

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

ANÁLISE TRANSCRITÔMICA DO INTESTINO DE
FÊMEAS INGURGITADAS DE *Ornithodoros mimon*
(ACARI: ARGASIDAE)

Gabriel Alves Landulfo

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Análise transcritômica do intestino de fêmeas ingurgitadas de
Ornithodoros mimon (Acari: Argasidae)**

GABRIEL ALVES LANDULFO

Sob a Orientação da Professora Dra.
Darci Moraes Barros-Battesti

Co-orientações dos Professores Drs.
João Luiz Horácio Faccini
Eneas de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

595.429

L264a

T

Landulfo, Gabriel Alves, 1987-

Análise transcritômica do intestino de fêmeas ingurgitadas de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) / Gabriel Alves Landulfo - 2016.

69 f.: il.

Orientador: Darci Moraes Barros-Battesti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 52-69.

1. Carrapato - Teses. 2. Parasito - Teses. 3. Intestinos - Parasito - Teses. 4. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 5. Parasitologia veterinária - Teses. I. Barros-Battesti, Darci Moraes, 1959-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

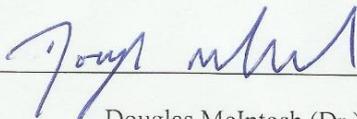
GABRIEL ALVES LANDULFO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 26/02/2016



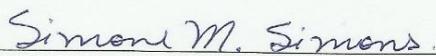
Darci Moraes Barros-Battesti (Dra.), IB (Orientadora)



Douglas McIntosh (Dr.), UFRRJ



Aivaldo Henrique da Fonseca (Dr.), UFRRJ



Simone Simons (Dra.), IB



Erik Daemon de Souza Pinto (Dr.), UFJF

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, Vera Vilma Santos Alves Landulfo e Argemiro Gomes Landulfo Filho, pela dedicação, amor, carinho, lição de vida, atenção e apoio que sempre tiveram comigo em todos os momentos da minha vida. E ao meu avô Valfrido Augusto Alves, que sempre sonhou e desejou ter um neto Doutor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais uma conquista em minha vida.

À professora Darci Moraes Barros-Battesti, pelas orientações, ensinamentos, incentivos e confiança depositada durante todos os anos de convívio.

Ao professor João Luiz Horácio Faccini pelos conselhos e orientações durante o mestrado e doutorado.

Ao Dr. Eneas de Carvalho pela imprescindível co-orientação, ensinamentos, conselhos e confiança durante o período do doutorado.

Ao pesquisador do laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo e as técnicas do laboratório Úrsula Castro Oliveira e Mariana Salgado Morone, pelo sequenciamento gerado com a amostral intestinal do presente trabalho.

Aos colegas do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, como diretor Roberto Henrique Pinto Moraes, pesquisador Antonio Domingos Brescovit, pesquisadora Cristina Anne Rheims, Dra. Sylvia M. Lucas e funcionários (a) Marcia, Gabriella, Livia, Cristina e demais colegas, pelo harmonioso ambiente de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, como Valeria Castilho Onofrio, Simone M. Simons, Dalton Vianna, Taisy, Felipe Gomes, Juliana Cuoco Badari, Leonor, Hamilton, Rafael, Ronaldo Zucatelli e outros por colaborarem na elaboração da minha tese de Doutorado.

Aos amigos e irmãos científicos Diego Ramirez, Jairo Mendoza, Leidiane Duarte, Ricardo, Fernando, Angelina, Danielle e Mercedes pelo companheirismo na pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Ixodologia, Iwine Joyce, Ísis Santolin, Carla Carolina, Vanessa Raia e Michele Costa, assim como a professora Kátia M. Famadas pelo acolhimento e auxílio durante o doutorado na UFRRJ.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, assim como a coordenadoria e secretária do curso.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ pelos momentos de estudo e entretenimento compartilhados.

Agradeço aos companheiros de alojamento, Gideão Galvão, Marcus Sandes Pires, Caio Monteiro, Eduardo Aragão, Fábio Edir, Juliano Tiago, Régis Teixeira, Michel Nogueira, Gilsonley, Deivid e Paraná por todos os momentos de descontração e alegria na nossa moradia.

À UFRRJ, pela acolhida e por todos os momentos especiais que aqui passei.

Um agradecimento especial aos amigos Hermes Ribeiro Luz, Wendell Perionotto, e Ralph Maturano pela companhia e amizade durante o doutorado.

Aos meus familiares, principalmente aos meus Pais, ao meu Irmão Tadeu Augusto Alves Landulfo e à minha tia, Valdete Santos Alves que sempre me apoiaram e ajudaram incondicionalmente.

Agradeço à minha noiva, Tatiane de Souza Barros, pelo apoio, carinho, amor, compreensão e paciência que teve comigo durante todos esses anos. Muito obrigado minha linda.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq), pelo suporte financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudos durante o doutorado.

E por fim agradeço a todos os meus amigos que diretamente ou indiretamente me ajudaram nessa etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

Gabriel Alves Landulfo, filho de Argemiro Gomes Landulfo Filho e Vera Vilma Santos Alves Landulfo, natural de São Paulo, SP, nascido em 6 de setembro de 1987. Realizou o primeiro e segundo grau completo na Escola Estadual Professora Carmosina Monteiro Vianna, E.E.Prof^a. C.M.V.

No ano de 2006 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), concluindo em 2008 a primeira etapa do curso, Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Em 2010 colou grau novamente e tornou-se Bacharel em Ciências Biológicas. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (PIBIC/CNPq) e atuou na linha de pesquisa de Taxonomia e Biologia de carrapatos da família Argasidae no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, sob a orientação da Dra. Darci Moraes Barros-Battesti.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias em nível de Mestrado pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), recebendo bolsa do CNPq. Durante o mestrado participou de projetos, fóruns, workshops e congressos relacionados nas áreas de Parasitologia e Acarologia, e obteve um desenvolvimento bastante satisfatório nos 26 créditos cursados. Em fevereiro de 2012, conclui o curso de mestrado, tornando-se Mestre em Ciências Veterinárias, na área de concentração Parasitologia Veterinária. No mesmo ano, ingressou no Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ. Em 2016 conclui o doutorado tornando-se Doutor em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, com a tese intitulada “Análise transcritômica do intestino de fêmeas ingurgitadas de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) ”.

Durante os cursos de Mestrado e Doutorado publicou 12 artigos em revistas internacionais e nacionais, além de participar de congressos com apresentação de 4 palestras.

RESUMO

LANDULFO, Gabriel Alves. **Análise transcritômica do intestino de fêmeas ingurgitadas de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae)**. 2016. 69p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Ornithodoros mimon é um carrapato argasídeo parasita de quirópteras, aves e marsupiais, além de ser bastante agressivo aos humanos. O conhecimento dos transcritos presentes no intestino dos carrapatos auxilia no entendimento do papel de moléculas vitais no processo digestão e na relação parasito-hospedeiro, além de fornecer também informações sobre a evolução dos artrópodes hematófagos. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo conhecer e identificar as principais moléculas expressas no intestino de uma espécie de carrapato argasídeo após o repasto sanguíneo, através de uma análise transcritômica do intestino de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon*. Sessenta fêmeas foram alimentadas e dissecadas para coleta o tecido intestinal. O RNAm da amostra do intestino foi extraído, purificado e quantificado. Esse serviu de molde para síntese do cDNA, que foi utilizado no pirosequenciamento. O transcritoma foi obtido através do método de montagem *de novo* do cDNA do tecido intestinal. Identificou-se 2235 sequências consensos (*contigs*) ou transcritos, dos quais 1729 apresentaram similaridade (*hit*) com sequências dos bancos de dados, enquanto que 506 não tiveram nenhuma similaridade. Os transcritos foram anotados e agrupados conforme as funções biológicas atribuídas as eles no processo de anotação gênica. Atividade catalítica, adesão e transporte foram as funções mais representativas com 780, 709 e 106 transcritos, respectivamente. Em uma análise não automatizada, os transcritos foram subcategorizados em 31 categorias. As categorias mais representativas foram desconhecido, atividade catalítica e transportadores-canaís. Identificamos 103 transcritos digestivos associados à digestão de proteínas (67), carboidratos (19) e lipídios (17). Proteinases das classes serino, cisteína, aspártica e metalo representaram as enzimas atuantes na digestão intracelular do constituinte proteico do repasto sanguíneo. Genes associados com o transporte (hemelipoglicoproteína) e estocagem (ferritina) dos nutrientes resultantes da digestão foram encontrados bem expressos no trato digestivo. Registrou-se pela primeira vez a presença de uma cisteína peptidase do tipo catepsina O em carrapatos. Foram depositados no banco de dados gênico público 2213 transcritos de *O. mimon*. A análise filogenética das peptidases revelou que a maioria das proteinases de *O. mimon* é próxima aos genes codificadores de proteinases de carrapatos. Transcritos de catepsinas L de *O. mimon* parecem ter divergido de ancestrais recentes diferentes. A inferência filogenética baseada em conjunto de dados transcritos homólogos tem uma resolução topológica similar a de outros conjuntos de dados, como genoma mitocondrial e sequências nuclear de RNA ribossômico (rRNA). Os achados obtidos no presente estudo podem contribuir para compreensão dos importantes processos dos carrapatos argasídeos, como digestão, nutrição e imunidade, além de fornecer informações sobre a filogenia dos carrapatos.

Palavras-chave: transcritoma, intestino, Argasidae

ABSTRACT

LANDULFO, Gabriel Alves. **Gut transcriptome analysis on engorged females of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae)**. 2016. 69p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016

Ornithodoros mimon is an argasid tick that parasitizes bats, birds and opossums and is also aggressive towards humans. It inhabits some countries in the Neotropical region. Knowledge of the transcripts present in the tick gut helps in understanding the role of vital molecules in the digestion process and parasite-host relationship, while also providing information about the evolution of arthropod hematophagy. Thus, the present study aimed to ascertain the main molecules expressed in the gut of argasid ticks after their blood meal, through analysis on the gut transcriptome of engorged females of *O. mimon*. Sixty females were fed and dissected to extract the gut tissue. The transcriptome was obtained through pyrosequencing and the *de novo* assembly method on mRNA of the gut tissue. We identified 2,235 contigs, of which 1,729 matched database sequences, while 506 did not present any hits. The transcripts were annotated and grouped according to their biological function. Catalytic, binding and transporter activity were the most representative functions, accounting for 780, 709 and 106 contigs, respectively. The transcripts were classified into 31 categories, using both bioinformatics and data curation practices. The most representative categories were, respectively, unknown, catalytic activity and transporter channels. One hundred and three (103) digestive transcripts associated to digestion of proteins (67), carbohydrates (19) and lipid (17) were identified in the transcriptome analysis. Peptidases associated with hemoglobin digestion, such as serine, cysteine, aspartic protease and metalloenzymes, were identified in the gut of the engorged females. Genes associated with transport (hemelipoglycoprotein) and storage (ferritin) of nutrients resulting from hemoglobin digestion, such as heme, were also found in the digestive tract. The presence of a cathepsin O-like cysteine peptidase was recorded in ticks, for the first time. Two thousand and two hundred thirteen (2213) transcripts were deposited to the Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) portal of the NCBI. The phylogenetic analysis on the peptidases confirmed that most of them are clustered with other tick genes. Genes for cathepsin L in *O. mimon* appear to have diverged from other more common recent ancestors. The topology of the phylogenetic inferences, based on transcripts of inferred families of homologues, was similar to that of previous reports based on different datasets, such as mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. Our findings may help towards better understanding of important argasid metabolic processes, such as digestion, nutrition and immunity.

Key words: transcriptome, gut, Argasidae

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AA = aminoácido

ANT. MED. DIV = divertículo ântero-mediano do intestino

ANT. LAT. DIV = divertículo latero-mediano

ANT. DIV = divertículo anterior

AO = aorta

ATP = adenosina trifosfato

BLAST = Basic local Alignment Search tool (Ferramenta de busca básica de alinhamento local)

B2G = BLAST2GO

CE = código enzimático

cDNA = DNA complementar

CLCBio = programa CLC-GENOMICS

DDBJ = *DNA Data Base Japan*

DNA = ácido desoxirribonucleico

ENA = *European Nucleotide Archive*

GO = Gene Ontology Consortium – (Consórcio de ontológica gênica)

HT = coração

LAT. DIV = divertículo lateral

MGI = Mouse Genome Informatics

mRNA = RNA mensageiro

N1 = ninfa de primeiro ínstar

N2 = ninfa de segundo ínstar

NCBI = National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para informação biotecnológica)

OMGU = Gut of *Ornithodoros mimon* (Intestino de *Ornithodoros mimon*)

ORF = Open Reading Frames (Quadro Aberto de Leitura)

P. LAT. DIV = divertículo póstero-lateral

P. MED. DIV = divertículo póstero

pb = pares de base

PBS = phosphate buffered saline solution (salução salina tamponada com fosfato)

PCR = Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

PPi = composto de pirofosfato

RGD = *Rat Genome Database*

RNA = ácido ribonucleico

RNA_{later} = *RNA Stabilization Solution* (solução de estabilização do RNA)

RPKM = *Reads per kilobase transcript per million reads*

rRNA = RNA ribossomal

SRA = *Sequence Read Archives*

STOM = estômago

TAI = Tick Adhesion Inhibitor (inibidor de adesão de carrapatos)

TSA = *Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database*

UniprotKB = Universe Protein Resource Knowledgebase

ZFIN = The Zebrafish Model Organism Database

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Análise das sequências, montagem e submissão dos *contigs* do intestino de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon*..... 29

Tabela 2. Categorização dos transcritos obtidos do intestino de fêmeas de *O. mimon* conforme a função biológica atribuída. 32

Tabela 3. Transcritos do trato digestivo de *O. mimon* que possuem altos níveis de expressão gênica (RPKM), totalizando 50 *contigs*..... 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de registro de ocorrência da espécie *Ornithodoros mimon* no Brasil. Os símbolos de formato de triângulo correspondem as localidades de Tiradentes e Vespasiano em Minas Gerais e de Mato Grosso do Sul, o círculo corresponde ao município de Araraquara em São Paulo, o quadrado refere-se ao achado de Sítio d' Abadia em Goiás, as estrelas referem-se aos municípios de Touros e Natal em Rio Grande do Norte, enquanto que estrela de quatro pontas corresponde ao registro de Ipojuca em Pernambuco. 7

Figura 2. Ciclo biológico de *Ornithodoros mimon* em condições de laboratório. Fonte: LANDULFO, 2012..... 8

Figura 3. Anatomia do trato digestivo de um carrapato da família Argasidae pertencente ao gênero *Ornithodoros*. ANT. MED. DIV.= divertículo ântero-mediano; ANT. LAT. DIV.= divertículo latero-mediano; ANT. DIV.= divertículo anterior; AO. = aorta; STOM.= estômago ; HT.= coração; LAT. DIV.=divertículo lateral; P. LAT. DIV.= divertículo póstero-lateral; P. MED. DIV.= divertículo póstero-mediano. Fonte: REAST 1971. 10

