functional assays revealed efficiently hydrolyzed the synthetic substrates specific for cathepsin A and thiol protease. Furthermore, this enzyme was associated to cleave hemoglobin, a major component of the blood-meal (133). So, this enzyme may play an important role in the digestion of the host's blood-meal. The sialotranscriptome of *R. microplus* reveals 25 CDS producing matches to this class of enzymes, 10 of which appear to be full length and 5 contain signal peptide indicative of secretion. Representatives of this family are similarly distributed between the RmR and RmS libraries (Table 5) and are present in all development stages of the tick (Supplementary tables 1 and 2).

Transglutaminase family

Additional 2 displays 4 CDS assembled from 455 reads annotated as transglutaminase. The role of this enzyme is not clear in the tick, but we suggest that it may participate in blood coagulation and fibrinolysis system, through the factor XIII or fibrin stabilizing that crosslinks fibrin (134, 135). These representatives are significantly more expressed in RmR libraries (Table 5), specially in larvae and female libraries. Note on the male tick libraries the expression of the transcripts significantly increase than other tick developmental stages and this regardless of the blood meal (Supplementary tables 1 and 2). So, the results suggest that these members can assist the tick during the blood meal and again the male ticks are primarily responsible.

Legumain family

Legumain are asparaginyl endopeptidases belong to the CD clan, peptidase_C13 family of cysteine proteases and are commonly found in tick digestive tract and usually are up-regulated by the host blood-feeding process. Its function generally is associated as hemoglobinolysis process (136-139). In the present work, five CDS assembled from 149 reads were annotated as belonging to the legumain family. The Rm-nr-117561, Rm-nr-20455 and Rm-nr-112512 are full length sequences. These representatives are similarly expressed in both RmR and RmS libraries (Table 5) and again these are significantly more expressed in male ticks regardless of the blood meal (Additional table 1 and supplementary tables 1 and 2). So, these can be critical for the final process of digestion of blood components in ticks feeding on any host.

In addition, four CDS coding to cathepsin (aspartyl and cysteine proteases) were also found in *R. microplus* sialotranscriptome, having predicted signal peptide indicative of secretion, however, these proteins could be destined to the lysosome. Other 11 CDS were found and annotated as peptidase or endopeptidase.

Endonucleases

In present *R. microplus* sialotranscriptome displays 16 sequences coding to the endonucleases assembled from 470 reads. Of these, 10 CDS annotated as deoxyribonuclease II, including 4 complete sequences starting from Met to stop codon and having predicted signal peptide indicative of secretion. It was also found three CDS to ribonuclease, such as T2 and dsRNA-specific ribonuclease. These endonucleases have been found in diverse arthropods, including ticks (25, 56, 75, 140-142). In general, the deoxyribonuclease and ribonuclease are involved in the metabolism of nucleotides by hydrolyze deoxyribonucleotide linkages in native and denatured DNA, and catalyze the degradation of RNA into smaller components, respectively. In general, these representatives are present in ticks fed on resistant or susceptible hosts, having the significant difference in deoxyribonuclease II, T2 and outher endonuclease families. The transcripts to deoxyribonuclease II are significantly more expressed in RmS libraries, whereas other two families are in RmR libraries. So, we suggest that these endonucleases may help the ticks during their attachment by reduce the viscosity and laceration of the feeding lesion in host skin, besides producing anti-inflammatory nucleotides and possibly may also affect the formation of neutrophil extracellular trap-NET, but this situation is unclear in the tick (142, 143).

5' nucleotidase / apyrases

Members of the 5’-nucleotidase family, the apyrases have been commonly identified in salivary gland of several hematophagous arthropods, including ticks (75, 144-146). In *R. microplus*

sialotranscriptome displays 14 CDS assembled from 572 reads to members of the 5' nucleotidase family, including 4 full length sequences having predicted signal peptide indicative of secretion. These representative are similarity expressed in both RmR and RmS libraries (Table 5) and are abundantly expressed in the adult tick stages regardless of the origin of blood meal (Supplementary tables 1 and 2). These apyrases having anti-inflammatory and anti-haemostatic activity by hydrolyze ATP and ADP released by injuried cells, platelets and neutrophils to yield AMP and inorganic phosphate, favoring the inflammation and platelet aggregation (25, 146-149). So, these representatives can be essential for the tick control the inflammatory and haemostatic responses.

Lipases / esterases / sphingomyelins

Lipases are enzymes belongs the subclass of esterases fundamental in lipid metabolism. In addition, some lipases are secreted by pathogens for facilitate the infection (150) and also these enzymes may affect the inflammatory and immune response of their hosts by interfering in signaling pathways. Enzymes belong this family has been previously found in ticks (75, 151). Here, six CDS coding to lipase were assembled from 195 reads and three CDS are full length and contain signal peptide indicative of secretion. Moreover, two complete sequences to sphingomyelin phosphodiesterase assembled from 18 reads were also recovered from sialotranscriptoma. Both the families are significantly more expressed in RmR libraries (Table 5). These representatives basically are present in male ticks (Additional table 1). So, again the male ticks can be critical for modulating the important responses of their hosts.

Glycosidases

The *R. microplus* sialotranscriptome reveals 15 CDS assembled from 456 reads having chitinase domain in several database. Three of these CDS are full length, including predicted signal peptide indicative of secretion. These chitinases are hydrolytic enzymes that break down glycosidic bonds in chitin and also have activity in blood. As the chitin is a component of the cell walls and exoskeleton elements of some pathogens, which in turn may be present in the host´s blood circulation, these play an important role in protecting from invasion of pathogens in ticks, making this chitinase useful as a candidate tick vaccine (152). Moreover, the proteins containing chitin binding domain play important role in the lubrication of tick mouthparts and in adhesion of extracellular matrix (53). So, the chitinases also can participate in recruitment and activation of basophils (153, 154). These representatives are similarity expressed in RmR and RmS libraries (Table 5) and are abundantly expressed in male ticks regardless of the origin of blood meal (Supplementary table 1 and 2). In comparative analysis using male tick libraries, the transcripts

from this family are significantly more expressed in male ticks (*p<0,001*) fed on susceptible hosts (Additional table 1).

Mucins / Perithrophin

Two hundred-fifteen CDS were extracted from 21,301 reads originating from *R. microplus* sialotranscriptome and annotated as mucins, 97 of which are full length, including predicted signal peptide indicative of secretion. Other 40 CDS presented predicted signal peptide. These are characterized as serine/threonine-rich proteins containing high potential glycosylation sites-NetOGlyc and are generally found in mucosal tissues. These proteins have been found in previous tick sialotranscriptomes (51, 75) and have an important role in immunity acting in prevention and protection against pathogens (143, 146). These representatives are significantly more expressed in all tick developmental stages from RmR libraries (Additional table 1). In additional, these are abundantly more expressed in male ticks regardless of the origin of blood meal (Supplementary table 1 and 2).

Galactosidase / fucosidase

Fifteen CDS assembled from 1.012 reads coding either galactosidase or fucosidase were annotated in *R. microplus* sialotranscriptome, which usually are associated with carbohydrate metabolism. Six CDS are complete sequences, including signal peptide indicative of secretion. These enzymes can perform various functions and suggest that these representatives in ticks can also break down the skin matrix of the hosts and the balance of glycosylation and sialylation of constant fragment of immunoglobulins G altering dramatically the pro- and anti-inflammatory activities of these IgGs, by altering the affinity of binding to Fc receptor (155, 156). These representative are significantly more expressed in RmR libraries (Table 5), particularly in larval, nymph and male ticks (Additional table 1). So, these representatives can help the ticks in modulation of humoral immune response of their hosts, principally in ticks fed on resistant hosts.

Lipocalin family

Several members of lipocalin family have been abundantly found in salivary gland from hematophagous arthropods, including hard and soft tick (51, 53, 57, 93, 157). Additional file 2 introduces 294 CDS deduced from 10,524 reads presenting best similarity to the lipocalin family, such as P27 protein, serotonin and histamine-binding proteins, among other lipocalins. Of these, 143 CDS are full length having predicted signal peptide indicative of secretion. Other 56 full length sequences have no predicted signal peptide. It is known that histamine and serotonin are

important mediators of inflammation and hemostasis and may be critical for tick engorgement and transmission of the lyme disease agent (158). Moreover, The cattle resistance to *R. microplus* may correlates with total amount of histamine in the cattle skin (159). To intervene the effectively host responses, the ticks produce proteins binding to these small molecules (160). Other functions, such as anticlotting (161), anticomplement (162), regulation of hemostasis and inflammation by scavengers of biogenic amines (163), ADP (164), leukotrienes and thromboxane A2 (165, 166) are also associated with member of this family.

Fifty-four full length sequences associated with histamine-binding proteins containing His-binding domain in CDD and PFAM databases and one sequences of a high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin (SHBP) (160) were used to perfom the phylogenetic analysis (Figure 1). The phylogeny indicates the diversity of lipocalins that may play a similar function. The sequences were grouped in 10 different clades (group of I-X) defined by related proteins belonging to clade with > 59% bootstrap support. Notice that the analysis includes proteins that are very similar to each other, as well as proteins that are very different to each other. In addition, the *R. microplus* lipocalins present in these analysis are very divergent to SHBP of the high affinity from *D. reticulatus* ticks, but may present similar function. In general, these abundance of the sequences present in the same clade may represent gene duplicantion, being expressed at different times as needed to ticks.

These representatives are significantly more expressed in RmS libraries (Table 5). In unfed larvae libraries, these representatives are significantly more expressed in UFLRmR, whereas in nymph, male and female ticks these representatives are significantly more expressed in ticks fed on susceptible hosts (Additional table 1). In general, member of this family is present in all tick developmental stages regardless of blood meal origin (Supplementary tables 1 and 2). Thus, due to the fact that the R*. microplus* remain attached to their hosts for a few weeks, the diversification and the amount of these lipocalins may reflect host adaptation to efficiently complete their blood meal.

<u>Prokineticin domain-containing peptides</u>

Three complete sequences coding to prokineticin domain-containing peptides were deduced from the *R. microplus* sialotranscriptome containing PFAM prokineticin domain. While these proteins have no known function in ticks, it is known that they belong to the same family that protein from the venom of the black mamba snake that induces smooth muscle contraction (167). Representatives of this family are expressed practically in the RmR libraries (Table 5), more precisely in the male tick libraries (Additional table 1).

Secreted immunity-related proteins

The analysis of the *R. microplus* sialotranscriptome revealed multiple CDS associated to important bioactive pharmacological molecules implicated on tick protection, such as antimicrobial peptides (AMPs), IgGBPs, evasins, immunosuppressant and others (168-171). Additional file 2 shows approximately 152 CDS to AMPs extracted from 6,502 reads and 73 are full length sequences starting to Met from stop codon and have signal peptide indicative of secretion. These proteins were distributed in eight families, denominated: hebreain/microplusin/ricinusin, defensin, longicornsin, lysozyme, ixoderin/ficolin, ML domain containing, antigen 5 and trypsin inhibitor-like (TIL) domain-containing proteins families. In addition, of these eight families, only three (longicornsin, lysozyme and ML domain containing peptides families) are significantly differentially expressed (*p=0.01, p=0.005* and *p=0.003*, respectively) between RmR and RmS libraries (Table 5), showing that AMPs are important to protection of the tick independent of blood meal source (172). A detailed discussion on these transcripts is presented bellow.

The hebreain/microplusin/ricinusin proteins

This family is represented by 9 CDS assembled from 679 reads, and most of them (8 CDS) possess a signal peptide indicative of secretion. The AMPs of this family are always present during all tick developmental stages, independent of the blood meal origin, but with a larger expression in males ticks (Additional table 1 and Supplementary table 1 and 2). Members of microplusin family have been characterized as cysteine-rich antimicrobial peptides with histidine-rich regions at the N and C termini. These components are known to act in the tick innate defense against pathogens (173, 174).

Defensin and Longicornsin proteins

Twenty-two CDS extracted from 944 reads, were annotated as defensins. Futher analysis revealed that 18 CDS are full length sequences and 13 CDS have predicted signal peptide indicative of the secretion. Other four CDS annotated as defensin-like proteins, named as longicornsin proteins, had the best similarity with *H. longicornis.* These molecules showed strong antimicrobial ability against drug-resistant microorganisms (175). Defensin members are constantly produced by ticks independent of the source blood meal (Additional table 1), however comparisons between male ticks libraries (MSGRmS and MSGRmR) (Supplementary tables 1 and 2), shows that defensin expression is higher (*p<0.001*) on male fed on susceptible hosts. Furthermore, longicornsin are only produced by male tick (Additional table 1 and Supplementary tables 1 and 2), however there is a significant different (*p<0.001*) between male ticks fed on

resistant or susceptible hosts, as a great expression is observed in males fed on susceptible hosts (Additional table 1).

Lysozyme protein

Three CDS extracted from 32 reads represent this family. Members of this family can be produced by various organisms, including the ticks (176) and are able to digest certain carbohydrates of high molecular weight. This process includes the hydrolyzes of beta 1,4 glycosidic linkages between residues of N-acetylmuramic acid (Mur2Ac) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) on the peptidoglycan, consequently destroy the protective layer of several bacteria, so, these are considered important antimicrobial peptides (177). In *R. microplus*, these transcripts are produced in abundance by male (Additional table 1) independent of the blood meal origin (Supplementary tables 1 and 2).