Figura 4. Esquema do maquinário digestivo da hemoglobina e a agregação do heme, proposto por Horn et al. (2009) e Sojka et al. (2013). Peptidases envolvidas na digestão, catepsinas D, B, C e L (CatD, CatB, CatL, CatC), legumainas (AE), leucina-aminopeptidase (LAP), serino carboxipeptidase (SCP). AMP representa peptídeos antimicrobianos (hemocidinas) que são derivados a partir da molécula de hemoglobina. As enzimas estão coloridas de acordo com os tipos de proteinases: vermelho = peptidases aspárticas, azul = legumainas, verde = catepsinas e preto serino e metalo peptidases. Fonte: Sojka et al. (2013). 12

Figura 5. Fêmea de *Ornithodoros mimon* dissecada, expondo os órgãos internos do carrapato. A visualização foi realizada em microscópio estereoscópico da marca Nikon SMZ 745T. Em destaque o intestino, indicado pela seta branca. 24

Figura 6. Dinâmica ilustrativa do sequenciamento na plataforma 454. Resumidamente o sequenciamento é dividido em três fases: (a) preparo amostra, (b) PCR em emulsão e (c) Sequenciamento. (a) O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em suas extremidades. (b) os fragmentos com os adaptadores são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Apenas um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. As microesferas são envolvidas individualmente por gotículas oleosas, nas quais ocorrem a PCR em emulsão. Milhares

de cópias do fragmento alvo são produzidas na amplificação. (c) as microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento, e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento. Fonte: CARVALHO; SILVA, 2010)..... 25

Figura 7. Gráfico de barras representando o resultado do BLAST (BLASTX hits) e da anotação, realizado pelo programa BLAST2GO..... 30

Figura 8. Gráfico de barras representando as principais atividades funcionais atribuídas aos *contigs* pelo B2G..... 31

Figura 9. Comparação das sequências de catepsina O no alinhamento da região motivo do sítio ativo da protease tiol de eucariótos. O símbolo asterisco (*) representa os resíduos de aminoácidos conservados e idênticos entre as sequências..... 37

Figura 10. Árvore Filogenética de peptidases. Comparação filogenética de peptidases de *O. mimon* com as proteinases selecionadas que tiveram *hit* na busca do BLAST. A árvore foi construída usando o método de máxima verossimilhança e o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de peptidases. Os ramos de coloração verde e azul claro representam as cisteínas peptidases, enquanto que os ramos azul, vermelho e laranja são as proteinases aspártica, metálica e serina, respectivamente. Em preto estão destacadas as peptidases de *O. mimon*. O método de enraizamento foi o de *midpoint*. 43

Figura 11. Relação filogenética de carrapatos baseado em 425 árvores de máxima verossimilhança dos transcritos homólogos dos carrapatos, construído no MulRF..... 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Geral.....	2
2.1.1 Específicos.....	2
3 REVISÃO LITERÁRIA.....	3
3.1 Família Argasidae, aspectos taxonômicos.....	3
3.2 Espécie <i>O. mimon</i>	6
3.2.1 Importância médica e veterinária de <i>O. mimon</i>	7
3.2.2 Ciclo biológico de <i>O. mimon</i>	7
3.3 Anatomia do canal digestivo de carrapatos argasídeos.....	8
3.4 Processo digestório de carrapatos argasídeos.....	9
3.5 Digestão proteolítica do repasto sanguíneo.....	9
3.6 Enzimas proteolíticas da digestão do repasto sanguíneo dos carrapatos.....	12
3.7 Transcritoma.....	14
3.8 Sequenciamento de RNA (RNA sequencing ou RNAseq).....	15
3.9 Bioinformática: análise e montagem (<i>assembly</i>).....	17
3.10 Transcritoma de carrapatos.....	18
3.11 Inferência filogenética.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Origem dos carrapatos.....	23
4.2 Colônia de <i>Ornithodoros mimon</i>	23
4.3 Dissecção dos carrapatos e extração dos órgãos.....	23
4.4 Purificação do RNA mensageiro (mRNA).....	24
4.5 Quantificação do mRNA.....	24
4.6 Sequenciamento.....	24
4.7 Bioinformática.....	26
4.8 Submissão da corrida de sequenciamento e dos transcritos de <i>O. mimon</i> ao banco de dados.....	27
4.9 Análise filogenética de peptidases.....	27
4.10 Análise filogenética de carrapatos a partir de dados de transcritos.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Quantificação do mRNA das amostras.....	29
5.2 Sequenciamento, tratamento das sequências e montagem dos <i>contigs</i>	29

5.4 Anotação automatizada: função, ontologia gênica e sublocalização celular	30
5.4.1 Atribuição funcional.....	30
5.4.2 Predição de sublocalização celular.....	30
5.5 Categorização dos <i>contigs</i>	31
5.6 Transcritos de maior nível de expressão (RPKM) no trato digestivo de <i>O. mimon</i>	31
5.7 Transcritos envolvidos na digestão do repasto sanguíneo e na absorção de nutrientes.....	35
5.7.1 Enzimas digestivas.....	35
5.7.1.1 Peptidases	35
5.7.1.2 Metabolismo de carboidrato.....	38
5.7.1.3 Metabolismo de lípidio.....	39
5.7.2 Outros transcritos associados com as atividades funcionais do intestino	39
5.7.2.1 Inibidor de peptidase	39
5.7.2.2 Imunidade.....	40
5.7.2.3 Metabolismo oxidativo.....	40
5.7.2.4 Transportadores-canais.....	40
5.8 Filogenia	41
5.8.1 Filogenia de peptidases digestivas	41
5.8.2 Filogenia de carrapatos: árvore de espécies construída usando conjunto de dados de transcrito.....	42
6 DISCUSSÃO.....	45
6.1 Transcritos envolvidos nas funções do intestino	46
6.2 Filogenia	48
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
8 CONCLUSÃO.....	51
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos compreendem um grupo de ectoparasitos hematófagos de importância médica e veterinária, pois podem atuar como vetores de organismos patogênicos e causar lesões, injúrias ou irritação nos hospedeiros. Esses acarinos são dotados de estratégias e mecanismos que possibilitam o parasitismo e o hematofagismo, como a presença de anticoagulantes, antiplaquetários e moduladores do sistema imune na saliva do carrapato; e/ou de peptidases, moléculas carreadoras e proteínas da imunidade inata no intestino.

Recentes estudos visam a elaboração de novos métodos de controle de carrapatos, pois os tradicionais estão cada vez menos eficazes, gerando linhagens resistentes. Dentre esses métodos, destacam-se atualmente o uso de moléculas alvo ou recombinantes para a criação de vacinas ou drogas que possibilitam o bloqueio da sobrevivência e do desenvolvimento dos carrapatos. Desta maneira, conhecer os constituintes moleculares vitais para o carrapato, como genes e/ou proteínas, tornou-se meta de diversos trabalhos.

Trabalhos esses que buscam conhecer e compreender o papel das moléculas envolvidas na relação carrapato-hospedeiro ou carrapato-patógeno, além de buscarem moléculas de interesse biotecnológico e farmacológico que tem potencial para a elaboração de novos métodos de controle. O contexto evolutivo dos organismos hematófagos é outra abordagem de destaque nos estudos, pois com o advento da filogenia molecular, as inferências evolutivas dos genes e das proteínas auxiliam na compreensão do comportamento hematofágico dos artrópodes. Além disso, o conhecimento sobre os constituintes do processo digestivo dos carrapatos é ainda bastante escasso, principalmente referente aos membros da família Argasidae.

Estudos sobre os genes e proteínas de importantes órgãos dos carrapatos, como glândula salivar, intestino, ovário e corpo gorduroso, vêm sendo abordados em diversos trabalhos. Esses órgãos são coletados e processados por métodos moleculares e bioquímicos, e analisados em abordagens genômica, transcritômica e proteômica. Os estudos visam descobrir moléculas de interesse biotecnológico ou simplesmente genes com histórias evolutivas que poderiam solucionar determinadas definições sistemáticas, filogenéticas e taxômicas de um grupo específico.

Desta maneira, o presente trabalho elucidada o transcritoma do intestino de uma espécie de argasídeo da fauna brasileira e neotropical, que parasita morcegos, aves, marsupiais e humanos. Para tanto, estudamos os principais transcritos intestinais da espécie de *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 através de uma análise transcritômica dos genes identificados no intestino de fêmeas ingurgitadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o perfil transcritômico do intestino de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969, através da construção e caracterização de uma biblioteca de cDNA, obtida pela plataforma de sequenciamento de nova geração – 454 Roche.

2.1.1 Específicos

- Gerar um banco de dados anotado dos transcritos encontrados, caracterizando os genes/proteínas envolvidos em processos biológicos de interesse;
- Analisar as sequências geradas através da ontologia gênica funcional e de localização celular dos transcritos;
- Descrever e catalogar os principais transcritos intestinais;
- Identificar possíveis transcritos digestivos;
- Realizar análises filogenéticas com o objetivo de inferir a relação entre transcritos de proteinases de *O. mimon* e as sequências de peptidases depositadas nos bancos de dados;
- Verificar a utilidade do conjunto de dados de transcritos completo para inferir a relação filogenética entre os carrapatos.

3 REVISÃO LITERÁRIA

3.1 Família Argasidae, aspectos taxonômicos

Os argasídeos diferenciam-se da família Ixodidae tanto por caracteres morfológicos, como a ausência de escudo dorsal e posição ventral do gnatosoma nos estágios pós-larvais, quanto por aspectos biológicos por terem vários ínstares ninfais e ciclos gonotróficos, e características ecológicas, nidícolas (VIAL, 2009). Os membros dessas famílias são hematófagos cujos hospedeiros englobam uma vasta diversidade de animais vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos), incluindo o homem (HOOGSTRAAL, 1985; GONZALEZ RIVAS et al., 2012; BARROS-BATTESTI et al., 2012, 2015). Assim como os ixodídeos, os argasídeos possuem importância médica e veterinária, pois podem transmitir agentes patogênicos e causar injúrias aos hospedeiros durante a hematofagia (SONENSHINE, 1991; BARROS-BATTESTI et al., 2006).

A família Argasidae compreende os carrapatos conhecidos popularmente como carrapatos moles ou “*soft ticks*”. Diferentemente dos ixodídeos que possuem uma posição taxonômica bem estabelecida, os argasídeos apresentam complicações sistemáticas e filogenéticas que geram controvérsias, ou seja, a classificação está em estado de indefinição (NAVA et al., 2010), principalmente com relação ao gênero *Ornithodoros*.

Escolas taxonômicas diferentes (ocidental/oriental/francesa) divergem quanto ao consenso da posição genérica dos argasídeos. Segundo Estrada-Peña et al. (2010), dois importantes fatores contribuem para esta incerteza: primeiro, a falta de determinação de caracteres morfológicos estáveis e confiáveis adequados para identificação e separação das espécies, e segundo, é a alta diversidade de espécies de Argasidae, que segundo Nava et al. (2010) e Dantas-Torres et al. (2012), tem sido subestimada nas compilações das chaves taxonômicas, principalmente na região Neotropical. Outro fator que colabora para essas complicações é a escassez de material adequado para análise molecular, pois faltam exemplares de cada táxon para a colheita de DNA e realização de análises moleculares filogenéticas (LABRUNA; VENZAL, 2009). Desta maneira, diferentes classificações já foram propostas em diversos trabalhos, e todas baseadas em caracteres morfológicos (NAVA et al., 2010), como demonstra o esquema abaixo elaborado por Estrada-Peña et al. (2010):

➤ Classificação da família Argasidae conforme Pospelova-Shtrom, 1946:

- Subfamília: Argasinae

Gêneros:

a) *Argas* – Subgêneros:

Persicargas Kaiser, Hoogstral and Kohls, 1964

Carios Latreille, 1796

Chiropteragas Hoogstraal, 1955

Secretargas Hoogstraal, 1957

- Subfamília: Ornithodorinae

Gêneros:

b) *Otobius*

c) *Alveonasus* Shculze, 1941 – Subgêneros:

Alveonasus

Ogadenus

Proknekalia

d) *Ornithodoros* – Subgêneros:

Ornithodoros

Pavlovskyella

Theriodoros
Ornamentum
Alectorobius
Reticulinasus
Subpalmatus
Antricola

➤ **Classificação conforme Clifford et al. 1964 complementada por Hoogstraal 1985:**

- Subfamília: Argasinae

Gênero:

a) *Argas* – Subgêneros:

Argas

Persicargas

Microargas

Carios

Chiropteargas

Secretargas

- Subfamília: Ornithodorinae

Gêneros:

b) *Otobius*

c) *Ornithodoros* - Subgêneros:

Proknekalia

Alveonasus

Pavlovskyella

Ornamentum

Reticulinasus

Alectorobius

Subpalmatus

d) *Antricola* – Subgêneros:

Antricola

Parantricola

e) *Nothoaspis*

➤ **Classificação de Argasidae conforme Camicas & Morel (1977):**

- Subfamília: Argasinae

Gêneros:

a) *Argas*

b) *Carios*

c) *Ogadenus*

- Subfamília: Ornithodorinae

Gêneros:

a) *Alectorobius*

b) *Alveonasus*

c) *Antricola*

d) *Parantricola*

e) *Nothoaspis*

f) *Ornithodoros*

g) *Otobius*

➤ **Classificação de Argasidae conforme Komplen & Oliver (1993)**

- Subfamília: Argasinae

Gênero:

a) *Argas*

- Subfamília: Ornithodorinae

Gêneros:

a) *Otobius*

b) *Ornithodoros*

c) *Carios* (incluindo *Carios*, *Chiropteargas*, *Alectorobius*, *Suparmatus*, *Reticulinasus*, *Antricola*, *Parantricola* e *Nothoaspis*).

Até meados dos anos 90, os taxonomistas da região Neotropical adotavam a classificação de Hoogstraal (1985), que reconhece cinco gêneros válidos, *Argas* Latreille, 1975; *Antricola* Cooley & Kohls, 1942; *Nothoaspis* Keirans & Clifford, 1975; *Ornithodoros* Koch, 1844 e *Otobius* Banks, 1912. Porém, Klompen e Oliver (1993) realizaram um estudo da sistemática e filogenia de Argasidae e propuseram um rearranjo na classificação taxonômica da família. Os gêneros *Antricola* e *Nothoaspis*, assim como alguns membros de *Argas* e *Ornithodoros* associados a morcegos (*Alectorobius*) foram agrupados no subgênero *Carios* Latreille, elevado a gênero por Klompen & Oliver (1993). Essa classificação foi baseada em análise filogenética de caracteres morfológicos, biologia e comportamento, mas não incluiu a distribuição do hospedeiro e nem análises moleculares (sequências de DNA) (VENZAL et al., 2008).

Horak et al. (2002) e Baker e Murell (2004) adotaram as modificações propostas por Klompen & Oliver (1993) em suas respectivas listas de espécies de carrapatos no mundo. Entretanto, Estrada-Peña et al. (2004, 2010), Guglielmone et al. (2003, 2010), Venzal et al. (2006, 2008), Labruna et al. (2008, 2011), Labruna & Venzal (2009) e Nava et al. (2010) não concordaram totalmente com o rearranjo de Klompen & Oliver (1993), principalmente no caso da invalidação dos gêneros *Antricola* e *Nothoaspis*. Esses autores alegaram que, antes de invalidar os gêneros, era preciso adicionar mais evidências como, ciclo de vida, associação com o hospedeiro e taxonomia molecular nos estudos sistemáticos e filogenéticos, para consolidar a posição dos táxons de Argasidae. Assim, devido às complicações na posição taxonômica da família Argasidae, optei por adotar a classificação antiga de Hoogstraal (1985) para as espécies de argasídeos que ocorrem no Brasil.

Na última lista de carrapatos do mundo elaborada por Guglielmone et al. (2010), a família Argasidae estava representada por 193 espécies descritas. Porém, no decorrer dos últimos anos, novas espécies foram descobertas, principalmente na Região Neotropical, mais precisamente na América do Sul (NAVA et al., 2010; VENZAL et al., 2012). Assim, atualmente a fauna de Argasidae é de aproximadamente 200 espécies (NAVA et al., 2010; VENZAL et al., 2012, 2013), das quais 88 pertencem a região Neotropical (VENZAL et al., 2012, 2013, 2015; BARROS-BATTESTI et al., 2015) e 22 ocorrem no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2009; LABRUNA; VENZAL 2009; NAVA et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012; BARROS-BATTESTI et al., 2013, 2015).

Atualmente a fauna de argasídeo da região Neotropical compreende: *Antricola* (17 espécies), *Argas* (12 espécies), *Nothoaspis* (2 espécies), *Ornithodoros* (56 espécies) e *Otobius* (1 espécie) (GUGLIELMONE et al., 2010, NAVA et al., 2010, VENZAL et al., 2012, 2013, 2015). No Brasil, as 22 espécies de Argasidae estão distribuídas nos gêneros *Argas* (1), *Antricola* (3), *Nothoaspis* (1) e *Ornithodoros* (17) (GUGLIELMONE et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012; BARROS-BATTESTI et al., 2013, 2015). A espécie *Otobius megnini* Duges 1884 já foi relatada no norte Brasil (FLECHTMANN, 1973), porém Dantas-Torres et al. (2009) comentaram que este carrapato argasídeo não se estabeleceu na fauna brasileira porque nunca mais foi encontrado no país.

Entre os argasídeos, o gênero *Ornithodoros* é o mais representativo. As 17 espécies brasileiras são: *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, *Ornithodoros capensis* Neumann, 1901, *Ornithodoros cavernicolous* Dantas-Torres, Venzal & Labruna, 2012; *Ornithodoros faccinii* Barros-Battesti, Landulfo & Luz, 2015; *Ornithodoros fonsecai* (Labruna & Venzal, 2009); *Ornithodoros hasei* (Schulze, 1935); *Ornithodoros jul* Schulze, 1940; *Ornithodoros kohlsi* Guglielmone & Keirans, 2002; *Ornithodoros marinkellei* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros nattereri* Warburton, 1927; *Ornithodoros rondoniensis* (Labruna, Terassini, Camargo, Brandão, Ribeiro & Estrada-Peña, 2008); *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911; *Ornithodoros rudis* Karsh, 1880; *Ornithodoros setosus* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros stageri* Cooley & Kohls, 1941 e *Ornithodoros talaje* (Guérin-Méneville, 1849) (GUGLIELMONE et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012; BARROS-BATTESTI et al. 2013, 2015).

3.2 Espécie *O. mimon*

A espécie *O. mimon* é parasita de Chiroptera, originalmente descrita de larvas coletadas sobre morcegos da espécie *Mimon crenulatum* (E. Geoffroy) da Bolívia e *Eptesicus brasiliensis* (Desmarest) do Uruguai (Kohls; Clifford; Jones, 1969). Esse carrapato foi relatado pela primeira vez no Brasil, com base na morfologia da larva, que foi coletada em morcegos da espécie *Diphylla ecaudata* Spix do Distrito Federal, em *E. brasiliensis* do Paraná e em morcegos não identificados do estado de São Paulo (VENZAL et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2009). No estado de São Paulo, a espécie foi encontrada em uma residência no município de Araraquara, cujos moradores apresentavam lesões decorrentes das picadas de ninfas e adultos.

A redescrição da larva bem como a descrição dos estágios ninfais e adulto e o ciclo de vida de *O. mimon* foram publicados por Barros-Battesti et al. (2011) e Landulfo et al. (2012, 2013).

Labruna et al. (2014) registraram seis novas localidades de quatro estados de ocorrência de *O. mimon*, como Tiradentes e Vespasiano em Minas Gerais, Sítio d' Abadia em Goiás, Ipojuca em Pernambuco e Touros e Natal em Rio Grande do Norte (Figura 1). Desses novos registros, cinco ocorreram em residências de humanos e um em ambiente silvestre no qual 11 larvas foram coletadas em um marsupial da espécie *Didelphis albiventris* Lund em uma Reserva da Floresta Atlântica em Natal-RN (LABRUNA et al., 2014). Os registros residenciais de *O. mimon* foram baseados em coletas de ninfas e adultos, que posteriormente foram identificados a nível de espécie, pela obtenção do estágio larval em laboratório.

Sponchiado et al. (2015) recentemente também relataram o parasitismo de larvas de *O. mimon* em marsupiais das espécies *D. albiventris*, *Gracilinanus agilis* (Bumeister, 1854) e *Thylamys macrurus* (Olfers, 1818), e em roedores da espécie *Rhipidomys macrurus* (Gervais, 1855) do cerrado do Mato Grosso do Sul, expandindo assim o espectro de hospedeiros para a espécie (Figura 1). No mesmo estado Muñoz-Leal et al. (2016) registraram 4 larvas de *O. mimon* em morcegos da espécie *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) coletados no pantanal mato grossense. Ramos et al. (2015) registraram pela primeira vez o parasitismo de larvas de *O. mimon* em aves do grupo Passariformes, ampliando assim o leque de hospedeiros da espécie de argasídeo.



Figura 1. Distribuição de registro de ocorrência da espécie *Ornithodoros mimon* no Brasil. Os símbolos de formato de **triângulo** correspondem as localidades de Tiradentes e Vespasiano em **Minas Gerais** e de **Mato Grosso do Sul**, o **círculo** corresponde ao município de Araraquara em **São Paulo**, o **quadrado** refere-se ao achado de Sítio d' Abadia em **Goias**, as **estrelas** referem-se aos municípios de Touros e Natal em **Rio Grande do Norte**, enquanto que **estrela de quatro pontos** corresponde ao registro de Ipojuca em **Pernambuco**.

3.2.1 Importância médica e veterinária de *O. mimon*

Labruna et al. (2014) relataram que o parasitismo de *O. mimon* em humanos ocorre por meio da picada dos estágios pós-larvais durante a noite, e que a presença do carrapato nas residências está associada aos morcegos e marsupiais no sótão ou telhado das casas. O papel de *O. mimon* como transmissor de patógenos é ainda desconhecido, pois até o momento, não foi diagnosticado nenhum organismo patogênico nos espécimes encontrados. Porém, a espécie é bastante agressiva, ocasionando intensas lesões decorrentes das picadas e é frequentemente encontrada nas residências (BARROS-BATTESTI et al., 2011; LABRUNA et al., 2014).

3.2.2 Ciclo biológico de *O. mimon*

O estudo do ciclo biológico de *O. mimon* foi elucidado pela primeira vez em condições de laboratório por Landulfo et al. (2012), com a utilização de roedores

(*Meriones unguiculatus*) e coelhos como hospedeiros. O ciclo biológico da espécie de estudo compreende vários estágios: ovo, larva, 3 instares ninfais e adultos (macho e fêmea) (Figura 2). As ninfas e os adultos alimentam-se rapidamente nos hospedeiros, por cerca de 10 a 40 minutos, enquanto que as larvas apresentam um perfil alimentar lento, típico de *Alectorobius*, ou seja, permanecem fixas por 4 a 9 dias nos hospedeiros (LANDULFO et al., 2012). O primeiro ínstar ninfal (N1) pode eventualmente realizar muda sem repasto sanguíneo. A maturidade sexual ocorre a partir das ninfas de segundo ínstar (N2), com machos emergindo preferencialmente de N2 e fêmeas de N3. Após o repasto sanguíneo e acasalamento, as fêmeas colocam centenas de ovos, que passam por um período de incubação (9-18 dias) até originarem o primeiro estágio ativo (larva). O ciclo biológico completo da espécie leva de 146 a 175 dias em condições de laboratório (Figura 2).

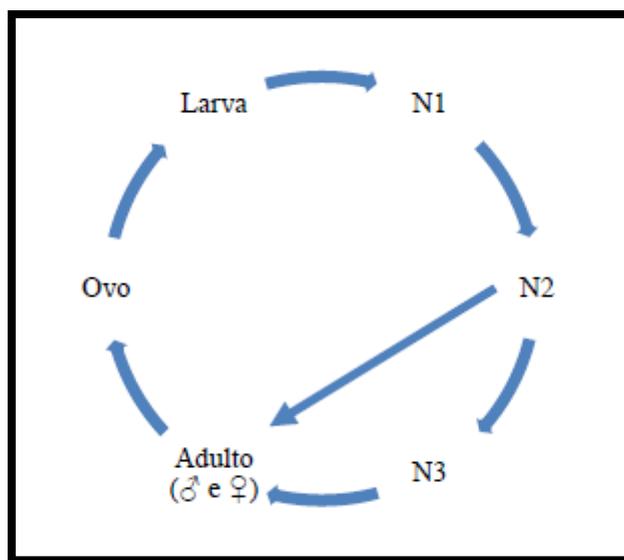


Figura 2. Ciclo biológico de *Ornithodoros mimon* em condições de laboratório. Fonte: LANDULFO, 2012.

3.3 Anatomia do canal digestivo de carrapatos argasídeos

O sistema digestório dos carrapatos cobre a maior parte da cavidade corporal e caracteriza-se como um canal alimentar que apresenta ramificações, tanto na porção anterior como na posterior (ROSHDY, 1961; SONENSHINE, 1991).

Segundo Grandjean e Aeschlimann (1973) o órgão digestivo dos carrapatos argasídeos consiste de uma faringe e de um esôfago que abre dentro do estômago ou intestino médio (*midgut*). O estômago é composto de uma porção mediana central e por dois pares de divertículos anteriores e um par posterior (Figure 3) (ROSHDY, 1962). A quantidade e divisão dos divertículos variam conforme a espécie (GRANDJEAN; AESCHLIMANN, 1973).

De acordo com Roshdy (1961, 1962) os divertículos anteriores alcançam a porção anterolateral da cavidade corporal do carrapato, enquanto que os posteriores se expandem até a região final do estômago, estendendo-se lateralmente ao alcance dos órgãos internos, como ovário nas fêmeas e testículos nos machos. Na superfície posteroventral do intestino observa-se um curto tubo, o reto, que termina na abertura do sáculo retal (ROSHDY, 1962). Essa última estrutura caracteriza-se como um órgão bilobado, de parede fina, localizado na região mediana da porção posterior do corpo (ROSHDY, 1962). O canal alimentar termina em um curto e fino tubo anal, que se expande a partir da superfície ventral do sáculo retal e percorre ventralmente até o ânus (ROSHDY, 1961).

3.4 Processo digestório de carrapatos argasídeos

Akov (1982) cita que em argasídeos a digestão ocorre logo após o desprendimento do carrapato do hospedeiro e é realizada em três estágios. Grandjean e Aeschilimann (1973) evidenciaram o ciclo digestivo da espécie de carrapato argasídeo, *Ornithodoros moubata* (Murray 1877) e o dividiram nas etapas I - preparação, II - rápida e III - lenta, baseando-se em mudanças histológicas observadas no tecido intestinal. Após o repasto sanguíneo, inicia-se fase I, que é caracterizada pelo alongamento da camada de células epiteliais do intestino médio (*midgut*), pela hemólise no lúmen intestinal e pela perda de peso devido à secreção de fluídos das glândulas coxais (GRANDJEAN; AESCHILMANN, 1973; AKOV, 1982). A digestão propriamente dita inicia-se na fase II com o crescimento das células digestivas ativas que emitem saliências ou prolongamentos para a fagocitose das células sanguíneas do hospedeiro, como os eritrócitos, resultantes da hemólise no lúmen intestinal (GRANDJEAN, 1983). Esta fase é também caracterizada pela rápida perda de peso tanto em fêmeas virgens como nas maduras (GRANDJEAN; AESCHILMANN, 1973) e pela eliminação de resíduos indigestíveis (AKOV, 1982).

A atividade digestiva completa-se na terceira fase (III-lenta) e é caracterizada pela taxa lenta de digestão durante a qual o carrapato pode permanecer por um longo período de jejum, e pela presença de numerosas células salientes contendo vacúolos ou fagossomos com hemoglobina (AKOV, 1982; GRANDJEAN, 1982). Conforme Grandjean (1984), o processo digestivo dos carrapatos é intracelular dentro das células epiteliais digestivas do intestino médio e inicia-se com a fusão de lisossomos primários aos fagossomos que possuem enzimas para a digestão proteolítica dos componentes proteicos do repasto sanguíneo, como a hemoglobina.

3.5 Digestão proteolítica do repasto sanguíneo

O sangue do hospedeiro é uma rica fonte proteica para o carrapato, pois ele fornece nutrientes essenciais para os processos biológicos, como a ecdise, vitelogênese e produção dos ovos (HORN et al., 2009). E dentre os constituintes do sangue, a hemoglobina e a albumina são as principais fontes nutritivas para os carrapatos, embora a quantidade de hemoglobina seja maior que a de albumina (KOH et al., 1990; HORN et al., 2009).

Os carrapatos, como ectoparasitos hematófagos, possuem um repertório proteico destinado à manutenção e digestão dos constituintes do repasto sanguíneo, como a hemoglobina (HORN et al., 2009; FRANTA et al., 2010). Diferente dos demais artrópodes hematófagos, a digestão do repasto sanguíneo dos carrapatos é intracelular, ocorrendo dentro de vesículas lisossomais digestivas (dotadas de enzimas proteolíticas) das células epiteliais do intestino, que resultam na formação de oligopeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos livres, que são liberados para o citoplasma da célula e utilizados para os processos biológicos (SONENSHINE, 1991; SOJKA et al., 2013).

Bogin e Hadani (1973) avaliaram a atividade enzimática da digestão do repasto sanguíneo da espécie *Hyalomma excavatum* Koch, 1844 e verificaram que o pH ótimo de atuação das proteinases do intestino, durante a digestão, é 2,9, com uma amplitude ideal de atuação entre 2,8 a 3,2. Akov et al. (1975) também verificaram a ação ótima enzimática proteolítica no intestino de fêmeas de *Ornithodoros tholozani* (Laboulbène and Mégnin, 1882) em pH ácido (2,7 a 3,3), afirmando que a atividade diminui com o aumento do pH, ou seja, as enzimas proteolíticas atuantes na digestão ocorrem em pH ácido. Ambos trabalhos suspeitavam da presença de catepsinas (principalmente a catepsina D) na digestão do repasto sanguíneo, devido ao pH ácido de atuação destas enzimas proteolíticas.