Ixoderin/ficolin (Fibrinogen and ML domain containing proteins)

Other twenty-four CDS extracted from 582 reads were also associated to pathogen recognition proteins class, such as Ixoderin/ficolin family containing fibrinogen domain (11 CDS assembled from 277 reads, six are full length sequences, including signal peptide indicative of secretion) and ML domain family (13 CDS assembled from 305 reads, 7 are full length). The ML domain is related to the recognition structure of MD-2 lipid that composes Toll-like receptor in innate immunity. This domain is rich in beta pleated structures, which could assist its function to interact with lipids (178). These representatives participate on tick innate immunity (179-181). Representatives of these families are present in all tick developmental stages (Additional table 1) and again having an abundance of reads in male independent of the origin of blood meal (Supplementary tables 1 and 2). In addition, member of ML family are significant more expressed in male fed on resistant host (Table 5 and Additional table 1).

Antigen-5 family (Antigen 5/CRISP/CAP)

Additional file 2 displays 18 CDS coding for proteins similar to wasp-venom, called antigen-5, which were assembled from 1,879 reads deduced from the *R. microplus* sialotranscriptome. Six CDS are complete sequences, including predicted signal peptide indicative of secretion. Proteins belonging to this family are ubiquitously found in wasp-venom as well as in various hematophagous arthropods, including the ticks (23, 25, 53, 56). The CAP superfamily, which comprises Antigen-5, cysteine rich secretory protein-CRISP and pathogen-related-1 families (182) has diverse functions. In plants, members of this family have antimicrobial activity (183,

184). Representatives of this family are present in all tick developmental stages, independent of the blood meal origin (Additional table 1 and Supplementary tables 1 and 2).

Trypsin inhibitor-like (TIL) domain-containing proteins

Many protease inhibitors may exert antimicrobial function (185), mainly due to ten cysteines forming five disulfide bonds, that characterizes TIL domains. Members of this important family have already been found in tick sialomes and sialotranscriptomes, including in *R. microplus* (75, 186, 187). An example of a protein with antimicrobial activity containing TIL domain is the subtilisin inhibitor found and characterized in *R. microplus* (187). Our analysis revealed 72 CDS coding for cysteine-rich antimicrobial peptides, extracted from 2,260 reads. From these, 32 are full length sequences, including predicted signal peptide, besides 20 incomplete sequences that also have predicted signal peptide, suggesting their presence in tick saliva. Representatives of this family are present during the whole tick development, regardless of the source of blood meal (Additional table 1), possibly due to the long period that remain fixed until the full blood meal. In addition, these representatives are significantly more expressed in male ticks than other tick developmental stages (Supplementary tables 1 and 2), especially male ticks fed on susceptible host (Additional table 1). This higher expression by males may be important to female protection and effective blood meal. This idea is supported due the fact that AMP transcripts are expressed in low levels in females salivary glands.

In order to demonstrate the diversity between AMPs in *R. microplus* saliva, a phylogenetic analysis (Figure 2) was performed using as input, 39 full length sequences (sequences the antigen 5, defensin, longicornsin, hebreain/microplusin/ricinusin, lysozyme, ixoderin/ficoloin and ML domain containing peptides families) derived from the present work, together with two AMP sequences previously characterized and deposited in NCBI database, named as microplusin and longicornsin (169, 175). The analysis shows the abundance of protein sequences that may have antimicrobial activity. Some protein sequences have great similarity to each other (Rm-nr-120711 and Rm-nr-120712-nr, Rm-nr-172281 and Rm-nr-172282, among others). As an example, Rm-nr-135798 shows high identity with previously characterized microplusin. Moreover, despite the high identify to microplusin-NCBI, other sequences from the same family, such as Rm-nr-120711, Rm-nr-120712, Rm-nr-56986, Rm-nr-172282 and Rm-nr-172281 are very divergent (Figure 2), but may present the same antimicrobial function, showing the diversity of this class of AMPs. This observation is also repeated for the other families present in this analysis.

Neutrophil elastase proteins inhibitor and intermediate proteins

Surprisingly, analysis retrieved 5 CDS assembled from 528 reads that contained signal peptide, and annotated as neutrophil elastase proteins inhibitor (Table 4 and additional file 2). The Rm-nr-117512 sequence was extracted from 400 reads, being the most abundantly expressed of this group. It is known that neutrophil elastase is a serine proteinase from the same family as chymotrypsin. During inflammation, neutrophils secrete these proteinases, which are able to destroys bacteria and host tissue (188). Neutrophils migrate of similar magnitude into the skin of susceptible and resistant hosts infested with ticks and are found in large numbers at the tick attachment site (189). The expression of transcripts, coding for neutrophil elastase inhibitor proteins on the present *R. microplus* sialotranscriptome, are significantly more expressed in nymph independent source of blood meal and in females fed on resistant hosts (Supplementary tables 1 and 2). Regarding transcripts expressed on nymph stage, there are a significant increase on expression (*p<0.001*) by nymph fed on susceptible hosts (Additional table 1), In addition, skin from susceptible hosts infested with nymphs and adults of the *R. microplus* tick had a significantly higher neutrophil infiltration than skin from resistant hosts (supplementary figure 1). Taken together, these results indirectly suggest that neutrophils from resistant hosts are more efficient against ticks, even in smaller quantities than neutrophils from susceptible hosts.

Therefore, we suggest that elastase secreted by neutrophils are harmful to ticks during blood meal, especially in nymph and adult stages, due the presence of transcripts coding for neutrophil elastase inhibitor protein in R. microplus sialotranscriptome. It is important to note that 13 CDS extracted from 281 reads, had 30% of similarity on 60% of sequence length with hebreain/microplusin/ricisuni and neutrophil elastase inhibition protein families, therefore these transcripts were annotated as intermediate protein sequence family and can provide both functions or have unknown function (Additional file 2).

Immunoglobulin G binding proteins

The present *R. microplus* sialotranscriptome retrieved a total of 12 CDS (9 full length) coding for IgGBPs extracted from 2,810 reads. Comparison of transcripts coding for IgGBPs according to host genetic background and tick developmental stage, it is observed that significant differences *(p<0.001*) occur between RmR and RmS (Table 5), mainly between MSGRmR and MSGRmS libraries (Additional table 1). All sequences are present in both MSGRmR and MSGRmS libraries, but only five full length sequences (Rm-nr-20979, Rm-nr-20983, Rm-nr-21408, Rm-nr-20978 and Rm-nr-25946) are significantly different, as male ticks fed on resistant hosts have an increased expression (*p<0.001*) of these transcripts (Additional file 2). Although IgGBPs have been

reported to be produced exclusively by the male ticks (190), some reads were present in UFLRmR, FSGRmR and FSRmS libraries. In addition, previous work had identified IgBP of class C as the only protein from this family to be secreted in saliva of *R. Appendiculatus* tick (190), contrasting to our results (Additional file 2), in which IgGBP from classes A, B and C present predicted signal peptide and are potentially secreted on *R. microplus* saliva.

An ClustalW alignment and neighbor-joining phylogenetic analysis were performed using nine full length sequences and three IgGBP sequences previously deposited in NCBI database as input (Figure 3). The phylogenetic analysis reveals three relatively large clades have strong bootstrap support (I, II and III groups). The group I has four IgGBPs from R. microplus having high similarity with IgGBP of the B class previously deposited in NCBI database. In the II group has a sequences presenting high similarity with IgGBP of the C class and the group III has three sequences having high similarity with IgGBPs from *Ixodes scapularis*. In IV group, the Rm-tb2-25242 sequence is very divergent from the other sequences, possibly due to double size (molecular weight of 49,65 kDa), but exhibits a better similarity with IgGBP of the A class previously deposited in NCBI database. In addition, as in the case of other protein families, this variety of sequences clustered together in the same clade may represent alleles of the same gene or may reflect a mechanism of tick to generate diversity among IgGBPs. As in lipocalin family, it is possible that members of the same clade share the same function and reflect gene duplication, which could be expressed at different stages as needed. All these mechanisms support the knowledge that ticks must undergo several processes to protect them self from host antibodies responses.

Host antibodies are detrimental to ticks by neutralizing the tick salivary components that are inoculated into their host skin during the blood feeding process (22, 24). We suggest that the IgGBPs may disrupt the binding of IgG to the neonatal receptor, which promotes the recycling of IgG and increase its half life. IgG modifications inhibits this interaction leading to a rapid decrease in plasma levels (191, 192). In addition, tick infestation suppresses IgG antibody response in susceptible hosts (88), suggesting that IgG modificantions by ticks may account for such effect. Constrasting to these observations, resistant hosts presents lower levels of total immunoglobulins compared to susceptible hosts, yet sera resistant bovine recognizes different antigens from ticks saliva that could be important to elicit more specific and efficient antibody responses (193). Due to tese facts, we suggest that IgGBPs are produced in greater quantities by males fed in resistant hosts to circumvent effective antibodies response these hosts.

DAP-36 immunosuppressant and evasin

Members of these important immunomodulators families were assembled into 16 CDS from 468 reads (DAP-36 immunosuppressant) and 36 CDS annotated from 1114 reads (evasin). From DAP-36 immunossuppressant family, 8 CDS are full length sequences and 29 full length sequences are from evasin family. The DAP-36 was previously identified as an immunosuppressant of 36 kDa present in saliva from the tick *Dermacentor andersoni* (194, 195), while evasins were previously identified from the *R. sanguineus* tick as chemokine-binding proteins, implicated on reduction of cell migration (171, 196).

In general, these transcripts are significantly more expressed (*p<0.001*) in RmS libraries (Table 5). By comparing transcripts according to host genetic background and tick developmental stage, it is observed that significant differences in nymph, male and female ticks fed on susceptible hosts (*p<0.001*) than the same stages in resistant hosts (Additional table 1). Comparing only transcripts from RmS libraries, these transcripts are increasing significantly over the parasitic cycle, UFL to nymph, nymph to male or nymph to female ticks (Supplementary table 2). From comparing only transcripts from RmR libraries, it is observed a significant increase of expression in adult stages (*p<0.001*), male and female ticks (Supplementary table 1). Interestingly, the increased expression of these immunomodulators transcripts is concomitant to increases on female engorgement, consequently besides the blood ingestion, adult ticks need to deal with host`s effective immune responses, especially in susceptible hosts.

Tick-specific proteins families

Sialotranscriptomes of haematophagous arthropods, including ticks, had revealed an abundance of glycine-rich proteins, many of which are used by the tick to attach to the host´s skin, such as salivary silk-like proteins, glue, elastin, cuticle and cement proteins (197, 198), and are considered potential target for broad-spectrum tick vaccine (199). In our analysis, 14 complete sequences coding for cuticle-like proteins assembled from 357 reads contain signal peptide. Forty-nine CDS were associated to cement proteins and assembled from 27,527 reads, as well as 5 CDS coding for elastin proteins obtained from 243 reads. Five CDS that code for glue-like proteins, were extracted from 217 reads, beyond 2 CDS annotatde as silk-like proteins derived from 45 reads, many of which containing signal peptides. Interestingly, all mentioned families above have significant differences on expression levels between RmS and RmR libraries and surprisingly all families are significantly more expressed in RmR libraries (Table 5).

In addition to this information, it is noteworthy that the level of resistance to ticks in cattle may be associated to the degree of eosinophils concentration and degranulation at the tick

attachment site (200) and the amount of histamine present in this site (159) aiding in the rejection of ticks, among several factors, by increases of the self-cleaning behavior caused by these inflammatory mediators. Therefore, we suggest that the significant increase in expression of these representatives in RmR libraries may be due to a higher self-cleaning behavior of host resistant during tick infestation, requiring a greater quantity of these proteins associated with tick attachment to remain fixed.

Cuticle proteins

The cuticle is part of the external integument, covering the whole tick body externally, including its salivary glands ducts (201). Moreover, due the variety of the cutivle sequences with predicted signal peptide indicative of secretion, members of this family may be secreted in tick saliva to assist the attachment on the host skin. Although representatives are significantly more expressed in larval, nymph and male adult stages, but not in female tick (Supplementary tables 1 and 2), there is no association to blood meal source.

The cement family

The salivary cement protein has been shown to be essential for successful of tick attachment in host`s skin during parasitism, and its expression depends of both the anatomy of their mouthparts (short - Brevirostrata or Long - Longirostrata) and numbers of hosts ticks feed on during their parasitic life cycle (monoxenous or heteroxenous parasite) (198). Proteins of this class induce strong antibody responses and present antigenic cross-reactivity, so may be considered potential targets to compose an anti-tick vaccine (199, 202). Cement transcripts are abundantly expressed in all tick developmental stages, especially in male ticks, but independent of the origin of blood meal (Table 5). Comparisons between transcripts from MSGRmS and MSGRmR libraries revealed that these representatives are significantly more expressed in male fed on resistant hosts (Additional table 1). This process may be linked to the pressure of host immune system over ticks during an infestation, as the female has a key role on reproduction, it is possible that the male tick developed different pathways to deal with pressure, including an increase on cement expression in order to attach near females and assist to the sucess of the blood feeding and egg laying.

Elastin, glue, silk-like proteins, GGY and GYG repeat-containing proteins

Elastin, glue and silk-like proteins may also be essential for tick attachment due the presence of properties like viscosity, elasticity, resilience and glue-like adhesive (203, 204). These proteins help the skin to return to its original position when it is poked or pinched and also may to

resume their shape after stretching or contracting, a characteristic which could be important for *R. microplus*, a Brevirostrata monoxenous tick. Additionally, this broad class includes the GGY and GYG repeat-containing proteins, which are abundantly found in tick, including *R. microplus* (198). Eleven CDS assembled from 311 reads and 10 CDS assembled from 145 reads, respectively. Another 84 CDS of glycine-rich proteins family were extracted from 12,590 reads and many of them contained signal peptide indicative of secretion.