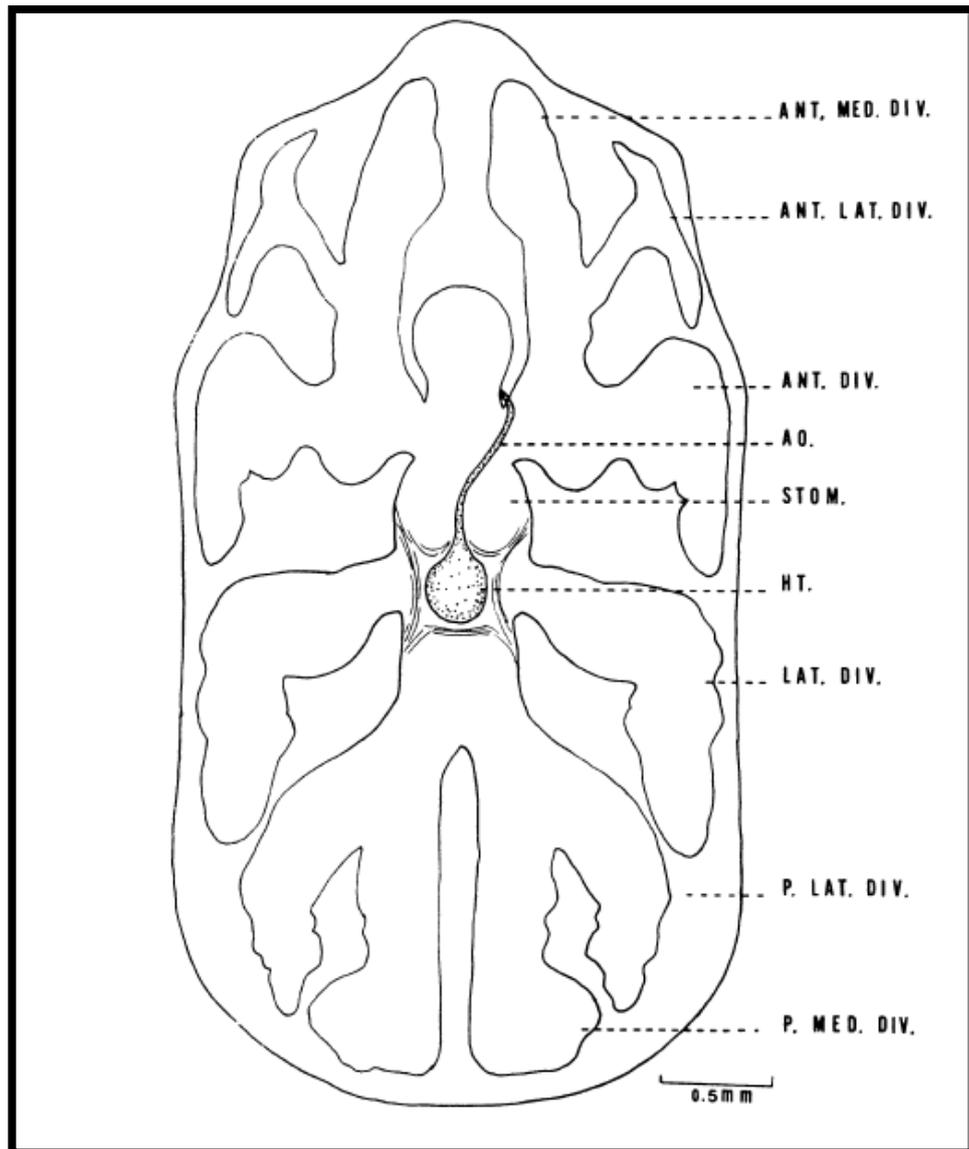


Figura 3. Anatomia do trato digestivo de um carrapato da família Argasidae pertencente ao gênero *Ornithodoros*. ANT. MED. DIV.= divertículo ântero-mediano; ANT. LAT. DIV.= divertículo latero-mediano; ANT. DIV.= divertículo anterior; AO. = aorta; STOM.= estômago ; HT.= coração; LAT. DIV.=divertículo lateral; P. LAT. DIV.= divertículo póstero-lateral; P. MED. DIV.= divertículo póstero-mediano. Fonte: REAST 1971.

Grandjean (1984) estudou a digestão do repasto sanguíneo em *O. moubata* e identificou a atividade de proteases lisossomais em ambiente ácido. O mesmo foi observado por Koh et al. (1990) para a espécie *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901. Hatta et al. (2006, 2009), Boldbaatar et al. (2006), Miyoshi et al. (2008) e Yamaji et al. (2009) também identificaram a atividade de proteinases, como leucina aminopeptidase, serinos e cisteínas peptidases no trato digestivo de *H. longicornis*. Mendiola et al. (1996) e Kongsuwan et al. (2010) caracterizaram a atividade proteolítica em pH ácido no intestino de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), por meio de análises bioquímica e proteômica, e identificaram proteinases como as catepsinas L e B, legumainas, aminopeptidases e metalopeptidases.

Sojka et al. (2007, 2008, 2012 e 2013) também identificaram a atividade de legumainas e catepsinas (B, C, D e L) no intestino de *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758),

enquanto que Horn et al. (2009) encontraram, na mesma espécie, peptidases do grupo da leucina aminopeptidase e carboxipeptidase, além das endopeptidases citadas anteriormente. Anderson et al. (2008) realizaram um estudo transcritômico do intestino médio de *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) e encontraram enzimas proteolíticas de diferentes classes, como serinos, cisteínas, aspártica e metalopeptidase.

Lara et al. (2005) elucidaram o caminho intracelular da digestão do repasto sanguíneo e sugeriram a existência de um receptor específico para hemoglobina na superfície das células digestivas de carrapatos. Esses autores verificaram que a hemoglobina é digerida em grandes vesículas, enquanto que albumina é associada a pequenas vesículas. Além disso, observaram que a digestão da hemoglobina gera conteúdos prostéticos férricos (exemplo, heme) que são acumulados e agregados dentro de organelas específicas, denominadas de hemossomos, que evita a desintoxicação das células digestivas.

Segundo Horn et al. (2009) a degradação inicial da hemoglobina no processo digestivo dos carrapatos é realizada principalmente pela catepsina D, que tem como enzimas auxiliares às proteinases catepsina L e legumaina (Figura 4). Por outro lado, as catepsinas C e B clivam os fragmentos de hemoglobina da degradação inicial em dipeptídeos (Figura 4) (SOJKA et al., 2008). Sojka et al. (2011) reportaram que a catepsina B é o componente mais abundante no maquinário hemoglobinolítico de *I. ricinus*, atuando na clivagem dos grandes fragmentos peptídicos e oligopeptídicos de hemoglobina. As demais peptidases, como metalo e serino peptidases, ainda não tiveram o papel digestivo desvendado, porém são frequentemente encontradas expressas em carrapatos e reguladas pelo repasto sanguíneo (ANDERSON et al., 2008; HORN et al., 2009). Hatta et al. (2006, 2009) identificaram e caracterizaram a peptidase leucina aminopeptidase nas células epiteliais digestivas do intestino de *H. longicornis*, e concluíram que esta enzima é atuante no maquinário de digestão da hemoglobina. Horn et al. (2009) citam que serino carboxipeptidase e aminopeptidase podem participar na liberação de aminoácidos livres. Oleaga et al. (2015) exploraram o proteoma do intestino de *Ornithodoros erraticus* Lucas, 1849 e identificaram 15 proteínas com atividade de peptidase das classes serino, cisteína, aspártica e metalo, evidenciando a participação dessas enzimas na digestão do repasto sanguíneo.

Recentemente, Sojka et al. (2015) compararam a degradação proteolítica do soro de albumina e da hemoglobina no interior das células intestinais de *I. ricinus*, e evidenciaram diferenças e similaridades entre os processos digestórios dos componentes proteicos sanguíneos. Ambos compostos proteicos são degradados em condições ácidas por um conjunto de proteinases dos tipos cisteína e aspártica, sendo a albumina predominantemente digerida por catepsinas. A principal diferença entre os processos digestivos é a ausência do acúmulo de heme nos hemossomos na digestão da albumina (SOJKA et al., 2015). Desta maneira, atualmente compreende-se que a digestão proteica dos carrapatos é realizada por um conjunto de enzimas proteolíticas de diferentes classes de peptidases (SOJKA et al., 2015; OLEAGA et al., 2015).

Apesar da maioria dos trabalhos reportar que a digestão do repasto sanguíneo é obrigatoriamente intracelular (GRANDJEAN; AESCHILMANN, 1973; BOGIN; HADANI, 1973; GRANDJEAN, 1982; GRANDJEAN, 1984; AGBEDE; KEMP, 1985; KOH et al., 1989,1990; SONENSHINE, 1991), há indícios da possibilidade de que digestão possa iniciar no lúmen intestinal do intestino médio dos carrapatos (MIYOSHI et al., 2008; SHANBAKY et al., 2011). Miyoshi et al. (2008) caracterizaram serinos peptidases intestinais de *H. longicornis* (HISP 1, 2 e 3) com atividade ótima em pH neutro à alcalinos, que é semelhantae ao pH do lúmen intestinal dos carrapatos, sugerindo então que essas proteinases são secretadas para agirem no lúmen. Resultados semelhantes foram

observados por Alim et al. (2008) que identificaram a atividade catalítica ótima de uma legumaina intestinal de *H. longicornis* (HILgm2) em pH 7, e por Shanbaky et al. (2011) que verificaram a existência de atividade proteolítica do lúmen intestinal de *O. erraticus* após o repasto sanguíneo. Porém, esses autores sugerem a necessidade mais investigações para a melhor compreensão do processo digestivo proteolítico do repasto sanguíneo.

Embora ainda pouco conhecido, o intestino dos carrapatos possui um repertório enzimático para outros constituintes do repasto sanguíneo, como os carboidratos (MORETI et al., 2013). Moreti et al. (2013) identificaram atividade de carboidrases no intestino de *Amblyomma sculptum* (citado como *Amblyomma cajennense*), apontando quitinase, glucosaminidase e alfa-fucosidase como as principais enzimas atuantes na digestão dos carboidratos do repasto sanguíneo, que ocorreria no lúmen intestinal, diferentemente da digestão intracelular das proteínas.

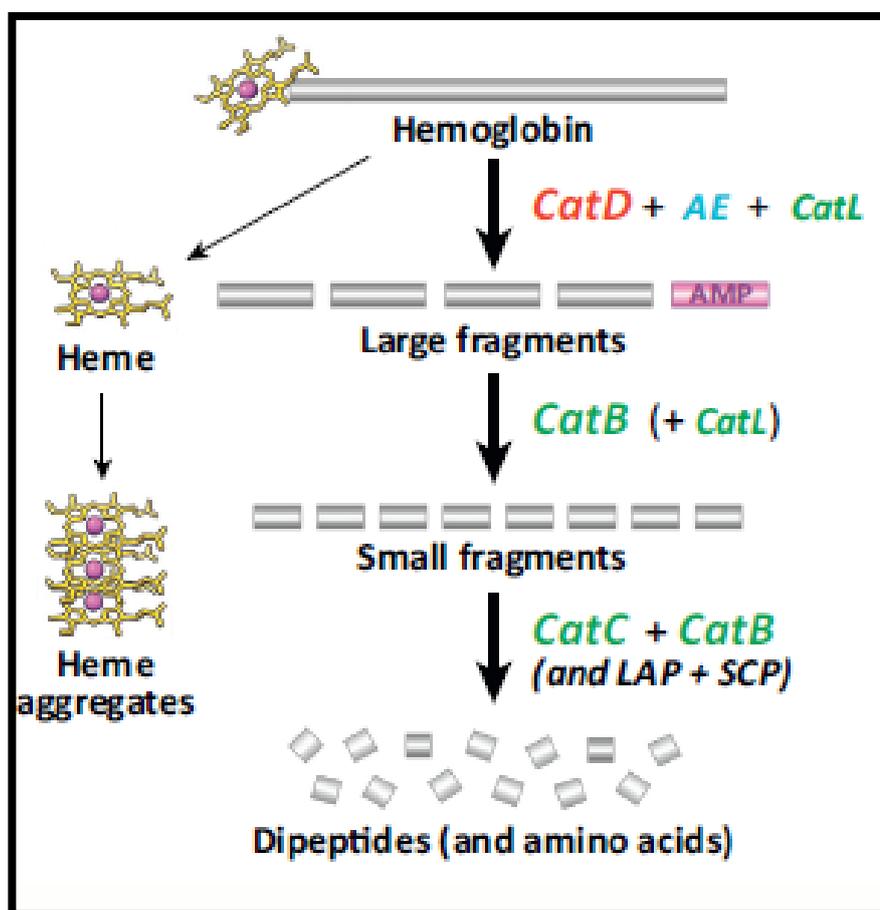


Figura 4. Esquema do maquinário digestivo da hemoglobina e a agregação do heme, proposto por Horn et al. (2009) e Sojka et al. (2013). Peptidases envolvidas na digestão, catepsinas D, B, C e L (CatD, CatB, CatL, CatC), legumainas (AE), leucina-aminopeptidase (LAP), serino carboxipeptidase (SCP). AMP representa peptídeos antimicrobianos (hemocidinas) que são derivados a partir da molécula de hemoglobina. As enzimas estão coloridas de acordo com os tipos de proteinases: vermelho = peptidases aspárticas, azul = legumainas, verde = catepsinas e preto serino e metalo peptidases. Fonte: Sojka et al. (2013).

3.6 Enzimas proteolíticas da digestão do repasto sanguíneo dos carrapatos

As enzimas proteolíticas intestinais dos carrapatos apontadas como participantes do processo digestivo da hemoglobina são pertencentes aos quatro tipos de classes de

peptidases, como serino, cisteína, aspártico e metalo (SOJKA et al., 2011, 2013). Essas são definidas pelo tipo de aminoácido que constitui o sítio ativo das enzimas (TERRA et al., 2012).

Segundo Sojka et al. (2011) a rede de proteinases digestivas dos carrapatos é baseada principalmente na ação das cisteínas peptidases, como catepsinas B, C e L e legumainas (asparaginil endopeptidase). Essas catepsinas são hidrolases lisossomais que pertencem a família das papaínas (C1), que em sua maioria são enzimas proteolíticas do tipo endopeptidase, pois clivam as regiões não-terminais das ligações peptídicas (BARRET; RAWLINGS, 1996; BARRET; MACNOLD, 1986). Enquanto que as legumainas pertencem a família C13 das cisteínas peptidases e também clivam as ligações peptídicas através da adição de água (hidrolases) (código enzimático 3.4.22.34) (BARRET; RAWLINGS, 1996).

Catepsina B (código enzimático 3.4.22.1) é o componente mais abundante no maquinário digestivo de *I. ricinus* e tem um pH ótimo de atividade catalítica entre 5,5 a 6,0 (Sojka et al., 2013). Essa proteinase foi identificada e caracterizada pela primeira vez no tecido intestinal de *I. ricinus* por Sojka et al. (2008), que a nomearam como IrCB. Segundo Horn et al. (2009) a catepsina B exerce a dupla atividade proteolítica de endopeptidase e peptidil dipetidase para gerar pequenos fragmentos de peptídeos e para remover o terminal carboxílico dos dipeptídeos.