These constituents are associated with tick attachment are the present analysis shows they are expressed in large amounts during unfed larvae, nymph and male stages, which are independent of the blood meal source (Supplementary tables 1 and 2). We suggest that these constituents are essential for tick attachment in larva and nymph stages and, consequently for infestation success. In adult male there may be the necessity of such constituent expression during the whole infestation period, because they move around the bovine skin to find and attach near female ticks and assist during blood meal. In contrast, the low expression observed in female stage may be due the fact that females should reprogram their transcriptional activity in order to facilitate the release of host skin as soon as they complete the life cycle.

Salp-15

Three members of this family that present signal peptide indicative of secretion, found in *R. microplus* sialotranscriptome, were annotated from 88 reads. Proteins from this family had been previously characterized in *I. scapularis* ticks as salivary proteins. Their immunosuppressive properties facilitate the persistence of the arthropod upon the host by inhibiting $CD4^+$ T cell activation (205, 206), which consequently facilitate the Lyme's disease transmission (207). These transcripts are produced similarly between RmS and RmR libraries (Tabl6 5).

Basic and acid tail superfamily

Salivary proteins present in this family, which present basic amino acids repetitions in their carboxy-terminus, beyond anti-clotting proprieties (64), have been previously found in other tick sialotranscriptomes (51, 54, 56, 75). Members with an acidic tail as well as 18.3 kDa family were found to be related to members of this superfamily (53). *R. microplus* sialotranscriptome revealed CDS for 29 members of this superfamily deduced from 1.201 reads, either presenting similarities to sequences of this family or presenting the PFAM TSGP1. Sixteen CDS are full length containing signal peptides indicative of secretion, furthermore, some sequences present several sites of potential glycosilation indicating that they might as mucins.

These representatives are significantly more expressed ($p<0.001$) in RmS libraries (Table 5), especially in nymph and male ticks (Additional table 1). Anti-coagulants are important in tick

adult stage, when they ingest large amounts of blood (208, 209). Interestingly, the increased expression of these possible anticoagulants in adult ticks fed on susceptible hosts coincides with the efficient blood intake while fed on susceptible hosts, unlike what happens with ticks fed on resistant hosts.

8,9 kDa, 9.4 kDa and 10 kDa family

Twenty-seven sequences annotated from 8.354 reads recovered of *R. microplus* tick were identified as members of this family by presented similarity in NR database with secreted peptides of mature MW of approximately 10 kDa. Members of this family have been found exclusively in hard ticks, although their functions are unknown (25).

Similar to Ixodidae proteins family

Four hundred seventy-four CDS recovered from the present R. microplus sialotranscriptome, were assembled from 19,681 reads and grouped in seven sub-families due to significant matches with deducted protein sequences from *R. microplus, R. appendiculatus, Am. maculatum, Am. variegatum, Am. americanum, I. scapularis and D. andersoni.* Two hundred forty-three CDS annotated from 11,045 reads were related to *R. microplus* proteins. Of these, 184 CDS are full length starting from Met to stop codon, and 21 complete sequences have signal peptide indicative of secretion. Other 113 CDS annotated from 5,089 reads, present more similarities with *R. appendiculatus* proteins. Fifty-nine are complete sequences and 21 of which have signal peptide. Sixty-one CDS were related to *Amblyomma*, 49 CDS related to *Am. maculatum*, 6 CDS to *Am. variegatum* and 6 CDS to *Am. americanum* proteins. proteins related to I. scapularis were also recovered, accounting for 12 CDS assembled from 918 reads, as well as 45 CDS assembled from 1,148 reads associated to *D. andersoni proteins.*

Other secreted proteins

Forty-three CDS assembled from 1,409 reads were grouped in other secreted proteins, which present various functions. Thirteen CDS are full length starting from Met to stop codon and have predicted signal peptide indicative of secretion.

Other uncharacterized putative secreted proteins

Additional file 2 displays 1,432 uncharacterized putative secreted sequences assembled from 136,204 reads that present low similarity with other sequences deposited in NR database. Of these, 716 are complete sequences staring from Met to stop codon and have signal peptides

indicative of secretion. In addition, we recovered 2,822 CDS assembled from 331,738 reads with no known function and were classified as unknown proteins. From these unknown proteins, 63 CDS presented signal peptide indicative of secretion. So, we suggest that these uncharacterized proteins can be associated with tick cellular function and/or modulation of host's responses by present in tick salivary constituents and by have predicted signal secretion, therefore may be present in saliva.

Transposable Elements (TE) category

Coding sequences associated to transposon were also found in the present *R. microplus* sialotranscriptome. These CDS were annotated as class I and in a total of 444 CDS assembled from 9,479 reads, as class II totalizing 51 CDS assembled from 1.897 reads and 123 CDS annotated as other transposable elements, derived from 2.763 reads. The presence these elements could represent remnants of previously active transposition events in the tick genome or even act as regulators of transposition, nevertheless recent activity of transposable elements is another possibility to explain the presence of these elements on R. microplus sialotranscriptome.

Viral category: Possibly viral proteins (V)

We found that 7 coding sequences, extracted from 286 reads in R. microplus sialotranscriptome, presented similarity to viral proteins. Recently, analysis of a previous R. microplus sialotranscriptome performed by our group (94), identified sequences that presented homology with non-structural proteins of Flaviviridae family. Furthermore, different tick groups were collected from cattle at several Brazilian regions and molecular analysis revealed the detection of specific sequences homologous to Flaviviridae non-structural proteins, moreover a refined analysis of transcripts derived from cell cultures treated with tick extracts, suggests the identification of a new Flaviviridae member (241). It is important to note that three contigs present in previous *R. microplus* sialotranscriptome (characterized by contig_2343, contig_390 and contigs_2934) (94) present homology with CDSs named as Bm-tb2-1978, Bm-nr-103652 and Bm-nr-10521, identified in the present *R. microplus* sialotranscriptome. Thus it would be important to evaluate if the coding sequences identified here could point to relevant information on new tick borne pathogens.

In general summary, the transcripts present in this new *R. microplus* sialotranscriptome appear differentially expressed according to origin of blood meal, if fed on the resistant or susceptible hosts. Of the 121 families annotated, 93 are differentially expressed, resulting 59 families significantly more expressed in RmR libraries and 34 families in RmS libraries (Table 5).

Despite this difference, the most families that have functions that facilitate the blood meal in S category as Kunitz domain, metalloproteases, cystatins, Kazal domain, carboxypeptidase inhibitor, chimadanin, basic and acid tail, lipocalins families as well as the families associated with modulation of the host immune responses, as DAP-36 immunosuppressant, evasins and longicornsins are significantly more expressed in RmS. Regarding the families associated with the tick attachment, as cement, glue, silk, elastin, cuticle families are significantly more expressed in RmR (Table 6). So, taken together, we suggest that the RmR are trying to remain attached in the skin hosts, while RmS do it more easily and have greater efficiency in modulating inflammatory, immune and hemostatic responses of their hosts.

Another important evidence in tick biology is about the secreted proteins families in unfed larvae libraries, it is observed that 36 families are differentially expressed and surprisingly, all of these are in UFLRmR (Additional table 1). In addition, H category transcripts, annotated as protein export machinery and protein synthesis machinery, are also significantly more expressed in this library (Table 5). So, these results confirm the hypotheses that the larvae fed on resistant hosts have greater difficulty initiating an infestation and also suggest that these are already preprogrammed for a possible infestation in these hosts, due a larger amount of bioactive modulators express in UFLRmR. Therefore, these results suggest that the UFLRmR have an ability to reprogram their transcriptional activity when fed on different hosts and in order to adapt to each situation, as demonstrated by a larger amount of bioactive modulators identified in UFLRmR. It is noteworthy that despite these modulators are abundantly expressed in unfed larvae, tick infestation in resistant hosts often does not progress.

Finally, we suggest that the male ticks have an important function during tick infestation. The *R. microplus* transcripts annotated as secreted proteins were significantly more expressed in male ticks regardless of the origin of blood meal (Supplementary tables 1 and 2). Of 55 transcripts families differentially expressed in male ticks, 43 were significantly more expressed in male fed on susceptible hosts and only 12 families had higher expression levels in male fed on resistant hosts (Additional table 1). Moreover, the expression of transcripts annotated as protein export machinery and protein synthesis machinery were also had significant increases in RmS libraries (Table 5), mainly in nymph and male fed on these susceptible hosts (Additional table 1). Taken together, these results suggest that male ticks are essential for an effective tick infestation and could be the main responsible for modulation of host responses, especially in the susceptible host. The results show an abundance of the transcripts expressed by male and associated to antimicrobial, immunosuppressant, anti-inflammatory and anti-haemostatic activities. Therefore, they may be the targets of future interventions to control tick infestations.

Remarkable considerations

In the present study we identified approximately 2 million salivary sequences from a eight cattle tick libraries. A total of 3,600 coding sequences were associated to saliva secretion function and altogether classified into 120 families. The coding sequences present in these families can favor tick infestation as well as pathogen transmission to their hosts. These results improve our knowledge about the *R. microplus* biology concerning the tick developmental stages and origin of bood meal, which are important to understand tick-host interactions. In addition, this data set generated a platform to proceed with investigations on *R. microplus*, which can originate new strategies to tick control and help on the discovery of new pharmacological compounds with potential to be used on the treatment of several disorders.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Contributions

GRG, IKFMS, SRM and BRF conceived and designed the experiments; GRG, SRM and AMF performed the experiments; GRG, JMCR, SRM, IKFMS and AMF analyzed the data; GRG, IKFMS, SRM and LGG wrote the paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- grant numbers 2009/53645-3), by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (grant numbers 559603/2009-6), and by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. The authors thank Dr. Antônio A. M. Maia for the help with Nelore bovines used to fed ticks on resistant bovines and Dr. João S. Silva for generous and continuing support of this work performed in his laboratory. This work fulfils part of the requirements for a Ph student program for G.R.G. supported by FAPESP scholarships - 2009/51212-2. S.R.M. and L.G.G. were supported by FAPESP scholarships - 2007/59357-4 and 2011/23819-0, respectively; A.M.F. was supported by a scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

References

1. Powell RT, Reid TJ. Project tick control. Queensland Agricultural Journal. 1982;108:279-300.

2. da Rocha CM, Leite RC, Bruhn FR, Guimaraes AM, Furlong J. Perceptions about the biology of Rhipicephalus (Boophilus) microplus among milk producers in Divinopolis, Minas Gerais. Rev Bras Parasitol Vet. 2011 Oct-Dec;20(4):289-94.

3. da Rocha CM, Leite RC, Bruhn FR, Guimaraes AM, Furlong J. Perceptions of milk producers from Divinopolis, Minas Gerais, regarding Rhipicephalus (Boophilus) microplus control. Rev Bras Parasitol Vet. 2011 Oct-Dec;20(4):295-302.

4. Gonzales JC. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. Mestre Jou. 1974:101p.

5. Gonzales JC. O controle dos carrapatos dos bovinos. Sulina. 1975.

6. Bennett GF. Oviposition of Boophilus microplus (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. Acarologia. 1974 Oct;16(2):251-7.

7. Bennett GF. Oviposition of Boophilus microplus (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. Acarologia. 1974 Jul;16(1):52-61.

8. Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feedings apparatus, salivary gland secretions and the host response. I. Physiology of ticks. 1982:119-67.

9. Furlong J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. Caderno técnico da Escola de Veterinária-UFMG. 1993;8:49-61.

10. Andreotti R, Malavazi-Piza KC, Tanaka AS. Controle do carrapato por meio de vacina-situação atual e perspectivas. Embrapa Gado de Corte. 2002:58.

11. Utech KBW, Wharton RH, Kerr DJ. Resistence to B. microplus (Canestrini) in different breeds of cattle. Australian Journal Agricultural Research. 1978;29:885-95.

12. Moraes FR. Ecologia de carrapato XV: Susceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuinos a B. microplus (Canestrini) (Acari: Ixodedae). Ars Veterinária. 1986;2:45-53.

13. Oliveira GP, Alencar MM. Resistência de bovinos ao carrapato B. microplus II. Infestação natural. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1989;24:1267-71.

14. Villares JB. Climatologia Zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e suceptibilidade genética dos bovinos ao B. microplus. Boletin de Indústria Animal. 1941;4:60-79.

15. Oliveira GP, Alencar MM. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandêz-Gurezá ao carrapato (Boophilus microplus) e ao berne (D. hominis). Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia. 1990;42:127-35.

16. Lee B. Resistence cattle for tick control. Rural Journal. 1979;105:4-7.

17. Carvalho WA, Bechara GH, More DD, Ferreira BR, da Silva JS, de Miranda Santos IK. Rhipicephalus (Boophilus) microplus: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, Bos taurus and Bos indicus. Exp Parasitol. 2008 Apr;118(4):587-91.

18. Brown SJ. Antibody- and cell-mediated immune resistance by guinea pigs to adult Amblyomma americanum ticks. Am J Trop Med Hyg. 1982 Nov;31(6):1285-90.

19. Brown SJ, Askenase PW. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by Amblyomma americanum ticks. Am J Trop Med Hyg. 1982 May;31(3 Pt 1):593-8.

20. Bechara GH, Morelli Junior J, Szabo MP. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. Ann N Y Acad Sci. 2000;916:570-5.

21. Veríssimo CJ. Resistência e suceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato Boophilus microplus. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UEP (Dissertação de Mestrado). 1991:170p.

22. Wikel SK. Host immunity to ticks. Annu Rev Entomol. 1996;41:1-22.

23. Ribeiro JM, Francischetti IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu Rev Entomol. 2003;48:73-88.

24. Ribeiro JM. How ticks make a living. Parasitol Today. 1995 Mar;11(3):91-3.

25. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM. The role of saliva in tick feeding. Front Biosci. 2009;14:2051-88.