A catepsina L (código enzimático 3.4.22.15) é uma endopeptidase lisossomal intestinal que preferencialmente cliva ligações peptídicas com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TERRA et al., 2012). Mendiola et al. (1996) descreveram a atividade de catepsina L no intestino de *R. microplus* e Renard et al. (2000) clonaram e caracterizaram essa proteinase na mesma espécie de carrapato, e verificaram que o pH ótimo de atividade da enzima proteolítica é de 5,5. Sojka et al. (2008) identificaram cDNA de catepsinas L no intestino de *I. ricinus* e o nomearam como IrCL. Sojka et al. (2013) citam que a catepsina L é o segundo maior contribuidor na formação de fragmentos da clivagem da hemoglobina.

A catepsina C é caracterizada como uma dipeptidase que nos carrapatos atua na clivagem dos fragmentos de hemoglobina em dipeptídeos (SOJKA et al., 2013). Conforme Sojka et al. (2008) essa catepsina é denominada também como uma dipeptidil dipeptidase I (código enzimático 3.4.14.1), e o seu pH ótimo de atuação é similar ao da catepsina B (HORN et al., 2009).

O outro tipo de enzima proteolítica bem conhecido por atuar no sistema digestivo dos carrapatos é o grupo de peptidase aspártica, tendo como principal representante a catepsina D. Essa enzima é uma endopeptidase (código enzimático 3.4.23.5) pertencente a família das pepsinas (A1), que tem sido encontrada somente em organismos eucariotos (RAWLINGS; BARRETT, 1993). Nos carrapatos, diversos autores já identificaram e caracterizaram a atividade desta proteinase aspártica no intestino de carrapatos, como, Bogin e Hadani (1973) no tecido intestinal de *H. excavatum*, Akov et al. (1975) em *O. tholozani*, Grandjean (1984) em *O. moubata*, Mendiola et al. (1996) em *R. microplus*, Boldbaatar et al. (2006) em *H. longicornis*, Sojka et al. (2008) em *I. ricinus* e Oleaga et al. (2015) em *O. erraticus*. Horn et al. (2009) caracterizaram a atividade proteolítica de catepsina D e verificaram que o pH ótimo de atuação dessa peptidase é 4.

As serino e metalo proteinases, como carboxipeptidases e aminopeptidases respectivamente, como já citada anteriormente, são frequentemente encontradas no trato digestivo dos carrapatos, porém os seus reais papéis na digestão ainda estão na base da especulação (ANDERSON et al., 2008; HORN et al., 2009).

3.7 Transcritoma

Transcritoma é área da genômica funcional que aborda o conjunto completo de transcritos (RNAs) de uma célula, tecido ou organismo, como RNA mensageiro (RNAm) e os RNAs não codificantes (WANG et al., 2009; MOROZOVA et al., 2009). Segundo Costa et al. (2010) os objetivos das análises transcritômicas são descobrir, identificar, caracterizar e catalogar o material gênico dos diferentes tipos de células e tecidos em diferentes condições ou estágios fisiológicos e patológicos, determinando assim o padrão de expressão gênica.

Os estudos transcritômicos buscam conhecer quantitativamente e qualitativamente os transcritos de células procariotas e eucariotas, e as suas aplicações vão desde da identificação de produtos gênicos e moléculas regulatórias de processos patológicos (como células tumorais e cancerígenas), por meio da descoberta de mutações, polimorfismos, rearranjos estruturais, mapeamento e anotação genômica; até a descoberta de potenciais moléculas de interesse biotecnológico ou farmacológico (SHENDURE; JI, 2008; OZSOLAK; MILOS, 2010; GRADA; WEINBRECHT, 2013). Pois o conhecimento sobre as moléculas expressas possibilita compreender os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares de diferentes unidades teciduais ou celulares (WANG et al., 2009).

Diversas técnicas já foram desenvolvidas para verificar a abundância de transcritos em células ou tecidos, e essas incluem desde métodos de hibridização ao sequenciamento (WANG et al., 2009). A técnica pioneira para análise de RNAs é *Northern blot*, que se caracteriza por um método que utiliza sondas radiotivas hibridizantes complementares aos transcritos de interesse para avaliar a expressão gênica (ALWINE et al., 1989). Esta abordagem científica de verificação da abundância de transcritos requer o uso de radioatividade e grandes quantidades de RNA para a análise, porém tem um rendimento menor que dos métodos mais avançados (MOROZOVA et al. 2009).

A reação de cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) também avalia expressão gênica, porém requer uma menor quantidade de RNA e tem melhor rendimento (BECKER-ANDRÉ; HAHLBROCK, 1989). A técnica baseia-se na identificação dos transcritos através da síntese de DNA complementar (cDNA) (constituído a partir da molécula de RNA pela ação da transcriptase reversa), na amplificação das múltiplas sequências por meio de primers específicos e na visualização dos fragmentos digeridos por enzimas de restrição em gel (NOONAN et al., 1990).

A técnica de microarranjo de DNA (DNA *microarray*) ou *chips* de DNA perdurou por décadas nas análises de padrão de expressão gênica, pois este método possibilitou a caracterização expressiva simultânea de milhares de transcritos conhecidos (SCHENA et al. 1995; MOROZOVA et al. 2009). O método de microarranjo avalia e identifica o perfil de expressão gênica através da hibridização de moléculas de RNA, convertidas em cDNA, à um arranjo (matriz) contendo sondas de DNA complementares aos genes de interesse (DUGGAN et al., 1999). A detecção da expressão ocorre pela incorporação de corantes fluorescentes às moléculas de cDNA durante a transcrição reversa, que são excitadas por meio de um *laser* para a emissão de fluorescência que é detectada e analisada computacionalmente (DUGGAN et al., 1999). Embora eficiente, a técnica de microarranjo apresenta algumas limitações, como a necessidade de conhecer o a sequência genômica, a hibridização cruzada e a amplitude dinâmica de detecção do próprio método (WANG et al., 2009).

Como alternativa à abordagem de hibridização de microarranjo para análise do perfil de expressão gênica, surge o sequenciamento de DNA ou RNA (DNA *sequencing* ou RNA *sequencing*), como uma metodologia mais vantajosa e de maior rendimento, pois

permite determinar diretamente a abundância dos transcritos, sem o conhecimento prévio das sequências (MOROZOVA et al. 2009).

3.8 Sequenciamento de RNA (RNA sequencing ou RNAseq)

A técnica de análise serial da expressão gênica (*Serial analysis of gene expression* – SAGE) foi a primeira alternativa em substituir o método de hidrização de microarranjo para analisar o perfil de expressão gênica (COSTA et al., 2010). Em termos gerais, essa técnica basea-se na utilização de sequências curtas de marcadores de expressão gênica (*Expressed sequence tag* – *EST* ou *tag*), que possuem as informações suficientes para identificar exclusivamente um determinado transcrito, uma vez que se isolou e determinou-se a posição definida do *tag* na sequência do fragmento de cDNA (transcrito) por meio da utilização de específicas endonucleases de restrição (VELCULESCU et al., 1995). Em seguida essas curtas sequências de marcadores de expressão de diferentes transcritos são concatenados pelas regiões terminais, clonados para amplificação e posteriormente sequenciados por sequenciadores automatizados (como o método de Sanger), permitindo assim a múltipla detecção de transcritos por reação de sequenciamento (PATINO et al., 2002). O método SAGE é um método bastante qualificado para mensurar a expressão gênica, pois não necessita do conhecimento prévio das sequências, pois, os transcritos são medidos pelo total de tags das bibliotecas, possuindo assim maior poder de detecção que os métodos de hibridização (PATINO et al., 2002). A desvantagem da técnica esta no alto custo devido ao procedimento de clonagem, e na resolução de transcritos com sequências codificantes semelhantes, no qual as *tags* não resolveram (MOROZOVA et al., 2009).

O método de sequenciamento desenvolveu-se bastante a partir da abordagem tradicional de Sanger (SANGER et al., 1977) no decorrer dos anos até os dias atuais, sendo as novas tecnologias denominadas de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing NGS*) (COSTA et al., 2010).

Segundo Metzker (2010) o método automático de sequenciamento de Sanger, que se basea na utilização dos nucleotídeos quimicamente modificados e marcados por moléculas fluorescentes (didesoxiribonucleotídeos), é considerado como a primeira geração de tecnologia de sequenciamento. A etapa inicial do método de Sanger basea-se na fragmentação do DNA, que é clonado em vetores, e posteriormente amplificados em células de bactérias ou de leveduras (SANGER et al., 1977; MOROZOVA et al., 2009). O sequenciamento ocorre em um ciclo de sequenciação (*cycle sequencing*), o qual é contemplado pelos os ciclos de desnaturação da fita molde, de emparelhamento dos *primers* à fita e de extensão da cadeia da fita nova pela inserção de nucleotídeos ou didesoxiribonucleotídeos pela polimerase (SHENDURE; JI, 2008). Cada rodada de extensão é terminada pela inserção dos nucleotídeos modificados, resultando na geração de cadeias terminadas (fragmentos). A determinação das sequências ocorre pela separação electroforética dos fragmentos em um capilar com base em gel de polímero, que são excitados por *laser* gerando a emissão dos marcadores fluorescentes, que é detectada pelo sequenciador e traduzida à base correspondente (SHENDURE; JI, 2008). Atualmente a plataforma de sequenciamento que utiliza o método de Sanger gera fragmentos de sequências de leitura (*reads*) de até 1000 bp (700-900 bp) em um rendimento de 0.3 a 0.7 Mb/h (MOROZOVA et al., 2009).

As plataformas de sequenciamento de nova geração são amplamente aplicadas aos estudos genômicos e transcritômicos, em busca de conhecer as sequências de interesse em diversos sistemas celulares e/ou teciduais. Com isso, o termo RNA-seq ou sequenciamento de RNA foi empregado aos estudos transcritômicos que pretendem revelar e catalogar os transcritos, incluindo todos os tipos RNA, por meio de métodos de

sequenciamento de alto-rendimento, denominados de plataformas de nova geração, como os sequenciadores do tipo 454, Illumina e Solid (WANG et al., 2009). As moléculas alvos dos estudos transcritômicos são os RNAs, que em etapas de preparação do material à ser sequenciado, são transformados em cDNA através da transcrição reversa e posteriormente sequenciados (WANG et al., 2009).

As plataformas de segunda e terceira geração (como 454, *Illumina*, *Solid*, *Torrent*, *PacBio* e *Nanopore*) tem como principais vantagens ao sistema tradicional de Sanger as seguintes características: a substituição da clonagem *in vivo* pela amplificação via PCR, o sequenciamento em paralelo através de várias sínteses, a obtenção de *reads* de menor comprimento (40-250 bp) e o alto ou ultra rendimento que gera mais dados em menor tempo e custo (MOROZOVA et al., 2009; COSTA et al., 2010; MCGETTIGAN, 2013). Segundo Mardis (2008) os sequenciadores de nova geração podem levar de 8 horas a 10 dias para realizarem as corridas dependendo da plataforma, e a leitura das sequências podem ser do tipo *single* ou *paired ends*. O modo de sequenciamento do tipo *single ends* significa que somente um dos sentidos das fitas sequenciais é lida, enquanto que em *paired ends* os dois sentidos são sequenciados (MARDIS, 2008; MOROZOVA et al., 2009).

Em termos gerais os métodos de *NGS* para análise de transcrito têm as seguintes etapas: isolamento do RNA, preparação das amostras através da fragmentação, conversão de RNA em cDNA e adição dos adaptadores, amplificação das fitas moldes, sequenciamento e análise dos dados sequenciados (HEAD et al., 2014). As diferentes plataformas de sequenciamento de nova geração diferenciam-se principalmente no modo de amplificação e no método químico de leitura para obter as sequências de nucleotídeos das amostras (COSTA et al., 2010).

Nas plataformas comerciais de segunda geração, 454 e Solid, a amplificação por PCR ocorre em microesferas reatoras coberta por óleo de emulsão, que isolam e separam os *templates* ou fragmentos de cDNA em micropoços para a realização das cópias e sequenciamento (MARDIS, 2008; MOROZOVA et al., 2009). Enquanto que em Illumina, a geração das cópias é realizada em ponte (*bridge amplification*) na membrana sólida de amplificação dotada de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores dos dois sentidos das fitas moldes que esta fixada (MARDIS, 2008; MOROZOVA et al., 2009; METZER, 2010). As plataformas de terceira geração (*Helicos* e *Pacific Biosciences*) não necessitam da etapa de amplificação de geração de cópias e realizam o sequenciamento direto de uma única fita de DNA (MOROZOVA et al., 2009).

As plataformas de sequenciamento de nova geração utilizam diferentes métodos para a detecção química das sequências de DNA. Por exemplo, no sistema 454-Roche o sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo de nucleotídeo (A, C, G e T) é adicionado a reação (CARVALHO; SILVA, 2010). O método da 454 utilizado para leitura das sequências é o pirosequenciamento, que consiste em uma combinação de reações enzimáticas que transformam as moléculas de pirofosfato (PPi), liberado pela incorporação dos desoxinucleotídeos de cada ciclo na extensão da cadeia, em ATP, que é consumido pela luciferase para oxidar a luciferina, gerando uma emissão de luz que é captada por uma câmera acoplada ao sistema, e a intensidade do sinal luminoso corresponde a quantidade de nucleotídeo incorporado na reação (RONAGHI, 2001).

A plataforma Solid utiliza o sistema de ligação para determinar a sequências de nucleotídeos, no qual o sequenciamento é catalisado por uma DNA ligase, ao invés de uma DNA polimerase (CARVALHO; SILVA 2010). O sequenciamento ocorre pela hibridização de um conjunto de sondas fluorescentes aos fragmentos alvos iniciado pelos *primers* universais de n , $n-1$, $n-2$, $n-3$ e $n-4$ bases em cinco distintas etapas. Na etapa inicial o primeiro *primer* (n) universal liga-se a extremidade do adaptador do

fragmento alvo e libera a primeira base da sequência alvo para a hibridização da sonda complementar. Essa sonda é então ligada ao primer pela DNA ligase e a ligação gera a clivagem do fluoróforo que causa uma fluorescência, e deixa exposto o grupo 5' fosfato da sonda para subseqüentes ligações de outras sondas complementares. Suscessivos ciclos são realizados até cobertura total da sequência alvo e a cada sinal de fluorescência dos dinucleotídeos das sondas ocorre a decodificação dos sinais de leitura em uma combinação de dados já determinada (CARVALHO; SILVA, 2010). Na próxima etapa, ocorre inicialmente a desnaturação dos fragmentos sintetizados e em seguida a adição do segundo *primer* de tamanho $n - 1$, que ao alinhar-se ao adaptador com a sequência alvo deixará a última base no sentido 3' do mesmo livre para o sequenciamento. E como a sequência do adaptador é conhecida pode-se determinar a identificação correta da primeira base da sequência alvo. Novos ciclos ocorrem novamente com novas hibridização das sondas, ligações e detecções de fluorescência, e o sequenciamento é completado nas cinco etapas para que toda a sequência alvo seja lida. A decodificação dos sinais de leitura é baseada na fluorescência específica dos dinucleotídeos, cuja as possíveis combinações de cores são conhecidas e determinadas (METZER, 2010, CARVALHO; SILVA, 2010).

Outro exemplo de sistema de leitura de sequências é o método Illumina, que também ocorre em sucessivos ciclos de anelação, extensão, síntese e desnaturação para a formação de conjuntos (*clusters*) de sequenciamento (METZER, 2010). O sequenciamento propriamente dito para a identificação das sequências, é realizada pela utilização de nucleotídeos reversíveis marcados com fluóforos e pela detecção destes na incorporação em cada ciclo de síntese através da excitação de compostos fluorescentes presentes nos nucleotídeos, que gera uma luminosidade captada um por um aparelho de imagem, gerando várias imagens a cada incorporação dos nucleotídeos (MARDIS, 2008).

O alto ou ultra rendimento das plataformas NGS é correspondente ao grande número de dados gerados por corrida, cerca de *mega* ou *gigabytes*. A plataforma 454 pode gerar em cada corrida cerca de 100 a 600 *megabytes* de *reads* de até 250 pb, enquanto que os sistemas Solid e Illumina alcançam os números de *gigabytes* (1 a 5) por corrida, com *reads* de tamanho menor (35 – 40 bases) (ROTHBERG; LEAMON, 2008). Desta maneira, os números de dados gerados nos sequenciadores de nova geração são enormes, e é necessário um aporte computacional adequado para a análise dos dados.

3.9 Bioinformática: análise e montagem (*assembly*)

A bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos provenientes dos diferentes métodos de investigação e de pesquisa. Esta área pode ser compreendida como uma modalidade que cobre todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. A bioinformática utiliza da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, da estatística e da ciência da computação em diversas ferramentea que auxiliam a compreender o significado biológico representado nos dados genômicos ou transcritômicos.

O resultado dos sequenciadores de nova geração é o grande número de dados de sequências, que serão avaliados por métodos e ferramentas computacionais. Métodos esses que buscam triar os dados brutos do sequenciamento e posteriormente montar o transcrito, através da sobreposição dos fragmentos de leitura sequenciados (*reads*) (WANG et al., 2009).

O processo de triagem ou análise de qualidade visa qualificar o conjunto de dados sequenciados para a etapa de montagem, através da remoção de adaptadores utilizados no sequenciamento, de sequências de baixa qualidade, de sequências de curto tamanho (20

bp), de duplicações de amplificação e de RNA ribossômico (rRNA) (MARTIN; WANG, 2011). A triagem é necessária, pois embora sejam técnicas qualificadas e de alto-rendimento, os sequenciadores *NGS* podem gerar artefatos de sequenciamento, devido a erros de leitura das sequências (MOROZOVA et al. 2009).

Após a etapa de processamento dos dados sequenciados, segue-se para o processo de montagem, que consiste na reconstrução da sequência original através do alinhamento e da sobreposição dos *reads*, realizado por *softwares* e programas específicos, como *CAP3*, *Oases*, *Trinity*, *AbySS* e *SOAPdenovo* (MILLER et al., 2010). As sequências montadas consistem em alinhamento múltiplo de sequências de *reads* em consenso de sequências contínuas, que são denominados de *contigs* (MILLER et al., 2010).

Há dois tipos de estratégias de montagem do genoma, que se baseiam na disponibilidade ou não de um genoma de referência (COSTA et al., 2010). Na montagem baseada em um genoma referência ou guiado por genoma, os *reads* são alinhados à referência genômica por meio de programas alinhadores e montados pela sobreposição e clusterização dos mesmos para a formação dos *contigs* (MARTIN; WANG, 2011). Quando não há genoma de referência, a estratégia de montagem é a *de novo*, que consiste na verificação das redundâncias dos *reads* para encontrar a sobreposição entre os mesmos e montá-los (MARTIN; WANG, 2011).

Com os possíveis transcritos montados, a próxima etapa da análise transcritômica é identificar e anotar os transcritos com base no alinhamento e comparação dos mesmos com sequências depositadas nos bancos de dados, como *NCBI*, *Uniprot*, *Swiss-prot* e demais bancos, em busca de identificar a importância biológica dos candidatos a genes (STEIN, 2001). A anotação gênica busca detectar nos possíveis quadros abertos de leitura (*Open Reading frames*) dos transcritos, regiões ou porções sequenciais gênicas que possam deduzir e identificar os possíveis genes por meio do mapeamento, da comparação e similaridade desses com sequências de regiões conhecidas, realizando assim uma predição gênica baseada na similaridade (STEIN, 2001).

A ferramenta de busca automatizada *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) é frequentemente utilizada para identificar os possíveis genes obtidos de estudo transcritômicos ou genômicos. Essa ferramenta consiste no alinhamento local de sequências para observar o nível de identidade, e utiliza um conjunto de algoritmos para comparar e medir a similaridade entre as sequências para explorar toda a informação contida nas bases de dados de DNA e proteínas (ALTSCHUL et al., 1990).

Com base no grau de similaridade entre as sequências de interesse e as sequências dos bancos de dados, pode-se atribuir ao alvo de interesse as informações dos bancos de dados, e esta etapa consiste na anotação genômica ou predição de genes (GÖTZ et al., 2008). A similaridade é um dos principais atributos utilizados para inferir a predição de função gênica das sequências de interesse (EISEN, 1998). O processo de anotação atribui funções e identifica padrões nas sequências de DNA obtidas do sequenciamento, que estão contidos nos diferentes arranjos sequenciais, permitindo assim a categorização dos genes em determinadas classes funcionais (CONESA et al., 2005).

3.10 Transcritoma de carrapatos

A maior parte dos estudos transcritômicos de carrapatos elege como órgão de interesse as glândulas salivares, já que estas são vitais para a sobrevivência desses hematófagos.

Segundo Sonenshine (1991) o sucesso do repasto sanguíneo dos carrapatos e de outros artrópodes hematófagos, está diretamente relacionado aos componentes contidos na saliva, e o órgão responsável pela secreção e excreção dessa saliva são as glândulas

salivares. Essas estão localizadas na porção anterolateral da cavidade corporal e estendem-se até terceiro par de coxas (ROSHDY, 1962). Em Argasidae, as glândulas salivares são compostas por dois tipos de ácidos, denominados de A e B (BOWMAN; SAUER, 2004). Enquanto que na família Ixodidae, as fêmeas possuem três tipos de ácidos, sendo um agranular (ácido Tipo I) e dois granulares (Tipo II e III), os machos possuem quatro tipos (um agranular e três granulares).

Segundo Kaufman (2010), a principal função das glândulas salivares nos carrapatos é secretar um coquetel farmacológico, que facilite o fluxo sanguíneo na lesão ocasionada pela picada. A saliva do carrapato possui potentes componentes anticoagulantes, antiplaquetários e anestésicos, que auxiliam o ectoparasito a burlar o sistema imune do hospedeiro durante o repasto sanguíneo (SAUER et al., 2000; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Ribeiro et al. (1991) e Karczewski et al. (1995) evidenciaram substâncias na saliva de argasídeos que evitam a agregação de plaquetas (apirase) e inibem a coagulação (TAI= Tick Adhesion Inhibitor), respectivamente. Outro exemplo recente, foi a descoberta que a saliva do carrapato *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (citado como *Amblyomma cajennense*) contém um potente combatente contra células cancerígenas (SIMONS et al., 2011). Além disso, a saliva é também a principal rota de transmissão dos agentes patogênicos para os hospedeiros vertebrados (BOWMAN et al., 1997). Desta maneira, conhecer as substâncias secretadas pela glândula salivar dos carrapatos tornou-se alvo de diversos estudos transcritômicos, proteômicos e bioquímicos.

O advento de técnicas de biologia molecular e de ferramentas de bioinformática permitiu a viabilidade da busca e da descoberta dos constituintes salivares, através do isolamento do material genético (DNA ou RNA) e sequenciamento do repertório de cDNA (DNA complementar) das glândulas salivares de diferentes espécies (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003; VALENZUELA, 2004). Segundo Valenzuela (2004) a identificação dessas moléculas contribui para a compreensão do papel da saliva no repasto sanguíneo e na transmissão de patógenos, além de fornecer informações de potenciais candidatos para a elaboração de vacinas ou drogas para controle dos carrapatos.

Diversas espécies de carrapatos já tiveram os transcritomas das glândulas salivares e/ou da saliva (*sialometranscriptome* ou *sialotranscritomas*) revelados, como *Dermacentor andersoni* Stiles, 1908 (BIOR et al., 2002; ALARCON-CHAIDEZ et al., 2007), *Ixodes scapularis* Say, 1821 (VALENZUELA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2006), *Ixodes pacificus* Cooley & Kohls, 1943 (FRANCISCHETTI et al., 2005), *I. ricinus* (CHMELAR et al., 2008; SCHWARZ et al., 2013, 2014; KOTSYFAKIS et al., 2015a), *Amblyomma americanum* (Linneaus, 1758) (BIOR et al., 2002; ALJAMALI et al., 2009), *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) (NENE et al., 2002; RIBEIRO et al., 2011), *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (KARIM et al., 2011), *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (GARCIA et al., 2014), *Amblyomma sculptum* (= *Amblyomma cajennense*) (BATISTA et al., 2008; GARCIA et al., 2014), *Amblyomma triste* Koch, 1844 (GARCIA et al., 2014), *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901 (NENE et al., 2004), *Rhipicephalus haemaphysaloides* (Supino, 1897) (YU et al., 2015), *R. (B.) microplus* (SANTOS et al., 2006), *Rhipicephalus sanguineus* (ANTRIELLO et al., 2010), *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (FRANCISCHETTI et al., 2011), *Antricola delacruzi* Estrada-Pena, Barros-Battesti & Venzal, 2004 (RIBEIRO et al., 2012), *Argas monolakensis* Schwan, Corwin & Brown, 1992 (MANS et al., 2008), *Ornithodoros coriaceus* Koch, 1844 (FRANCISCHETTI et al., 2008a) e *Ornithodoros parkeri* Cooley, 1936 (FRANCISCHETTI et al., 2008b). Os sialotranscritomas de carrapatos têm como principal alvo as proteínas secretadas, embora elucidem todo o material expressivo nas condições estudadas, como alimentado e não alimentado ou infectado e não infectado.

Porém, as proteínas secretadas são identificadas por algoritmos que identificam o peptídeo sinal de participação em via secretória. Detalhadamente elas são estudadas com a finalidade de reconhecer, compreender e elucidar suas participações e funções na relação carrapato-hospedeiro (VALENZUELA, 2004).

Outro órgão de interesse é o intestino dos carrapatos, principalmente o intestino médio. A função do intestino é digerir os componentes do repasto sanguíneo e absorver os nutrientes provenientes da digestão do sangue ingerido, além de designar os constituintes nutritivos para os processos biológicos dos outros órgãos (SONENSHINE, 1991). Além disso, o intestino médio pode albergar e participar da rota de transmissão de organismos patogênicos transmitidos por carrapatos (SONENSHINE, 1991).

Porém, mesmo com todo o conhecimento atual da literatura sobre os constituintes do intestino, pouco se sabe verdadeiramente sobre o papel e atuação dos transcritos intestinais dos carrapatos (ANDERSON et al., 2008; DÍAZ-MARTIN et al. 2015). Exemplo disso são os escassos trabalhos transcritômicos do tecido intestinal desses artrópodes. Anderson et al (2008) exploraram os genes do trato digestivo de *D. variabilis* (Say, 1821) e identificaram 82 transcritos diretamente envolvidos no processo de digestão do repasto sanguíneo. Heekin et al. (2013a) realizaram um estudo transcritômico do intestino de fêmeas de *R. microplus*, comparando o perfil de expressão de alguns genes entre espécimes infectados com *Babesia bovis* e em espécimes livres de infecção. Schwarz et al. (2014) exploraram o transcriptoma e proteômica do intestino médio e glândula salivar de *I. ricinus*, e observaram que há poucos genes expressos exclusivamente no intestino (217) ou na glândula salivar (110), sendo os transcritos intestinais proteínas metabólicas. Kotyfkakis et al. (2015a) também analisaram o transcriptoma intestinal de ninfas e adultos de *I. ricinus*, e identificaram diversas enzimas associadas com a digestão de proteínas, carboidratos e lipídios, transportadores-canais associados com a absorção de nutrientes, e transcritos associados com a imunidade. Recentemente Xu et al. (2016) exploraram o transcriptoma do intestino de *Haemaphysalis flava* Neumann 1897 e identificaram um grande número de transcritos associados a processos de metabólicos, sugerindo que esses estariam envolvidos na digestão do repasto sanguíneo e os categorizou em 8 categorias, como peptidase, inibidor de peptidase, fosfolipase, digestão de carboidratos, metabolismo de lipídio, proteínas relacionadas a imunidade, metabolismo de heme e proteínas secretadas.

Miranda-Santos et al. (2004) elucidaram o transcriptoma do ovário e da hemolinfa de fêmeas e machos de *R. (B.) microplus* por meio da técnica de *expressed sequence tags* (EST), e identificaram 588 e 157 sequências teciduais específicas, respectivamente. Heekin et al. (2013b) verificaram a reação do transcriptoma ovariano de *R. microplus* em resposta a infecção por *Babesia bovis*, utilizando diversas estratégias de análise transcriptoma como *microarray*, qRT-PCR e SAGE. Nestas análises os autores observaram pela técnica de *microarray* e SAGE, 15 e 41 transcritos ovarianos diferentemente expressos nos espécimes infectados, respectivamente. Kotsyfakis et al. (2015b) realizaram uma análise transcritômica completa dos hemócitos de fêmeas de *I. ricinus* e identificaram 327 sequências codificadoras significativamente sobreexpressas na biblioteca de transcritos de hemócitos.

Desta maneira, é notável que mais estudos transcritômicos são necessários, principalmente com os tecidos intestinais e reprodutivos dos carrapatos, para um melhor entendimento da atuação dos transcritos ou proteínas nos processos fisiológicos e biológicos dos carrapatos.

3.11 Inferência filogenética

Em busca de compreender a relação de parentesco entre as espécies e as suas histórias evolutivas surge a filogenia (AMORIM, 2002). Conforme Henning (1965) o objetivo da inferência filogenética é descobrir o apropriado grau de relação filogenética dentro de um determinado grupo de organismos, como base nas suas semelhanças e diferenças.

O nível de relação filogenética existente entre os organismos é representado em uma árvore filogenética ou dendograma, que é um diagrama ramificado que conecta as espécies e seus ancestrais (HENNIG, 1965; AMORIM, 2002). As árvores filogenéticas são compostas de elementos terminais e intermediários, que podem ser táxons, genes ou proteínas, cujas as conexões podem indicar proximidade genealógica, ou seja, uma ancestralidade comum exclusiva (AMORIM, 2002). Os organismos que apresentam um maior grau de relação filogenética são denominados de monofilético ou grupo monofilético, pois eles compartilham de caracteres e de uma ancestralidade comum (HENNIG, 1965; AMORIM, 2002).