26. Valenzuela JG. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. Parasitology. 2004;129 Suppl:S83-94.

27. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. Thromb Haemost. 2005 Jul;94(1):167-74.

28. Ribeiro JM. Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. Exp Parasitol. 1987 Dec;64(3):347-53.

29. Sauer JR, Essenberg RC, Bowman AS. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. J Insect Physiol. 2000 Jul 1;46(7):1069-78.

30. Sanders ML, Scott AL, Glass GE, Schwartz BS. Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari:Ixodidae). J Med Entomol. 1996 Jul;33(4):628-34.

31. Peterkova K, Vancova I, Hajnicka V, Slovak M, Simo L, Nuttall PA. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. Med Vet Entomol. 2008 Jun;22(2):167-71.

32. Wikel SK. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. Int J Parasitol. 1999 Jun;29(6):851-9.

33. Brown SJ, Askenase PW. Rejection of ticks from guinea pigs by anti-hapten-antibody-mediated degranulation of basophils at cutaneous basophil hypersensitivity sites: role of mediators other than histamine. J Immunol. 1985 Feb;134(2):1160-5.

34. Kennedy DG, Cannavan A, McCracken RJ. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. J Chromatogr A. 2000 Jun 16;882(1-2):37-52.

35. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech. 1994 Dec;13(4):1249-86.

36. FAO/WHO. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Forty-fifty meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. 1996.

37. Trager W. Acquired immunity to ticks. Journal of Parasitology. 1939;25:57–81.

38. Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitol Today. 1999 Jul;15(7):258-62.

39. Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against Boophilus microplus. Parasitology. 1995;110 Suppl:S43-50.

40. Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Luaces LL, Rubiera R, et al. Control of Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. Vet Parasitol. 1995 Apr;57(4):339-49.

41. de la Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, et al. Vaccination against ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. Genet Anal. 1999 Nov;15(3-5):143-8.

42. Massard CL, Fonseca AH, Bittencourt VR, Oliveira JB, Silva KM. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBM86-"GAVAC" contra o carrapato Boophilus microplus no Brasil. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. 1995;17:167-73.

43. Pruett JH. Immunological control of arthropod ectoparasites--a review. Int J Parasitol. 1999 Jan;29(1):25-32.

44. Frisch JE. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. Int J Parasitol. 1999;29:57-71.

45. Shi YP, Das P, Holloway B, Udhayakumar V, Tongren JE, Candal F, et al. Development, expression, and murine testing of a multistage Plasmodium falciparum malaria vaccine candidate. Vaccine. 2000 Jun 15;18(25):2902-14.

46. Cai Q, Peng G, Bu L, Lin Y, Zhang L, Lustigmen S, et al. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a polyepitope Plasmodium falciparum candidate vaccine constructed by epitope shuffling. Vaccine. 2007 Jul 9;25(28):5155-65.

47. Alderson MR, Bement T, Day CH, Zhu L, Molesh D, Skeiky YA, et al. Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cells. J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):551-60.

48. Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7618-28.

49. Almazan C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, et al. Characterization of three Ixodes scapularis cDNAs protective against tick infestations. Vaccine. 2005 Aug 15;23(35):4403-16.

50. de la Fuente J, Almazan C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, et al. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. Vaccine. 2006 May 8;24(19):4082-95.

51. Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, et al. Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector Ixodes scapularis impairs its ability to feed. J Immunol. 2008 Oct 15;181(8):5209-12.

52. Seixas A, Oliveira P, Termignoni C, Logullo C, Masuda A, da Silva Vaz I, Jr. Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Jul 15;148(1-2):149-56.

53. Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against Rhipicephalus appendiculatus ticks. Vaccine. 2006 Mar 20;24(13):2230-7.

54. Imamura S, da Silva Vaz Junior I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine. Vaccine. 2005 Jan 26;23(10):1301-11.

55. Hajdusek O, Almazan C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. Vaccine. 2010 Apr 9;28(17):2993-8.

56. Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, et al. A novel family of anticoagulants from the saliva of Ixodes scapularis. Insect Mol Biol. 2002 Dec;11(6):641-50.

57. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector Ixodes scapularis. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jun 13;305(4):869-75.

58. Almazan C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, et al. Identification and characterization of Rhipicephalus (Boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. Parasitol Res. 2010 Jan;106(2):471-9.

59. Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Gardinassi LG, Banin TM, Horackova J, et al. Vaccination of Cattle with Recombinant Salivary Antigens of Rhipicephalus microplus Selected by Reverse Immunovaccinology Reduces Tick Infestations. Manuscrito em preparação.

60. Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, et al. BmiGI: a database of cDNAs expressed in Boophilus microplus, the tropical/southern cattle tick. Insect Biochem Mol Biol. 2005 Jun;35(6):585-95.

61. Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, et al. CattleTickBase: an integrated Internet-based bioinformatics resource for Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Int J Parasitol. 2012 Feb;42(2):161-9.

62. Maruyama SRC. Estudo dos transcriptomas de glândulas salivares do carrapato do boi, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, alimentados em bovinos resistentes ou suscetíveis para obtenção de catálogo de genes afetados pela resposta imune do hospedeiro. Dissertação de Mestrado da FMRP-USP Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. 2008:159p.

63. Maruyama SRC. Antígenos salivares recombinantes de Rhipicephalus microplus selecionados por imunovacinologia reversa: efeito da vacinação de bovinos no controle das infestações por carrapatos. Tese de Doutorada FMRP-USP- Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. 2012:154p.

64. Kongsuwan K, Josh P, Zhu Y, Pearson R, Gough J, Colgrave ML. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (Rhipicephalus (Boophilus) microplus). J Insect Physiol. 2010 Feb;56(2):212-26.

65. Klopfleisch R, Gruber AD. Transcriptome and proteome research in veterinary science: what is possible and what questions can be asked? ScientificWorldJournal. 2012;2012:254962.

66. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol. 2001 Mar;19(3):242-7.

67. Lambert JD, Chan XY, Spiecker B, Sweet HC. Characterizing the embryonic transcriptome of the snail Ilyanassa. Integr Comp Biol. 2010 Nov;50(5):768-77.

68. Karim S, Singh P, Ribeiro JM. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, Amblyomma maculatum. PLoS One. 2011;6(12):e28525.

69. Lewis S, Ashburner M, Reese MG. Annotating eukaryote genomes. Curr Opin Struct Biol. 2000 Jun;10(3):349-54.

70. Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 1;30(1):281-3.

71. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):231-4.

72. Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics. 2003 Sep 11;4:41.

73. Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):263-6.

74. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

75. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731-9.

76. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput Appl Biosci. 1992 Jun;8(3):275-82.

77. Yatsuda AP, Krijgsveld J, Cornelissen AW, Heck AJ, de Vries E. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite Haemonchus contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. J Biol Chem. 2003 May 9;278(19):16941-51.

78. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010 Jan;11(1):31-46.

79. Vaz Junior Ida S, Ozaki LS, Masuda A. Serum of Boophilus microplus infested cattle reacts with different tick tissues. Vet Parasitol. 1994 Mar;52(1-2):71-8.

80. Vaz Junior Ida S, Martinez RH, Oliveira A, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, et al. Functional bovine immunoglobulins in Boophilus microplus hemolymph. Vet Parasitol. 1996 Mar;62(1-2):155-60.

81. Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proenca L, Carvalho WA, et al. Boophilus microplus: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. Exp Parasitol. 2005 May;110(1):12-21.

82. Carvalho WA, Ianella P, Arnoldi FG, Caetano AR, Maruyama SR, Ferreira BR, et al. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. Immunogenetics. 2011 May;63(5):319-24.

83. Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM. Exploring the sialome of the tick Ixodes scapularis. J Exp Biol. 2002 Sep;205(Pt 18):2843-64.

84. Andersen JF, Pham VM, Meng Z, Champagne DE, Ribeiro JM. Insight into the sialome of the Black Fly, Simulium vittatum. J Proteome Res. 2009 Mar;8(3):1474-88.

85. Campbell CL, Vandyke KA, Letchworth GJ, Drolet BS, Hanekamp T, Wilson WC. Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae). Insect Mol Biol. 2005 Apr;14(2):121-36.

86. Wilson AD, Heesom KJ, Mawby WJ, Mellor PS, Russell CL. Identification of abundant proteins and potential allergens in Culicoides nubeculosus salivary glands. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Mar 15;122(1-2):94-103.

87. Anatriello E, Ribeiro JM, de Miranda-Santos IK, Brandao LG, Anderson JM, Valenzuela JG, et al. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. BMC Genomics. 2010;11:450.

88. Francischetti IM, Mans BJ, Meng Z, Gudderra N, Veenstra TD, Pham VM, et al. An insight into the sialome of the soft tick, Ornithodorus parkeri. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Jan;38(1):1-21.

89. Maruyama SR, Brandão LG, Garcia GR, Anderson JM, Anatriello E, Ferreira BF, et al. Comparative analysis of ESTs from Rhipicephalus microplus ticks fed on bovine hosts genetically susceptible or resistant to the infestations reveals differential pattern of transcripts related to parasitism. Manuscrito em preparação.

90. Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, Ixodes scapularis. Thromb Haemost. 2004 May;91(5):886-98.

91. Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, et al. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. Thromb Haemost. 2006 Jul;96(1):7-13.

92. Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the Rhipicephalus haemaphysaloides tick. J Insect Physiol. 2011 Feb;57(2):339-43.

93. Paesen GC, Siebold C, Dallas ML, Peers C, Harlos K, Nuttall PA, et al. An ion-channel modulator from the saliva of the brown ear tick has a highly modified Kunitz/BPTI structure. J Mol Biol. 2009 Jun 19;389(4):734-47.

94. Castaneda O, Harvey AL. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. Toxicon. 2009 Dec 15;54(8):1119-24.

95. Kwong PD, McDonald NQ, Sigler PB, Hendrickson WA. Structure of beta 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. Structure. 1995 Oct 15;3(10):1109-19.

96. Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization. Vet Parasitol. 2008 Aug 1;155(1-2):133-41.

97. Mulenga A, Tsuda A, Onuma M, Sugimoto C. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, Rhiphicephalus appendiculatus; cDNA cloning and preliminary characterization. Insect Biochem Mol Biol. 2003 Feb;33(2):267-76.

98. Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E. Protective immunity against Ixodes ricinus induced by a salivary serpin. Vaccine. 2007 Apr 30;25(17):3284-92.

99. Leboulle G, Crippa M, Decrem Y, Mejri N, Brossard M, Bollen A, et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. J Biol Chem. 2002 Mar 22;277(12):10083-9.

100. Chmelar J, Oliveira CJ, Rezacova P, Francischetti IM, Kovarova Z, Pejler G, et al. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. Blood. 2011 Jan 13;117(2):736-44.

101. Muleng A, Sugino M, Nakajim M, Sugimoto C, Onuma M. Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. J Vet Med Sci. 2001 Oct;63(10):1063-9.

102. Lenarcic B, Bevec T. Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. Biol Chem. 1998 Feb;379(2):105-11.

103. Galesa K, Pain R, Jongsma MA, Turk V, Lenarcic B. Structural characterization of thyroglobulin type-1 domains of equistatin. FEBS Lett. 2003 Mar 27;539(1-3):120-4.

104. Lenarcic B, Ritonja A, Strukelj B, Turk B, Turk V. Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from Actinia equina, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. J Biol Chem. 1997 May 23;272(21):13899-903.

105. Lenarcic B, Turk V. Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):563-6.

106. Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, Amblyomma variegatum. BMC Genomics. 2011;12:136.

107. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins. Biochem Soc Symp. 2003(70):179-99.

108. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. J Mol Evol. 1990 Jan;30(1):60-71.

109. Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, et al. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick Ornithodoros moubata. Biochem J. 2010 Jul 1;429(1):103-12.

110. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS Lett. 1991 Jul 22;285(2):213-9.

111. Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IM, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JM. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick Ixodes scapularis. J Biol Chem. 2006 Sep 8;281(36):26298-307.

112. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol. 2006 Apr;28(4):131-41.

113. Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev Comp Immunol. 1999 Jun-Jul;23(4-5):291-301.

114. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem J. 2004 Mar 15;378(Pt 3):705-16.

115. Schlott B, Wohnert J, Icke C, Hartmann M, Ramachandran R, Guhrs KH, et al. Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. J Mol Biol. 2002 Apr 26;318(2):533-46.

116. Watanabe RM, Soares TS, Morais-Zani K, Tanaka-Azevedo AM, Maciel C, Capurro ML, et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from Aedes aegypti with thrombin coagulant inhibitory activity. Biochimie. 2010 Aug;92(8):933-9.

117. Li KC, Zhang FX, Li CL, Wang F, Yu MY, Zhong YQ, et al. Follistatin-like 1 suppresses sensory afferent transmission by activating Na+,K+-ATPase. Neuron. 2011 Mar 10;69(5):974-87.

118. Arolas JL, Lorenzo J, Rovira A, Castella J, Aviles FX, Sommerhoff CP. A carboxypeptidase inhibitor from the tick Rhipicephalus bursa: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. J Biol Chem. 2005 Feb 4;280(5):3441-8.

119. Arolas JL, Popowicz GM, Lorenzo J, Sommerhoff CP, Huber R, Aviles FX, et al. The three-dimensional structures of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with A/B carboxypeptidases reveal a novel double-headed binding mode. J Mol Biol. 2005 Jul 15;350(3):489-98.