A inferência filogenética empregada para demonstrar a relação entre os organismos que desvenda uma história evolucionária, pode ser também uma útil ferramenta para prever a função genômica de sequências (genes ou proteínas) de interesse através da comparação entre genomas (EISEN, 1998). Neste caso, utiliza-se a homologia entre genes ou proteínas para prever e atribuir a função dos genes/proteínas conhecidos para a sequência alvo de função desconhecida (SJÖLANDER, 2004). A homologia é uma estreita relação caracterizada pelo compartilhamento de um ancestral comum entre as espécies (ou a nível molecular entre sequências gênicas ou proteínas) (AMORIM, 2002).

Segundo Eisen (1998) genes compartilhados entre as espécies podem ter dois tipos de origem, ou por convergência (similaridade) ou por descendência com modificação a partir de um ancestral comum (homologia), sendo esse último uma estreita relação frequentemente utilizada para inferência funcional dos genes. Eisen e Wu (2002) afirmam que a homologia encontrada entre genes cuja a função é conhecida, e sequências sem função definida, pode ser usada para atribuir a função gênica, porém é necessário a verificação de alguns fatores, como a significância biológica da similaridade e o tipo de relação de parentesco (homologia) entre as sequências de interesse. Essa relação de parentesco entre os genes pode ser de dois tipos, ortólogo ou parólogo (EISEN; WU, 2002).

Genes ortólogos são originados de um único gene do último ancestral comum das espécies que sofreram especiação, esses genes conversam, geralmente, o papel biológico, enquanto que parólogos são genes evoluídos a partir da duplicação gênica e podem, provavelmente, apresentar nova função (GABALDÓN; KOONIN, 2013). Quando um gene de função desconhecida forma uma relação ortóloga com um gene de função conhecida em uma topologia filogenética, pode-se atribuir a sequência desconhecida a função gênica conhecida, devido a estreita relação entre as sequências, uma vez que os genes ortólogos formam clados monofiléticos e geralmente conservam a função (EISEN; WU, 2002; GABALDÓN; KOONIN, 2013).

Porém, alguns vieses ou erros na inferência funcional pela análise filogenética devem ser analisados antes de determinar a atribuição, como a duplicação gênica que gera modificação funcional e estrutural na sequência, o emparelhamento de domínios similares que pode resultar em similaridade de regiões de sequências sem compartilhamento de função, o nível de identidade entre as sequências que não deve ser menor do que 25%, a significância da relação de parentesco ou filogenético e a distância evolutiva entre as sequências (SJÖLANDER, 2004; BROWN; SJÖLANDER, 2006).

A inferência funcional baseada na relação filogenética é constituída nas seguintes etapas: a busca e identificação de genes ou proteínas homólogas, o alinhamento múltiplo das sequências homólogas, análise e edição do alinhamento para aperfeiçoar a sua acurácia, construção da árvore filogenética pelos métodos de inferência, a identificação das relações de parentesco fortemente suportados, a adição de dados experimentais, a diferenciação entre ortólogo e parálogo e a inferência da função molecular (EISEN, 1998; SJÖLANDER, 2004). O alinhamento é uma etapa fundamental na inferência funcional por filogenia, pois é a partir dele que será construído a relação filogenética das sequências homólogas, portanto a edição do alinhamento visa maximizar a similaridade em busca da identificação de regiões conservados entre as sequencias que apresentem uma significância biológica para as mesmas, além da remoção das regiões não similares (SJÖLANDER, 2004). Desta maneira, a filogenia de sequências gênicas é mais uma abordagem auxiliar para a atribuição funcional, porém é necessário levar alguns aspectos relevantes na análise e na atribuição.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos carrapatos

Os carrapatos utilizados no presente estudo foram provenientes da colônia de *O. mimon* mantida no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. A colônia iniciou em 2008, a partir da coleta de espécimes vivos em uma residência do município de Araraquara, cujos moradores apresentavam lesões decorrentes das picadas.

4.2 Colônia de *Ornithodoros mimon*

A espécie *O. mimon* é mantida e criada em laboratório para subsidiar o presente estudo, fornecendo fêmeas da espécie de estudo para dissecação dos espécimes e colheita dos órgãos. Os carrapatos fêmeas, provenientes da mesma geração, foram alimentados em coelhos da raça Nova Zelândia com idade entre 60 a 120 dias e peso entre 1,5 a 2,5 kg. A alimentação das fêmeas ocorreu em um tempo de alimentação entre 20 a 60 minutos. A utilização dos coelhos para alimentação dos carrapatos foi permitida e concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob o seguinte protocolo 925/12.

4.3 Dissecação dos carrapatos e extração dos órgãos

Sessenta fêmeas de *O. mimon* alimentadas foram dissecadas para a coleta da amostra intestinal. Após a alimentação as fêmeas foram abertas e os órgãos foram extraídos em dois períodos pós-alimentar, 24h e 48h pós-alimentação. O procedimento foi adotado para evitar que os genes a serem expressos em determinado tempo de atividade do órgão pudessem estar ocultos se as amostras fossem colhidas em um único período de tempo pós-alimentar.

As fêmeas ingurgitadas foram fixadas com alfinetes entomológicos de ventre para cima em Placas de Petri contendo parafina. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina e tesoura cirúrgica, o idiossoma foi cortado ao longo da região posterior até as margens laterais, abrindo assim uma fissura em toda a sua circunferência. A face ventral do idiossoma foi separada da dorsal, expondo todos os órgãos, principalmente o intestino (Figura 5). Durante o processo de dissecação utilizou-se uma solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4 para limpeza, hidratação e visualização dos órgãos, seguindo as orientações de Edwards et al. (2009), na qual adaptamos o procedimento de dissecação para uma espécie de carrapato argasídeo, uma vez que as orientações de Edwards et al. (2009) são referentes a ixodídeos. As amostras intestinais foram sucessivamente lavadas em PBS (pH 7,4) para retirar o excesso de sangue do hospedeiro.

O tecido intestinal foi imediatamente retirado e armazenado em gelo, em criotubos contendo RNAlater® *Tissue Collection: RNA Stabilization Solution* (Ambion), uma solução aquosa que permite o armazenamento de amostras de forma estável para a utilização do RNA, evitando assim a degradação do material. Utilizou-se 600 µl de RNAlater para submergir a amostra intestinal nos tubos. Os tubos foram em seguida acondicionados na geladeira pelo período de 24 horas. Após esse período, o excesso de RNAlater® foi retirado com o auxílio de pipeta e a amostra foi estocada e armazenada à -80°C, onde permaneceram até o uso.

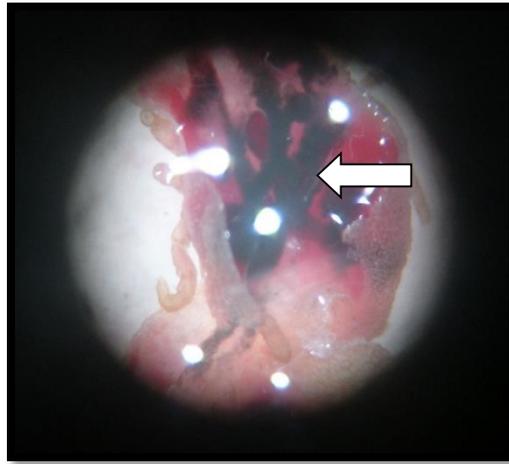


Figura 5. Fêmea de *Ornithodoros mimon* dissecada, expondo os órgãos internos do carrapato. A visualização foi realizada em microscópio estereoscópico da marca Nikon SMZ 745T. Em destaque o intestino, indicado pela seta branca.

4.4 Purificação do RNA mensageiro (mRNA)

A extração do mRNA da amostra do intestino foi feita diretamente a partir do tecido dissecado e descongelado, usando-se o kit *Dynabeads* mRNA DIRECT (Invitrogen), de acordo com os dados do fabricante. Brevemente, o tecido foi lisado através de maceração com pistilos, à 4 °C, e foi incubado com *beads* magnéticas ligadas a oligo (dT). Após esta etapa, as *beads* foram isoladas com o auxílio de uma estante magnética e lavadas sucessivamente. O mRNA foi então eluído em solução de 10ml de Tris-HCl (pH 7,5) através de aquecimento à 80 °C, obtendo assim o material ribonucleico isolado e purificado.

4.5 Quantificação do mRNA

O mRNA do intestino foi quantificado através do uso de ligantes fluorescentes. Utilizou-se o kit Quant-iT RiboGreen RNA Reagent (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante. Basicamente, o mRNA extraído, bem como as amostras de RNA de massa conhecida (fornecidas junto com o kit), foram ligados a um corante fluorescente e submetidos à espectrometria. A massa de mRNA foi deduzida a partir de comparação com dados obtidos para as amostras de massa padrão.

4.6 Sequenciamento

Após purificação, o material foi sequenciado por pirosequenciamento na plataforma 454 GS-Junior (Roche) do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan pelas funcionárias e técnicas, Úrsula Castro Oliveira e Mariana Salgado Morone. Em linhas gerais, o sequenciamento ocorreu da seguinte forma (Figura 6): O mRNA foi mecanicamente fragmentado em tamanhos compatíveis com a metodologia (300 a 800 pb), e em seguida, foi feita uma retrotranscrição para cDNA e a ligação a adaptadores às extremidades das fitas. As *beads* ligadas às sequências de DNA complementares aos adaptadores foram incubadas, e uma emulsificação com óleo foi produzida, para isolar as *beads* entre si. Em seguida realizou-se uma PCR com o material emulsificado, e, depois de uma série de lavagens, o material foi montado em placa com

micropoços, nos quais também foram depositados reagentes necessários para o sequenciamento. Esse foi realizado em ciclos, e em cada ciclo um determinado nucleotídeo (adenina, citosina, guanina e timina) foi adicionado à síntese da reação. Assim, a cada incorporação de nucleotídeo, um sinal de luz foi produzido por reações enzimáticas devido a conversão do pirofosfato (PPi), liberado na incorporação, em ATP pela ATP sulfúrilase, que por sua vez fornece energia para a luciferase oxidar o composto luciferina e gerar o sinal luminoso. A intensidade do sinal, portanto, é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados na molécula sintetizada, identificando assim o nucleotídeo e sua proporção (quantidade) na síntese do ácido nucleico.

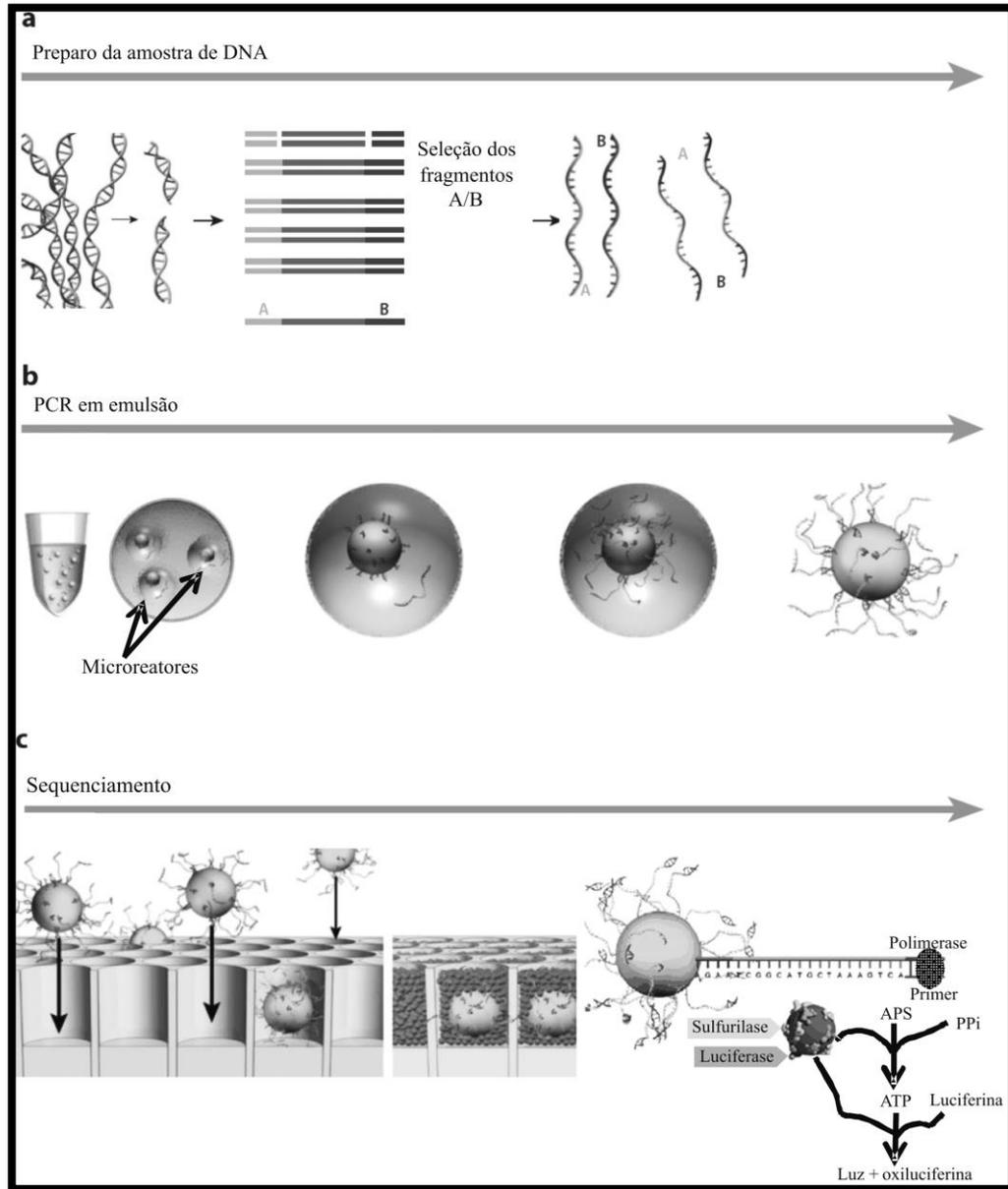


Figura 6. Dinâmica ilustrativa do sequenciamento na plataforma 454. Resumidamente o sequenciamento é dividido em três fases: **(a)** preparo amostra, **(b)** PCR em emulsão e **(c)** Sequenciamento. **(a)** O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em suas extremidades. **(b)** os fragmentos com os adaptadores são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento com seqüências curtas complementares presentes na superfície da microesfera. Apenas um único tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. As microesferas são envolvidas individualmente por gotículas oleosas, nas quais ocorrem a PCR em emulsão. Milhares de cópias do fragmento alvo são produzidas na amplificação. **(c)** as

microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. São fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento, e o sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada, em cada poço de sequenciamento. Fonte: CARVALHO; SILVA, 2010).

4.7 Bioinformática

As possíveis sequências foram montadas usando o programa software *CLC-Genomics* (CLCBio). Inicialmente as sequências passaram por um processo de filtragem para eliminar aquelas de baixa qualidade, de pequeno tamanho (menores que 40 pb) e as sequências ribossomais. Para tanto, criou-se um banco de dados composto por sequências de rRNAs de membros da subclasse Acari, a partir de dados disponíveis no *GenBank*. Em seguida, as sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados de rRNA de Acari, removendo-se aquelas que apresentaram similaridade, que foram denominadas como contaminantes. As sequências de baixa qualidade e pequeno tamanho foram removidas através da filtragem de análise padrão do programa. A montagem *de novo* dos *contigs* (consenso de sequências contínuas) foi realizada utilizando-se as sequências filtradas e os parâmetros padrões de montagem do *CLC-Genomics*.