120. Gong H, Zhou J, Liao M, Hatta T, Harnnoi T, Umemiya R, et al. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick Haemaphysalis longicornis. J Insect Physiol. 2007 Oct;53(10):1079-87.

121. Nakajima C, Imamura S, Konnai S, Yamada S, Nishikado H, Ohashi K, et al. A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from Haemaphysalis longicornis salivary gland. J Vet Med Sci. 2006 May;68(5):447-52.

122. Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):535-40.

123. Mans BJ, Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schwan TG, Pham VM, et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Jan;38(1):42-58.

124. Turner AJ, Brown CD, Carson JA, Barnes K. The neprilysin family in health and disease. Adv Exp Med Biol. 2000;477:229-40.

125. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. Bioessays. 2001 Mar;23(3):261-9.

126. Yang XF, Chatellard C, Lazure C, Crine P, Boileau G. Insertion of hydrophilic amino acid residues in the signal peptide/membrane anchor domain of neprilysin (neutral endopeptidase-24.11) results in its cleavage: role of the position of insertion. Arch Biochem Biophys. 1994 Dec;315(2):382-6.

127. Ribeiro JM, Mather TN. Ixodes scapularis: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. Exp Parasitol. 1998 Jun;89(2):213-21.

128. Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from Ixodes scapularis ticks. Insect Biochem Mol Biol. 2006 Feb;36(2):111-29.

129. Xu X, Yang H, Ma D, Wu J, Wang Y, Song Y, et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. Mol Cell Proteomics. 2008 Mar;7(3):582-90.

130. Motobu M, Tsuji N, Miyoshi T, Huang X, Islam MK, Alim MA, et al. Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. FEBS J. 2007 Jul;274(13):3299-312.

131. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. [Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine]. Science. 1968 May 24;160(3830):892-3.

132. Valnickova Z, Thaysen-Andersen M, Hojrup P, Christensen T, Sanggaard KW, Kristensen T, et al. Biochemical characterization of bovine plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). BMC Biochem. 2009;10:13.

133. Sojka D, Hajdusek O, Dvorak J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, et al. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick Ixodes ricinus. Int J Parasitol. 2007 Jun;37(7):713-24.

134. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Huang X, Hatta T, et al. HlLgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of the ixodid tick Haemaphysalis longicornis, is involved in blood-meal digestion. J Insect Physiol. 2008 Mar;54(3):573-85.

135. Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Fujisaki K. Legumains from the hard tick Haemaphysalis longicornis play modulatory roles in blood feeding and gut cellular remodelling and impact on embryogenesis. Int J Parasitol. 2009 Jan;39(1):97-107.

136. Abdul Alim M, Tsuji N, Miyoshi T, Khyrul Islam M, Huang X, Motobu M, et al. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. Insect Biochem Mol Biol. 2007 Sep;37(9):911-22.

137. Ribeiro JM, Mans BJ, Arca B. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. Insect Biochem Mol Biol. 2010 Nov;40(11):767-84.

138. Hostomska J, Volfova V, Mu J, Garfield M, Rohousova I, Volf P, et al. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly Phlebotomus arabicus. BMC Genomics. 2009;10:282.

139. Calvo E, Ribeiro JM. A novel secreted endonuclease from Culex quinquefasciatus salivary glands. J Exp Biol. 2006 Jul;209(Pt 14):2651-9.

140. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. Curr Opin Microbiol. 2007 Feb;10(1):52-6.

141. Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jan 31;92(3):694-8.

142. Stutzer C, Mans BJ, Gaspar AR, Neitz AW, Maritz-Olivier C. Ornithodoros savignyi: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. Exp Parasitol. 2009 Aug;122(4):318-27.

143. Sun D, McNicol A, James AA, Peng Z. Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: a potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. Platelets. 2006 May;17(3):178-84.

144. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. Thromb Haemost. 2008 Mar;99(3):466-72.

145. Kuroki M, Minakami S. Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Jul 14;162(1):377-80.

146. O'Flaherty JT, Cordes JF. Human neutrophil degranulation responses to nucleotides. Lab Invest. 1994 Jun;70(6):816-21.

147. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. Arch Microbiol. 2000 Nov;174(5):362-74.

148. Fahmy AS, Abdel-Gany SS, Mohamed TM, Mohamed SA. Esterase and lipase in camel tick Hyalomma dromedarii (Acari: Ixodidae) during embryogenesis. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2004 Feb;137(2):159-68.

149. You M, Fujisaki K. Vaccination effects of recombinant chitinase protein from the hard tick Haemaphysalis longicornis (Acari: Ixodidae). J Vet Med Sci. 2009 Jun;71(6):709-12.

150. Franzin MF, Oliveira RP, Maruyama SRC, Garcia GR, Ribeiro JM, Maia AM, et al. Responses in host skin and in a hematophagous ectoparasite differ according to the genetic composition of the host: genomic and histological insights. Manuscrito em preparação.

151. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature. 2007 May 3;447(7140):92-U7.

152. Bohm S, Schwab I, Lux A, Nimmerjahn F. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. Semin Immunopathol. 2012 May;34(3):443-53.

153. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, et al. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. Arthritis Res Ther. 2009;11(6):R193.

154. Mans BJ, Louw AI, Neitz AW. The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, Ornithodoros savignyi, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. Mol Biol Evol. 2003 Jul;20(7):1158-67.

155. Aljamali MN, Hern L, Kupfer D, Downard S, So S, Roe BA, et al. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae). Insect Mol Biol. 2009 Apr;18(2):129-54.

156. Dai J, Narasimhan S, Zhang L, Liu L, Wang P, Fikrig E. Tick histamine release factor is critical for Ixodes scapularis engorgement and transmission of the lyme disease agent. PLoS Pathog. 2010;6(11):e1001205.

157. Willadsen P, Wood GM, Riding GA. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, Boophilus microplus. Z Parasitenkd. 1979 Jun 13;59(1):87-93.

158. Sangamnatdej S, Paesen GC, Slovak M, Nuttall PA. A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. Insect Mol Biol. 2002 Feb;11(1):79-86.

159. Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus. Biochem J. 1995 May 15;308 (Pt 1):243-9.

160. Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, et al. Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick Ornithodoros moubata. J Immunol. 2005 Feb 15;174(4):2084-91.

161. Mans BJ, Ribeiro JM, Andersen JF. Structure, function, and evolution of biogenic amine-binding proteins in soft ticks. J Biol Chem. 2008 Jul 4;283(27):18721-33.

162. Francischetti IM, Andersen JF, Ribeiro JM. Biochemical and functional characterization of recombinant Rhodnius prolixus platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. Biochemistry. 2002 Mar 19;41(11):3810-8.

163. Mans BJ, Ribeiro JM. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Sep;38(9):841-52.

164. Mans BJ, Ribeiro JM. A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. Insect Biochem Mol Biol. 2008 Sep;38(9):862-70.

165. Boisbouvier J, Albrand JP, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, et al. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. J Mol Biol. 1998;283(1):205-19.

166. Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. J Exp Med. 2008 Sep 1;205(9):2019-31.

167. Fogaca AC, Lorenzini DM, Kaku LM, Esteves E, Bulet P, Daffre S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick Boophilus microplus: isolation, structural characterization and tissue expression profile. Dev Comp Immunol. 2004 Mar;28(3):191-200.

168. Zhang H, Zhang W, Wang X, Zhou Y, Wang N, Zhou J. Identification of a cysteine-rich antimicrobial peptide from salivary glands of the tick Rhipicephalus haemaphysaloides. Peptides. 2011 Mar;32(3):441-6.

169. Frauenschuh A, Power CA, Deruaz M, Ferreira BR, Silva JS, Teixeira MM, et al. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick Rhipicephalus sanguineus. J Biol Chem. 2007 Sep 14;282(37):27250-8.

170. Kopacek P, Hajdusek O, Buresova V, Daffre S. Tick innate immunity. Adv Exp Med Biol. 2010;708:137-62.

171. Silva FD, Rossi DC, Martinez LR, Frases S, Fonseca FL, Campos CB, et al. Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against Cryptococcus neoformans. FEMS Microbiol Lett. 2011 Nov;324(1):64-72.

172. Silva FD, Rezende CA, Rossi DC, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34735-46.

173. Lu X, Che Q, Lv Y, Wang M, Lu Z, Feng F, et al. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, Haemaphysalis longicornis. Protein Sci. 2010 Mar;19(3):392-7.

174. Tanaka T, Kawano S, Nakao S, Umemiya-Shirafuji R, Rahman MM, Boldbaatar D, et al. The identification and characterization of lysozyme from the hard tick Haemaphysalis longicornis. Ticks Tick Borne Dis. 2010 Dec;1(4):178-85.

175. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. J Invest Dermatol. 2012 Mar;132(3 Pt 2):887-95.

176. Inohara N, Nunez G. ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. Trends Biochem Sci. 2002 May;27(5):219-21.

177. Sterba J, Dupejova J, Fiser M, Vancova M, Grubhoffer L. Fibrinogen-related proteins in ixodid ticks. Parasit Vectors. 2011;4:127.

178. Rego RO, Hajdusek O, Kovar V, Kopacek P, Grubhoffer L, Hypsa V. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick Ornithodoros moubata and the hard tick Ixodes ricinus. Insect Biochem Mol Biol. 2005 Sep;35(9):991-1004.

179. Horackova J, Rudenko N, Golovchenko M, Havlikova S, Grubhoffer L. IrML - a gene encoding a new member of the ML protein family from the hard tick, Ixodes ricinus. J Vector Ecol. 2010 Dec;35(2):410-8.

180. Milne TJ, Abbenante G, Tyndall JD, Halliday J, Lewis RJ. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31105-10.

181. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol. 2006;44:135-62.

182. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. Endocr Rev. 2008 Dec;29(7):865-97.

183. Li WF, Ma GX, Zhou XX. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. Peptides. 2006 Sep;27(9):2350-9.

184. Fogaca AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick Boophilus microplus with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides. 2006 Apr;27(4):667-74.

185. Sasaki SD, de Lima CA, Lovato DV, Juliano MA, Torquato RJ, Tanaka AS. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from Boophilus microplus, with activity toward Pr1 proteases from the fungus Metarhizium anisopliae. Exp Parasitol. 2008 Feb;118(2):214-20.

186. Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. Science. 2000 Aug 18;289(5482):1185-8.

187. Carvalho WA, Franzin AM, Abatepaulo AR, de Oliveira CJ, More DD, da Silva JS, et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. Vet Parasitol. 2010 Feb 10;167(2-4):260-73.

188. Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. Cell Mol Life Sci. 1999 Oct 15;56(3-4):286-95.

189. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, Ward ES. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8.

190. Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, et al. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):6213-6.

191. Garcia GR, Maruyama SR, Oliveira CJ, Gardinassi LG, Maia AM, Natsui AP, et al. The kinetics of the humoral immune response during Rhipicephalus microplus tick infestation in resistant and susceptible hosts. Manuscrito em preparação.

192. Bergman DK, Palmer MJ, Caimano MJ, Radolf JD, Wikel SK. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni salivary gland. J Parasitol. 2000 Jun;86(3):516-25.

193. Bergman DK, Ramachandra RN, Wikel SK. Characterization of an immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) salivary glands. J Med Entomol. 1998 Jul;35(4):505-9.

194. Oliveira CJ, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS, et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1alpha and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. Int J Parasitol. 2008 May;38(6):705-16.

195. Chinery WA. The nature and origin of the "cement" substance at the site of attachment and feeding of adult Haemaphysalis spinigera (Ixodidae). J Med Entomol. 1973 Jul 31;10(4):355-62.

196. Maruyama SR, Anatriello E, Anderson JM, Ribeiro JM, Brandao LG, Valenzuela JG, et al. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the

biology of three metastriate ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Rhipicephalus sanguineus and Amblyomma cajennense. BMC Genomics. 2010;11:363.

197. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. Vaccine. 2005 Jul 29;23(34):4329-41.

198. Schleger AV, Lincoln DT, Kemp DH. A putative role for eosinophils in tick rejection. Experientia. 1981 Jan 15;37(1):49-50.

199. Hackman RH. Structure and function in tick cuticle. Annu Rev Entomol. 1982;27:75-95.

200. Bishop R, Lambson B, Wells C, Pandit P, Osaso J, Nkonge C, et al. A cement protein of the tick Rhipicephalus appendiculatus, located in the secretory e cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. Int J Parasitol. 2002 Jun 15;32(7):833-42.

201. Blackledge TA, Scharff N, Coddington JA, Szuts T, Wenzel JW, Hayashi CY, et al. Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 31;106(13):5229-34.

202. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. J Cell Sci. 2002 Jul 15;115(Pt 14):2817-28.

203. Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW, Das S, Thomas V, Persinski R, et al. Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. Immunity. 2002 Jun;16(6):849-59.

204. Juncadella IJ, Garg R, Ananthnarayanan SK, Yengo CM, Anguita J. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007 Apr;49(3):433-8.

205. Hojgaard A, Biketov SF, Shtannikov AV, Zeidner NS, Piesman J. Molecular identification of Salp15, a key salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from Ixodes persulcatus and Ixodes pacificus (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2009 Nov;46(6):1458-63.

206. Anisuzzaman, Islam MK, Miyoshi T, Alim MA, Hatta T, Yamaji K, et al. Longistatin, a novel EF-hand protein from the ixodid tick Haemaphysalis longicornis, is required for acquisition of host blood-meals. Int J Parasitol. 2010 May;40(6):721-9.

207. Anisuzzaman, Islam MK, Alim MA, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, et al. Longistatin, a plasminogen activator, is key to the availability of blood-meals for ixodid ticks. PLoS Pathog. 2011 Mar;7(3):e1001312.

208. Maruyama SR, Castro-Jorge LA, Ribeiro JM, Gardinassi LG, Garcia GR, Brandão LG, et al. Molecular detection of NS3 and NS5 protein sequences from a divergent flavivirus present in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. Manuscrito submetido para Ticks and Tick-Borne Diseases.

209. Rodriguez-Valle M, Lew-Tabor A, Gondro C, Moolhuijzen P, Vance M, Guerrero FD, et al. Comparative microarray analysis of Rhipicephalus (Boophilus) microplus expression profiles of

larvae pre-attachment and feeding adult female stages on Bos indicus and Bos taurus cattle. BMC Genomics. 2010;11:437.

210. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, et al. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. Proteomics. 2008 May;8(9):1744-9.

211. Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. Proteomic profiling of Rhipicephalus (Boophilus) microplus midgut responses to infection with Babesia bovis. Vet Parasitol. 2008 Apr 15;152(3-4):294-313.

212. Villar M, Torina A, Nunez Y, Zivkovic Z, Marina A, Alongi A, et al. Application of highly sensitive saturation labeling to the analysis of differential protein expression in infected ticks from limited samples. Proteome Sci. 2010;8:43.

213. Coons LB, Roshdy MA. Ultrastructure of Granule Secretion in Salivary Glands of Argas (Persicargas) arboreus During Feeding. Z Parasitenkd. 1981; 234:65:225.

214. Ellis J. Protein folding. Cytosolic chaperonin confirmed. Nature. 1992 Jul 16;358(6383):191.

215. Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. Science. 2000 Nov 24;290(5496):1571-4.

216. Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta. 2004 Jun 1;1699(1-2):35-44.

217. Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. Trends Biochem Sci. 2006 Aug;31(8):455-64.

218. Bajic A, Zakrzewska J, Godjevac D, Andjus P, Jones DR, Spasic M, et al. Relevance of the ability of fructose 1,6-bis(phosphate) to sequester ferrous but not ferric ions. Carbohydr Res. 2011 Feb 15;346(3):416-20.

219. Andreotti R, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Torquato RJ, Gomes A, Tanaka AS. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick Boophilus microplus: purification and biochemical characterization. J Protein Chem. 2001 Jul;20(5):337-43.

220. Jittapalapong S, Kaewhom P, Pumhom P, Canales M, de la Fuente J, Stich RW. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female Rhipicephalus microplus. Transbound Emerg Dis. 2010 Apr;57(1-2):103-6.

221. Imamura S, Konnai S, Vaz Ida S, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus. Jpn J Vet Res. 2008 Aug;56(2):85-98.

222. Tsuji N, Kamio T, Isobe T, Fujisaki K. Molecular characterization of a peroxiredoxin from the hard tick Haemaphysalis longicornis. Insect Mol Biol. 2001 Apr;10(2):121-9.

223. Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K. A cysteine protease is critical for Babesia spp. transmission in Haemaphysalis ticks. PLoS Pathog. 2008 May;4(5):e1000062.

224. Mulenga A, Macaluso KR, Simser JA, Azad AF. The American dog tick, Dermacentor variabilis, encodes a functional histamine release factor homolog. Insect Biochem Mol Biol. 2003 Sep;33(9):911-9.

225. Citelli M, Lara FA, da Silva Vaz I, Jr., Oliveira PL. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Mol Biochem Parasitol. 2007 Jan;151(1):81-8.

226. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. Autoimmun Rev. 2010 Mar;9(5):A259-66.

227. Estrada-Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus Boophilus (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp Appl Acarol. 2006;38(2-3):219-35.

228. Rajput ZI, Hu SH, Chen WJ, Arijo AG, Xiao CW. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. J Zhejiang Univ Sci B. 2006 Nov;7(11):912-21.

229. Barre N, Uilenberg G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. Rev Sci Tech. 2010 Apr;29(1):149-60, 35-47.

230. de Castro JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. Vet Parasitol. 1997 Jul 31;71(2-3):77-97.

231. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. Parasitol Today. 1988 Jul;4(7):196-8.

232. Wikel SK. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: utilization of novel antigens. Vet Parasitol. 1988 Sep;29(2-3):235-64.

233. Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines--a reality? Vet Parasitol. 2001 Jul 12;98(1-3):149-67.

234. Jones LD, Matthewson M, Nuttall PA. Saliva-activated transmission (SAT) of Thogoto virus: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of Rhipicephalus appendiculatus, Amblyomma variegatum, and Boophilus microplus ticks. Exp Appl Acarol. 1992 Mar;13(4):241-8.

235. Kovar L. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. Folia Microbiol (Praha). 2004;49(3):327-36.

236. Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunol. 2006 Apr;28(4):155-63.

237. Wambura PN, Gwakisa PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA. Breed-associated resistance to tick infestation in Bos indicus and their crosses with Bos taurus. Vet Parasitol. 1998 May;77(1):63-70.

Tables

Table 1. **Abundance and distribution of reads and coding sequences (CDS) from *R. microplus* sialotranscriptome by library.**

	R.microplus fed on **Resistant** host		*R.microplus* fed on **Susceptible** host	
Library	**N° of CDS**	**N° of Reads**	**N° of CDS**	**N° of Reads**
UFL	6,018	54,115 (5.8%)	3,755	86,135 (9.2%)
NSG	7,060	119,574 (12.8%)	5,425	151,406 (16.2%)
MSG	9,414	254,657 (27.3%)	9,215	106,691 (11.4%)
FSG	7,305	70,136 (7.5%)	2,238	88,984 (9.5%)
Total	11,329	498,482	10,667	433,216

Table 2. **Classification and abundance of reads for extracted coding sequences (CDS) from the sialotranscriptome of *R. microplus.***

Class	**Number of CDS**	**Number of Reads**	**% of total reads**	**Reads/CDS**
Secreted	3,600	278, 351	29,88	77,3
Housekeeping	4,629	307,184	33,97	66,4
Unknown	2,822	331,738	35,61	117,6
Transposable Elements	618	14,139	1,52	22,9
Viral	7	286	0,03	40,9
Total	11,676	931,698		

Table 3. **Functional classification of transcripts from the *R. microplus* annotated as housekeeping category.**

Class	**Number of CDS**	**Number of Reads**	**% of total reads***	**Reads/CDS**
Putative housekeeping proteins				
IMMUNITY RELATED PRODUTCS				
Immunoglobulin G binding protein	14	3795	1,24	271,1
Similar to macrophage migration inhibitory factor	7	263	0,09	37,6
Similar to protein associated with Interferon	7	243	0,08	34,7
Toll-like receptors	2	121	0,04	60,5
Alpha-2-macroglobulin	4	89	0,03	22,3
Other proteins possibly associated with immunity	18	867	0,28	48,2
Total	52	5378	1,75	103,4
PEPTIDASES				
Cathepsin (aspartyl and cysteine proteases)	7	368	0,12	52,6
Calpain	3	41	0,01	13,7
Aminopeptidase	6	125	0,04	20,8
Membrane protease	5	224	0,07	44,8
signal peptide peptidase	4	168	0,05	42,0
Carboxypeptidase	6	329	0,11	54,8
Other peptidases	11	246	0,08	22,4
Total	42	1501	0,49	35,7

PROTEIN EXPORT MACHINERY	245	11135	3,62	45,4
CYTOSKELETAL	284	14934	4,86	52,6
DETOXIFICATION				
Sulfotransferases	16	441	0,14	27,6
Glutathione transferase	16	292	0,10	18,3
Dehydrogenases	19	274	0,09	14,4
O-Methyl transferases	3	18	0,01	6,0
Multidrug resistance transporters	4	71	0,02	17,8
Oxidative detoxification				
Cytochrome P450	24	519	0,17	21,6
Catalase	7	115	0,04	16,4
Superoxide dismutase	4	45	0,01	11,3
Selenoproteins	6	188	0,06	31,3
Total	99	1963	0,64	19,8
EXTRACELLULAR MATRIX AND ADHESION	153	18777	6,11	122,7
METABOLISM				
Amino acid	59	3145	1,02	53,3
Carbohydrate	76	3835	1,25	50,5
Energy	193	47209	15,37	244,6
Intermediate	39	833	0,27	21,4
Lipid	144	3694	1,20	25,7
Nucleotide	78	2772	0,90	35,5
Total	589	61488	20,02	104,4
NUCLEAR EXPORT	11	478	0,16	43,5
NUCLEAR REGULATION	136	4633	1,51	34,1
PROTEIN MODIFICATION MACHINERY	220	11878	3,87	54,0
PROTEASOME MACHINERY	139	5263	1,71	37,9
PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY	312	30173	9,82	96,7
SIGNAL TRANSDUCTION	522	19438	6,33	37,2
Similar to protein associated with Apoptosis	42	2070	0,67	49,3
Total	564	21508	7,00	38,1
TRANSCRIPTION FACTORS	93	5258	1,71	56,5
TRANSCRIPTION MACHINERY	456	26075	8,49	57,2
TRANSPORTERS AND STORAGE	214	8966	2,92	41,9
UNKNOWN CONSERVED PROTEINS	988	76328	24,85	77,3
UNKNOWN CONSERVED SECRETED PROTEINS	32	1448	0,47	45,3
TOTAL	**4629**	**307184**		

*Associated with total of reads from H- category.

Table 4. **Functional classification of transcripts from the *R. microplus* annotated as secreted category.**

Class	Number of CDS	Number of Reads	% of total reads*	Reads/CDS
Putative secreted proteins				
Ubiquitous protein domains				
PROTEINASE INHIBITOR DOMAINS				

KUNITZ DOMAINS				
Hexalaris	2	68	0,02	34
Pentalaris	4	136	0,05	34
Tetralaris	11	345	0,12	31,36
Trilaris	28	920	0,33	32,86
Bilaris	61	1598	0,57	26,20
Monolaris	95	2341	0,84	24,64
Total	201	5408	1,94	26,91
TIL domain (may have anti-microbial activity)	72	2260	0,81	31,39
Thyropin domains	4	76	0,03	19,00
Cystatin	34	941	0,34	27,68
Serpin	15	954	0,34	63,60
Kazal domain containing peptides	6	306	0,11	51,00
Carboxypeptidase inhibitor	17	508	0,18	29,88
Chimadanin	4	491	0,18	122,75
Phosphatidylethanolamine-binding protein	1	31	0,01	31,00
Other protease inhibitor	14	527	0,19	37,64
ENZYMES				
SECRETED PEPTIDASES				
Metalloproteases of the reprolysin family	115	5686	2,04	49,44
Neprilysin-type metalloprotease				
M13 family/neprilysin	44	958	0,34	21,77
Other metalloproteases	13	339	0,12	26,08
Dipeptidyl-peptidase / M2 family	7	447	0,16	63,86
Serine proteases	74	5494	1,97	74,24
Serine carboxypeptidases	25	544	0,20	21,76
Transglutaminase	4	455	0,16	113,75
Legumain family	5	149	0,05	29,80
Endopeptidases	7	216	0,08	30,86
Cathepsin (aspartyl and cysteine proteases)	4	103	0,04	25,75
Other peptidases	4	75	0,03	18,75
SECRETED NUCLEASES				
Deoxyribonuclease II	10	404	0,15	40,40
dsRNA-specific ribonuclease	1	11	0,00	11,00
Ribonuclease, T2 family	2	22	0,01	11,00
Other endonucleases	3	33	0,01	11,00
5' nucleotidase	14	572	0,21	40,86
LIPASES AND ESTERASES	6	195	0,07	32,50
SPHINGOMYELIN PHOSPHODIESTERASE	2	18	0,01	9,00
SECRETED GLYCOSIDASES	15	456	0,16	30,40
GALACTOSIDASE/FUCOSIDASE	15	1012	0,36	67,47
MUCINS	215	21301	7,65	99,07
LIPOCALINS/ HISTAMINE BINDING PROTEIN/ P27	294	10524	3,78	35,80
ANTIGEN 5 FAMILY	18	1879	0,68	104,39
PROKINETICIN DOMAIN-CONTAINING PEPTIDES	3	20	0,01	6,67

SECRETED IMMUNITY RELATED PROTEINS				
ANTIMICROBIAL PEPTIDES				
Defensin	22	944	0,34	42,91
Longicornsin	4	126	0,05	31,50
Hebreain/ricinusin/microplusin family	9	679	0,24	75,44
Neutrophil elastase proteins inhibitor	5	528	0,19	105,60
Other intermediate proteins	13	281	0,10	21,62
Lysozyme	3	32	0,01	10,67
IMMUNOGLOBULIN BINDING PROTEINS	12	2810	1,01	234,17
DAP-36 IMMUNOSUPPRESSANT FAMILY	16	468	0,17	29,25
EVASINS	36	1114	0,40	30,94
PATHOGEN RECOGNITION PROTEINS				
Ixoderin/ficolin	11	277	0,10	25,18
ML - Niemann-Pick family	13	305	0,11	23,46
TICK SPECIFIC PROTEINS				
GLYCINE RICH FAMILY				
Cuticle like proteins	14	357	0,13	25,50
Cement proteins	49	27527	9,89	561,78
Elastin proteins	5	243	0,09	48,60
Glue proteins	5	217	0,08	43,40
Silk-like proteins	2	45	0,02	22,50
GYG repeat-containing protein	10	145	0,05	14,50
GGY protein	11	311	0,11	28,27
Other glycine rich proteins	84	12590	4,52	149,88
SALP-15 FAMILY	3	88	0,03	29,33
BASIC TAIL SUPERFAMILY	23	801	0,29	34,83
ACID TAIL SUPERFAMILY	6	400	0,14	66,67
8.9 KDA FAMILY	17	435	0,16	25,59
9.4 KDA FAMILY	6	441	0,16	73,50
10 KDA FAMILY	4	7478	2,69	1869,50
SIMILAR TO *Rhipicephalus*				
Related to R. microplus proteins	243	11045	3,97	45,45
Related to R. appendiculatus proteins	113	5089	1,83	45,04
SIMILAR to Amblyomma				
Related to Amblyoma maculatum proteins	49	1294	0,46	26,41
Related to Amblyomma variegatum proteins	6	101	0,04	16,83
Related to Amblyomma americanum proteins	6	86	0,03	14,33
SIMILAR to Ixodes scapularis	12	918	0,33	76,50
SIMILAR to Dermacentor andersoni	45	1148	0,41	25,51
OTHER SECRETED PROTEINS	43	1409	0,51	32,77
OTHER UNCHARACTERIZED PUTATIVE SECRETED PROTEINS	1432	136204	48,93	95,11
Total	**3600**	**278351**		

*Associated with total of reads from S- category.

Table 5. **Representation according to origin of blood meal of R. microplus transcripts.**

Family	N° of reads from Rm fed on resistant host		N° of reads from Rm fed on susceptible host		P<0.05?
	Observed	Expected	Observed	Expected	
Putative housekeeping proteins					
IMMUNITY RELATED PRODUTCS					
Immunoglobulin G binding protein	2390	2030,421	1405	1764,579	Y
Toll-like receptors	135	140,712	128	122,288	
Similar to protein associated with Interferon	122	130,011	121	112,989	
Similar to macrophage migration inhibitory factor	27	64,738	94	56,262	Y
Alpha-2-macroglobulin	58	47,617	31	41,383	Y
Other proteins possibly associated with immunity	541	463,867	326	403,133	Y
PEPTIDASES					
Cathepsin (aspartyl and cysteine proteases)	212	196,889	156	171,111	
Calpain	37	21,936	4	19,064	Y
Aminopeptidase	74	66,878	51	58,122	
Membrane protease	45	119,846	179	104,154	Y
signal peptide peptidase	117	89,884	51	78,116	Y
Carboxypeptidase	114	176,023	215	152,977	Y
Other peptidases	154	131,616	92	114,384	Y
PROTEIN EXPORT MACHINERY	5729	5957,507	5406	5177,493	Y
CYTOSKELETAL	9959	7990,068	4975	6943,932	Y
DETOXIFICATION					
Sulfotransferases	242	235,946	199	205,054	
Glutathione transferase	235	156,227	57	135,773	Y
Dehydrogenases	183	146,597	91	127,403	Y
O-Methyl transferases	11	9,630	7	8,370	
Multidrug resistance transporters	43	37,987	28	33,013	
Oxidative detoxification					
Cytochrome P450	335	277,678	184	241,322	Y
Catalase	68	61,528	47	53,472	
Superoxide dismutase	34	24,076	11	20,924	Y
Selenoproteins	113	100,585	75	87,415	
EXTRACELLULAR MATRIX AND ADHESION	15265	10046,170	3512	8730,830	Y
AMINO ACID METABOLISM	1834	1682,655	1311	1462,345	Y
CARBOHYDRATE METABOLISM	2263	2051,822	1572	1783,178	Y
ENERGY METABOLISM	8312	25258,009	38897	21950,991	Y
INTERMEDIATE METABOLISM	459	445,676	374	387,324	
LIPID METABOLISM	2318	1976,383	1376	1717,617	Y
NUCLEOTIDE METABOLISM	1637	1483,090	1135	1288,910	Y
NUCLEAR EXPORT	337	255,742	141	222,258	Y
NUCLEAR REGULATION	2610	2478,772	2023	2154,228	Y
PROTEIN MODIFICATION MACHINERY	6348	6355,030	5530	5522,970	
PROTEASOME MACHINERY	2467	2815,838	2796	2447,162	Y
PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY	15608	16143,318	14565	14029,682	Y

SIGNAL TRANSDUCTION	12204	10399,822	7234	9038,178	Y
Similar to protein associated with Apoptosis	681	1107,502	1389	962,498	Y
TRANSCRIPTION FACTORS	3091	2813,163	2167	2444,837	Y
TRANSCRIPTION MACHINERY	18013	13950,785	8062	12124,215	Y
TRANSPORTERS AND STORAGE	5939	4797,037	3027	4168,963	Y
UNKNOWN CONSERVED PROTEINS	56991	40837,411	19337	35490,589	Y
UNKNOWN CONSERVED SECRETED PROTEINS	542	774,717	906	673,283	Y
Putative secreted proteins					
Ubiquitous protein domains					
PROTEINASE INHIBITOR DOMAINS					
Kunitz domains					
Hexalaris	51	36,382	17	31,618	Y
Pentalaris	90	72,763	46	63,237	Y
Tetralaris	178	184,584	167	160,416	
Trilaris	284	492,223	636	427,777	Y
Bilaris	707	854,970	891	743,030	Y
Monolaris	795	1252,494	1546	1088,506	Y
TIL domain (may have anti-microbial activity)	1237	1209,157	1023	1050,843	
Thyropin domains	73	40,662	3	35,338	Y
Cystatin	464	503,459	477	437,541	Y
Serpin	663	510,414	291	443,586	Y
Kazal domain containing peptides	116	163,718	190	142,282	Y
Carboxypeptidase inhibitor	113	271,793	395	236,207	Y
Chimadanin	71	262,697	420	228,303	Y
Phosphatidylethanolamine-binding protein	24	16,586	7	14,414	Y
Other protease inhibitor	254	281,958	273	245,042	Y
Enzymes					
SECRETED PEPTIDASES					
Metalloproteases of the reprolysin family	2540	3042,154	3146	2643,846	Y
Neprilysin-type metalloprotease					
M13 family/neprilysin	439	512,554	519	445,446	Y
Other metalloproteases	187	181,374	152	157,626	
Dipeptidyl-peptidase / M2 family	212	239,156	235	207,844	Y
Serine proteases	3809	2939,429	1685	2554,571	Y
Serine carboxypeptidases	282	291,054	262	252,946	
Transglutaminase	327	243,437	128	211,563	Y
Legumain family	81	79,719	68	69,281	
Endopeptidases	92	115,565	124	100,435	Y
Cathepsin (aspartyl and cysteine proteases)	73	55,108	30	47,892	Y
Other peptidases	52	40,127	23	34,873	Y
SECRETED NUCLEASES					
Deoxyribonuclease II	119	216,150	285	187,850	Y
dsRNA-specific ribonuclease	9	5,885	2	5,115	
Ribonuclease, T2 family	17	11,771	5	10,229	Y
Other endonucleases	29	17,656	4	15,344	Y

5' nucleotidase	291	306,034	281	265,966	
Lipases and esterases	118	104,330	77	90,670	Y
Sphingomyelin phosphodiesterase	14	9,630	4	8,370	Y
Secreted glycosidases	251	243,972	205	212,028	
GALACTOSIDASE/FUCOSIDASE	841	541,446	171	470,554	Y
MUCINS	17423	11396,574	3878	9904,426	Y
LIPOCALINS/ HISTAMINE BINDING PROTEIN/ P27	3153	5630,606	7371	4893,394	Y
ANTIGEN 5 FAMILY	1014	1005,313	865	873,687	
PROKINETICIN DOMAIN-CONTAINING PEPTIDES	19	10,701	1	9,299	Y
Secreted immunity related proteins					
ANTIMICROBIAL PEPTIDES					
Defensin	497	505,064	447	438,936	
Longicornsin	54	67,413	72	58,587	Y
Hebreain/ricinusin/microplusin family	360	363,282	319	315,718	
Neutrophil elastase proteins inhibitor	265	282,493	263	245,507	
Other intermediate proteins	238	150,342	43	130,658	Y
Lysozyme	25	17,121	7	14,879	Y
IMMUNOGLOBULIN BINDING PROTEINS	2261	1503,421	549	1306,579	Y
DAP-36 immunosuppressant family	132	250,392	336	217,608	Y
EVASINS	429	596,018	685	517,982	Y
PATHOGEN RECOGNITION PROTEINS					
Ixoderin/ficolin	137	148,202	140	128,798	
ML - Niemann-Pick family	189	163,183	116	141,817	Y
Tick specific proteins					
GLYCINE RICH FAMILY					
Cuticle like proteins	310	191,004	47	165,996	Y
Cement proteins	24452	14727,641	3075	12799,359	Y
Elastin proteins	210	130,011	33	112,989	Y
Glue proteins	142	116,100	75	100,900	Y
Silk-like proteins	32	24,076	13	20,924	Y
GYG repeat-containing protein	138	77,579	7	67,421	Y
GGY protein	195	166,393	116	144,607	Y
Other glycine rich proteins	10010	6735,969	2580	5854,031	Y
SALP-15 FAMILY	43	47,082	45	40,918	
BASIC TAIL SUPERFAMILY	360	428,555	441	372,445	Y
ACID TAIL SUPERFAMILY	103	214,010	297	185,990	Y
8.9 KDA FAMILY	109	232,736	326	202,264	Y
9.4 KDA FAMILY	59	235,946	382	205,054	Y
10 KDA FAMILY	7098	4000,919	380	3477,081	Y
Rhipicephalus-specific proteins					
R. microplus-specific proteins	5626	5909,354	5419	5135,646	Y
Related to R. appendiculatus proteins	3401	2722,744	1688	2366,256	Y
SIMILAR to Amblyomma					
Related to Amblyoma maculatum proteins	674	692,323	620	601,677	
Amblyomma variegatum -specific proteins	52	54,038	49	46,962	

Amblyomma americanum -specific proteins	27	46,012	59	39,988	Y
SIMILAR to Ixodes scapularis	677	491,153	241	426,847	Y
SIMILAR to Dermacentor andersoni	470	614,209	678	533,791	Y
OTHER SECRETED PROTEINS	900	753,851	509	655,149	Y
OTHER UNCHARACTERIZD PUTATIVE SECRETED PROTEINS	99485	72872,586	36719	63331,414	Y
Unknown proteins or fragments	115622	177488,222	216116	154249,778	Y
Transposable element products					
Class I	6227	5071,505	3252	4407,495	Y
Class II	1049	1014,943	848	882,057	
Other fragments	1816	1478,275	947	1284,725	Y
Probability viral proteins	199	153,017	87	132,983	Y

The transcripts annotated in H, S, U, TE and V categories were analyzed according to origin of blood meal of R. microplus transcripts, if resistant and susceptible hosts. Chisquare tests were performed in these analyses. The *P* value <0.05 was used to establish the level of significance.

Legends to Figures

Figure 1. **The histamine binding proteins in *Rhipicephalus microplus***. Bootstrapped phylogram (1,000 iterations) resulting from the alignment of 54 full-length protein sequences containing signal peptide, as well as one SHBP (gi|18032205) previously characterized and deposited in NCBI databases. The numbers on the nodes indicate the bootstrap support, and the bar at the bottom indicates 50% amino acid divergence. Clades with more than 59% bootstrap support are indicated by Roman numerals.

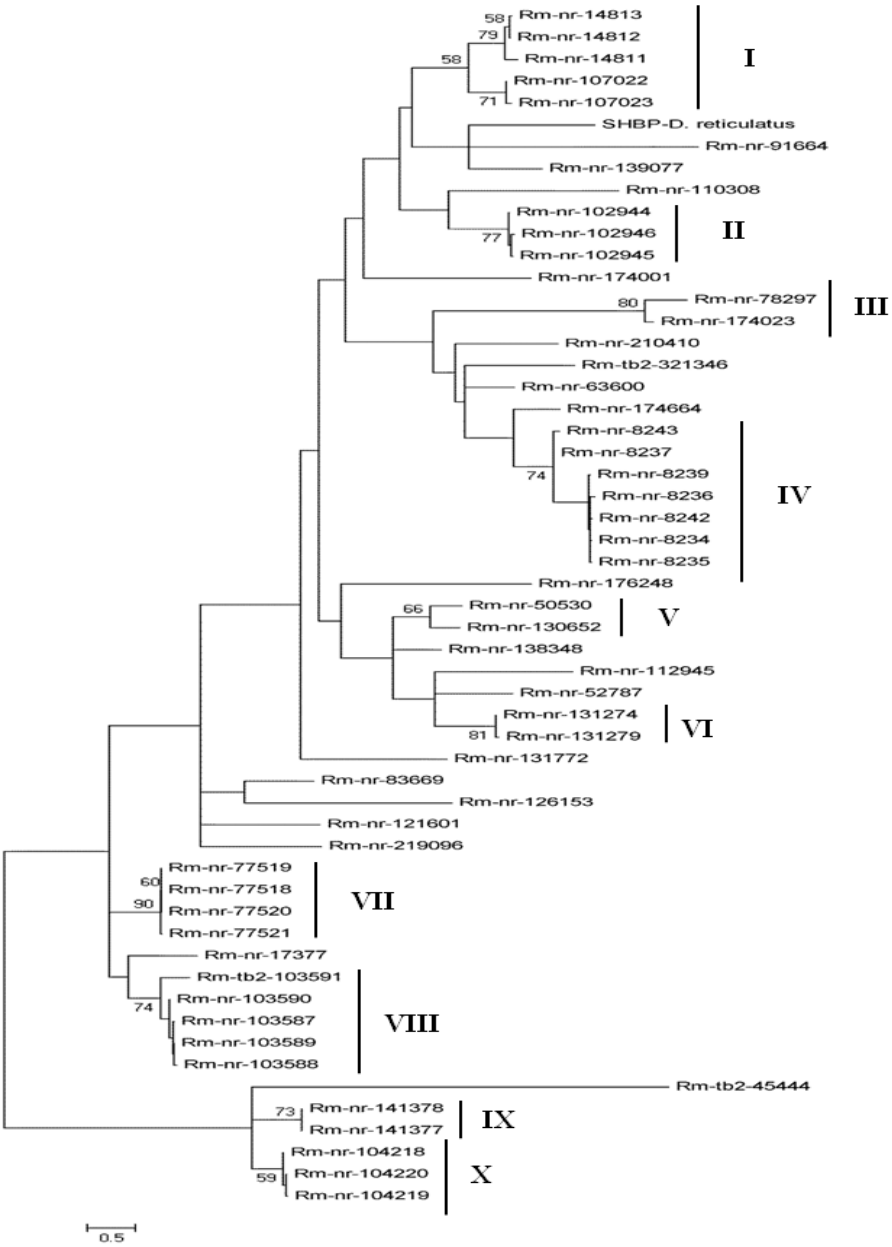


Figure 2. **The antimicrobial peptides from *Rhipicephalus microplus***. Bootstrapped phylogram (1,000 iterations) resulting from the alignment of 39 full-length protein sequences containing signal peptide and two AMPs-NCBI (microplusin and longicornsin). The numbers on the nodes indicate the bootstrap support, and the bar at the bottom indicates 50% amino acid divergence. ○ represents the hebreain/microplusin/ricinusin family (Included a microplusin sequence deposited in NCBI database), □ represents the longicornsin family (included a longicornsin sequence deposited in NCBI database), ■ represents the defensin family, ◇ represents the antigen 5 family, ◆ represents the lysozyme family, △represents the ixoredin/ficolin and ▽represents ML containing peptide family.

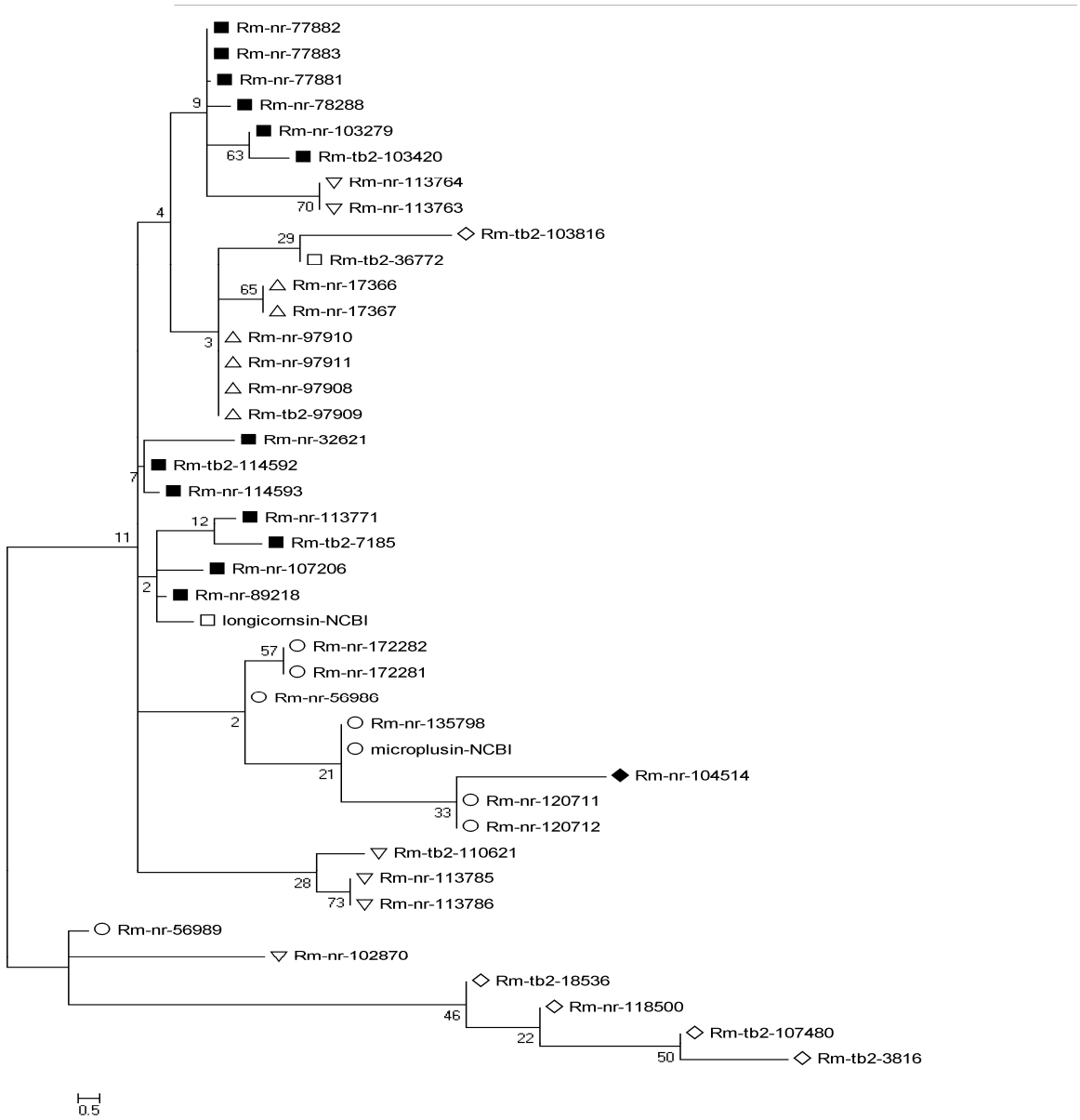
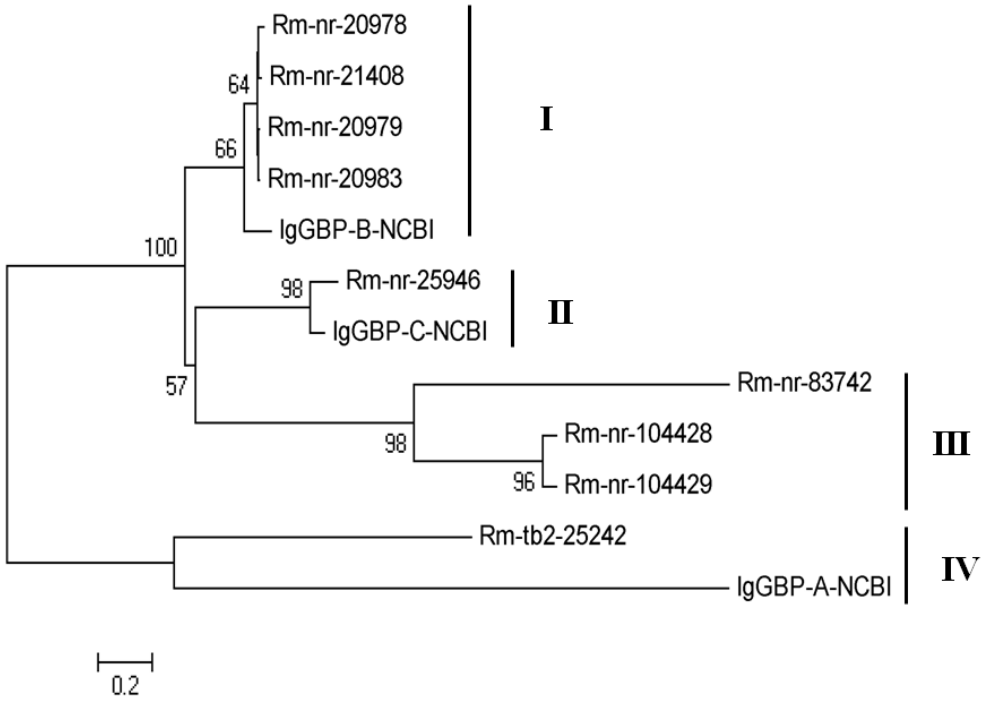


Figure 3. **The salivary IgG binding protein family of proteins in *Rhipicephalus microplus*.** Bootstrapped phylogram (1,000 iterations) resulting from the alignment of nine full-length protein sequences containing signal peptide, as well as three IgGBPs sequences (gi|2352274, gi|145693007 and gi|2352270) previously characterized and deposited in NCBI databases. The numbers on the nodes indicate the bootstrap support, and the bar at the bottom indicates 20% amino acid divergence. Clades with more than 60% bootstrap support are indicated by I, II and III.



Additional File and Table

Additional file 1. **Hyperlinked Microsoft Excel file with assembled reads and various database comparisons.**

Additional file 2. **Hyperlinked Microsoft Excel file with coding sequences and various database comparisons.**

Additional table 1. **Representation of R. microplus transcripts according to developmental stage and origin of blood meal.** The transcrits annotated in H, S, U, TE and V categories were analyzed according to tick developmental stages and the origin of blood meal, if resistant and susceptible

hosts. Chisquare tests were performed in these analysis. The *P* value <0.05 was used to establish the level of significance.

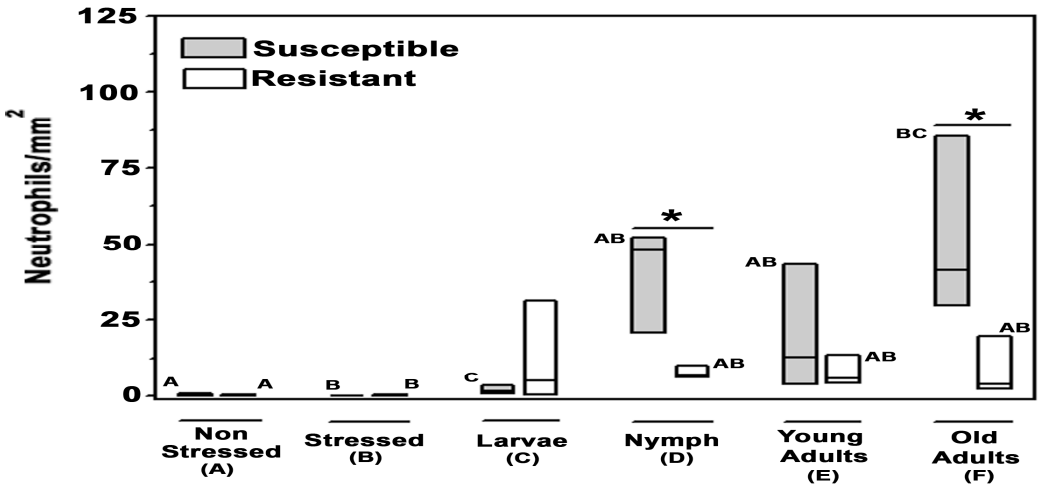
Supplementary Table Legends

Supplementary table 1**. Representation of RmR transcripts according to developmental stages.** The transcrits annotated in H, S, U, TE and V categories were analyzed by tick developmental stages from ticks fed on resistant hosts. Chisquare tests were performed in these analysis. The *P* value <0.05 was used to establish the level of significance.

Supplementary table 2. **Representation of RmS transcripts according to developmental stages.** The transcrits annotated in H, S, U, TE and V categories were analyzed by tick developmental stages from ticks fed on susceptible hosts. Chisquare tests were performed in these analysis. The *P* value <0.05 was used to establish the level of significance.

Supplementary Figure Legend

Supplementary figure 1. **Neutrophils count in skin from resistant and susceptible bovines to tick *R. microplus*.** Paraffin-embedded and May-Grunwald and Giemsa stained sections of (A) non-stressed skin (before infestation of bovines); (B) stressed skin (after infestation of bovines but without tick attached); and infested skin with (C) larvae, (D) nymph, (E) young and (F) old adults ticks were used to counts neutrophils. The means of each bovine to stained neutrophils counted from areas of 0.0625 mm^2 into the dermis from Susceptible (gray boxes) and Resistant (white boxes) were used for further analyses. Values followed by (*) differ significantly (P < 0.050). Values followed by the same capital letter differ significantly (P < 0.05).



PATENTE

8. Solicitação de Patente

Os resultados obtidos nesse estudo serviram para complementar a formulação do pedido inicial de patente. O pedido de patente já está em tramitação sob o protocolo 12.1.17.78.17.3 na Agência USP de Inovação, que posteriormente será submetido junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI.

O pedido de patente está intitulado como "Processo de seleção de antígenos de carrapatos e composições antigênicas anticarrapatos", cuja autoria e responsabilidade De Miranda Santos, Isabel K.F.; Ferreira, Beatriz Rossetti; Valenzuela, Jesus; Ribeiro, José Marcos; **Garcia, Gustavo Rocha;** Maruyama, Sandra Regina; Anatriello, Elen; Moré, Daniela Dantas; Brandão, Lucinda Giampietro e Verìssimo, Cecília.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

9. Materiais suplementares

Esta seção apresenta um DVD contendo uma pasta nomeada "Materiais suplementares", cujo conteúdo são arquivos em pdf e arquivos com extensão .xls e .xlsx. Estes arquivos representam figuras suplementares de 1-5, além de tabelas suplementares de 1-35. Todos esses materiais complementam os resultados descrito no item 4. "Resultados e discussão" desta tese.

Estas tabelas e figuras suplementares foram inserido neste DVD, pois a maioria desses são muito extensos, impossibilitando adicionar no corpo da tese.

Para visualização do conteúdo presente neste DVD, basta inserir o mesmo em um leitor de DVD presente no computador e abrir os aquivos usando programas que permite o formato pdf, como por exemplo, o Adobe Reader®.

Para abrir as tabelas suplementares 1, 2, 33, 34 e 35 irá precisar do programa Microsoft Excel® ou de um programa que abre as extensões .xls ou .xlsx.