Os *contigs* representam o consenso do agrupamento das sequências (clusterização) através da sobreposição de regiões do transcrito. Todos os procedimentos de análise no *CLC-genomics* foi realizado baseando-se nos parâmetros de análise padrão do *software*. As sequências descartadas nas análises foram armazenadas em um compartimento do programa. Os *contigs* foram nomeados dos pela designação *Contig* mais um número de identificação que representa a ordem de montagem que o programa montou as sequências consensos, por exemplo, *Contig1*.

Os *contigs* obtidos foram então analisados e comparados com o banco de dado nr (não redundante) do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se as ferramentas informáticas de busca automatizada BLAST (BLASTX) conforme Altschul et al. (1990, 1997) e BLAST2GO (sigla: B2G) com os parâmetros padrões conforme Conesa et al. (2005) (e-value 10^{-6}). Outros bancos de dados, como *UniprotKB* (*UniProt Knowledgebase*), *MGI* (*Mouse Genome Informatics*), *ZFIN* (*The Zebrafish Model Organism Database*) *RGD* (*Rat Genome Database*) e *GO* (*Gene Ontology Consortium*), também foram usados na busca do BLAST.

As ferramentas BLASTS permitiram a busca de sequências similares ao conjunto de sequências de interesse, através de uma análise de similaridade com os bancos de dados públicos. A anotação funcional automatizada das sequências obtidas foi constituída em três principais passos: busca por analogia (BLAST), mapeamento para coletar os termos da GO associados com os BLAST hits e anotação propriamente dita, que atribui a informação às sequências alvos, conforme indicado por Conesa e Götz (2008).

A previsão de sublocalização celular dos transcritos foi também realizada usando o software B2G, que utiliza os algoritmos SignalP para identificar a presença do peptídeo sinal (NIELSEN et al., 1997), e TMHMM para verificar os transcritos de região de transmembrana (KROGH et al., 2001).

Os domínios proteicos conservados das proteínas foram obtidos através da ferramenta de busca *Conserved Domains Within a protein or nucleotide coding sequence* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Os transcritos de peptidases foram classificados e blastados de acordo com o banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/merops/advanced>), para identificar o tipo de classe catalítica conforme Rawlings e Barret (1993). Utilizou-se o método de RPKM (*Reads per kilobase transcript per million reads*) para medir e comparar o nível

de expressão entre os transcritos intestinais, pois esse método quantifica a expressão gênica partir de dados de sequenciamento de mRNA, através da normalização do comprimento total e pelo número de *reads*, segundo Mortazavi et al. (2008).

Após a busca automatizada, todos os *contigs* foram analisados manualmente e reagrupados dentro de categorias conforme as funções e processos biológicos que tenham sido atribuídos a eles.

4.8 Submissão da corrida de sequenciamento e dos transcritos de *O. mimon* ao banco de dados

A corrida de sequenciamento obtida no presente estudo foi depositada no *Sequence Read Archives* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob os números do projeto biológico (*bioproject number*) PRJNA310605, amostra biológica (*biosample*) SAMN04452891 e corrida (SRA) SRR3146437.

Dois mil e duzentos e treze (2213) transcritos (*contigs*) de *O. mimon* foram submetidos ao portal *Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database* (TSA) do NCBI para depósito das sequências. TSA é um arquivo computacional de armazenamento de sequências montadas obtidas a partir de sequenciamento de nova geração. Após o processo de análise do NCBI, cada *contig* de *O. mimon* depositado recebeu um número de acesso de GEIB1000001.1 a GEIB1002213.1. As sequências depositadas estão também disponíveis nos bancos de dados DDBJ (*DNA Data Base Japan*) e ENA (*European Nucleotide Archive*). Vinte e três sequências (22) de *O. mimon* não passaram no processo de submissão e não foram depositadas.

4.9 Análise filogenética de peptidases

Um conjunto de sequências de peptidases de metazoários obtidas a partir de bancos de dados públicos e do nosso transcriptoma de *O. mimon*, totalizando em 287 sequências de peptidases, foi utilizado para a análise filogenética. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo algoritmo de alinhamento MAFT, utilizando os parâmetros padrões conforme Katoh et al., 2005. O software IQTree v1.3.1081 foi utilizado para a máxima verossimilhança (MV) (maximum likelihood) inferência, com a opção de testar o melhor modelo de evolução de proteína, selecionando o modelo adequado para inferir a árvore de MV (NGUYEN et al., 2015). O suporte de ramo da árvore foi obtido pelo método de bootstrap em 1000 ciclos. A árvore foi visualizada e editada no software FigTree v.1.4.1 e método de enraizamento foi o *midpoint*, que enraíza a árvore a partir do maior ramo da árvore.

4.10 Análise filogenética de carrapatos a partir de dados de transcritos

Buscou-se no banco de dados públicos do NCBI sequências de transcritos de espécies de carrapatos provenientes de diferentes recursos sequências, como proteínas, nucleotídeos e ESTs. No total obteve-se e selecionou-se 267.488 sequências de transcritos de 20 espécies de carrapatos e 1 uma espécie de ácaro, *Metasieculus occidentalis*, que serviu de grupo externo nas inferências filogenéticas. Essas múltiplas sequências somadas às sequências do transcriptoma de *O. mimon* constituíram os conjuntos de transcritos de carrapatos, que serviram de arquivo de entrada para o software Get Homologues (CONTRERAS-MOREIRA; VINUESA, 2013). Esse software identifica os genes homólogos compartilhados entre as espécies e os organizam em famílias gênicas, através do algoritmo OrthoMCL (LI; ROOS, 2003). Porém, antes disso obteve-se as sequências codificantes de proteínas (*coding sequences* – CDS) dos

nucleotídeos de DNA a partir de um *pipeline* automatizado que busca e obtém o maior quadro de leitura aberto (*open reading frames* – ORF) das sequências de nucleotídeos. Para cada grupo de genes homólogos, estimou-se as árvores de máxima verossimilhança usando o IQTree em cada 1000 ciclos de bootstrap. Os suportes de ramos das árvores com menos de 70% foram colapsados usando o programa TreeCollapaseCL4 (HODCROFT et al. 2014), como objetivo de diminuir os falsos positivos de verossimilhança (por exemplo, clados que realmente não existem).

Todas as árvores de MV geradas dos grupos de genes homólogos que contêm transcritos de *O. mimon* foram carregadas no *software* MulRF para estimar uma árvore de consenso de espécies baseada no método de distância de Robinson-Foulds (CHAUDHARY et al., 2013).

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação do mRNA das amostras

Quantificamos o mRNA da amostra intestinal, e o mesmo apresentou uma quantidade adequada para o sequenciamento. Foram obtidos exatamente 264,1 ng de RNA mensageiro da amostra do intestino, a partir de 7 mg de tecido.

5.2 Sequenciamento, tratamento das sequências e montagem dos *contigs*

Noventa mil oitocentos e trinta e oito (**90.838**) sequências (*reads*), com tamanho médio de 420, 76 bp, foram obtidas a partir do pirosequenciamento do cDNA do trato digestivo de fêmeas de *O. mimon*. As sequências obtidas foram tratadas e filtradas para a remoção das caudas poli A, dos fragmentos ribossomais, dos fragmentos de pequeno tamanho e das regiões de baixa qualidade, reduzindo o número original de *reads*, de 90.838 para 87.666 (Tabela 1). Em seguida, realizou-se a montagem *de novo* dos *contigs*. Foram montados **5.457 contigs**, utilizando-se 44.912 das sequências iniciais (51,2% dos *reads* obtidos); as demais 42.754 foram consideradas como *singlets* ou *singletons*. Os *contigs* montados foram filtrados eliminando aqueles com menos de 5 *reads* na clusterização e o número inicial de *contigs* reduziu para **2235** (Tabela 1). Dos 2235 transcritos obtidos, **2213** foram depositados nos bancos de dados públicos, como *Genbak*, *DDJ* e *ENA*.

Tabela 1. Análise das sequências, montagem e submissão dos *contigs* do intestino de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon*.

Classes	Quantidade	Comprimento médio (bp)
<i>Reads</i> iniciais (sequências geradas)	90.838	420,76
1º triagem* – <i>reads</i> removidos	3.054	419,71
Resultado	87.784	420,79
2º triagem** – <i>reads</i> removidos	118	896
Resultado	87.666	416,58
Montagem		
<i>Contigs</i> Montados	5.547	618
<i>Reads</i> utilizados para a montagem	44.912	433,08
<i>Singlets</i>	42.754	399,05
<i>Contigs</i> Removidos***	3.312	481,02
<i>Contigs</i> Finais	2.235	816,21
<i>Contigs</i> depositados no <i>Genbank</i>	2.213	817,84

*Remoção da cauda poliA e rRNA; *Remoção das sequências de baixa qualidade e pequeno tamanho;

***Eliminação dos *contigs* com menos de 5 reads.

5.4 Anotação automatizada: função, ontologia gênica e sublocalização celular

Das 2235 sequências analisadas, 1729 (77,40%) apresentaram *hits* (similaridade) no BLASTX, enquanto que 506 (22,60%) não tiveram qualquer similaridade com sequências do banco de dados (Figura 7). Um total de 177 *contigs* foram identificados no BLASTX, mas não apresentaram GO *hit* no mapeamento de termos funcionais. Os transcritos que apresentaram *hit* similaridade relevantes tanto no BLAST e quanto na ontologia gênica (GO) totalizaram 1552 sequências anotadas completamente (Figura 7). Os transcritos intestinais de *O. mimon* apresentaram similaridade com sequências de ácaros, mamíferos, moluscos, insetos e de outros organismos depositados nos bancos de dados, mas principalmente com sequências de espécies de carrapatos, como *I. scapularis*, *I. ricinus*, *R. microplus*, *D. variabilis*, *A. variegatum*, *H. longicornis*, *Ar. monolakensis*, *O. moubata*, *O. coriaceus*, *Ornithodoros capensis* Neumann, 1901 e *O. parkeri*. A maioria dos termos GO foram obtidos a partir dos bancos UniProtKB e MGI.

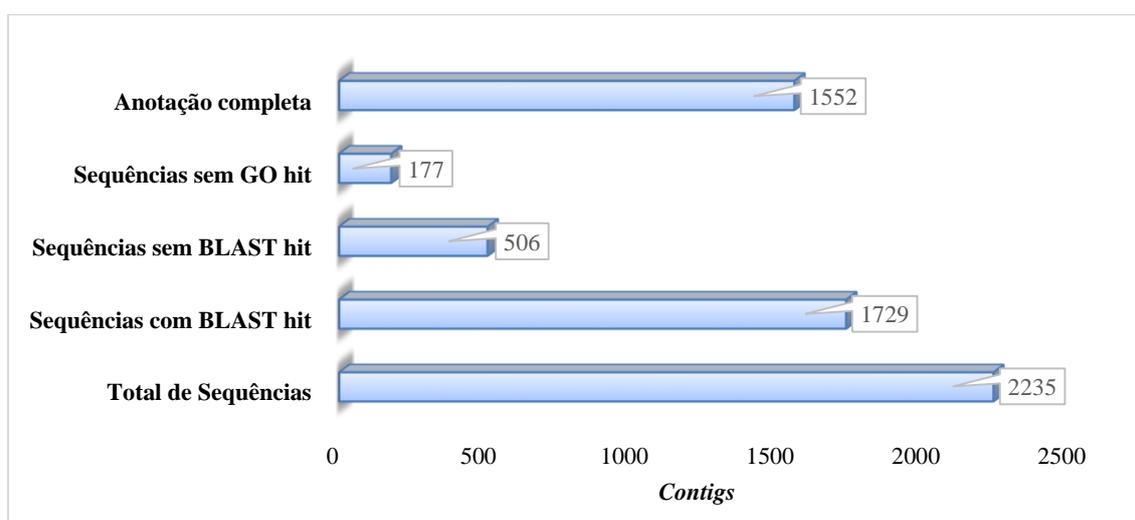


Figura 7. Gráfico de barras representando o resultado do BLAST (BLASTX hits) e da anotação, realizado pelo programa BLAST2GO.

5.4.1 Atribuição funcional

Atividade catalítica, adesão, e transporte foram as mais representativas funções atribuídas aos transcritos, com 780, 709 e 106 contigs, respectivamente (Figura 8). O restante dos transcritos anotados foi agrupado em outras atividades funcionais, como atividade estrutural, atividade antioxidante, molecular função e carreador de elétrons (Figura 8).

5.4.2 Predição de sublocalização celular

Como resultado da preditiva sublocalização celular, 18,2% (406) dos transcritos foram categorizados como pertencentes a via secretória e 16% (359) como potenciais proteínas de membrana. Entre os *contigs* anotados, os principais termos de GO para localização dos componentes celulares foram celular, organela e membrana com 718, 552 e 376 sequências, respectivamente.

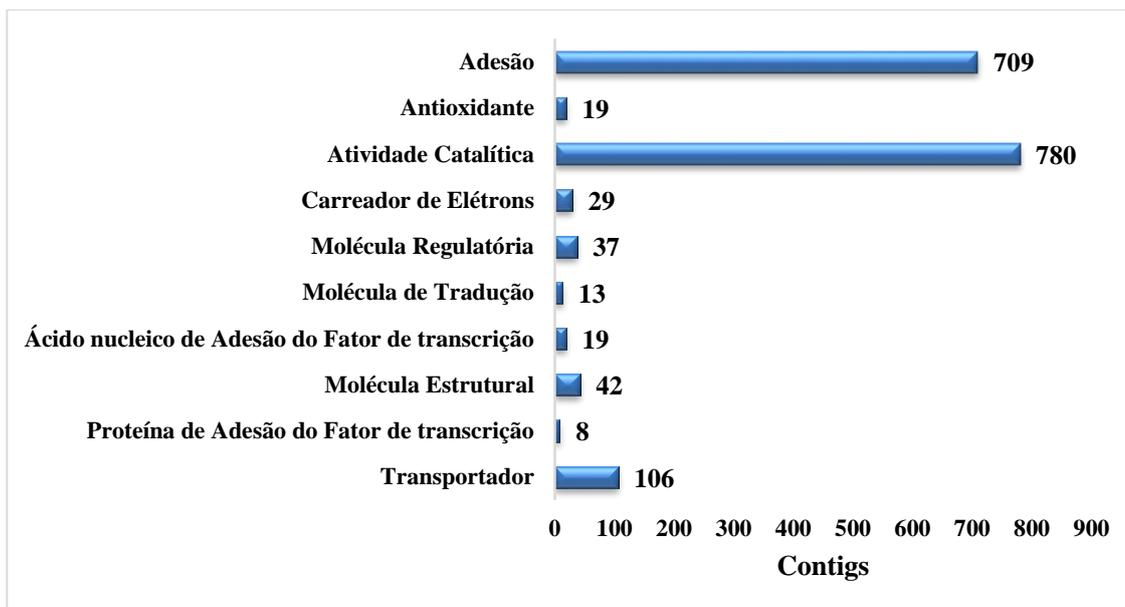


Figura 8. Gráfico de barras representando as principais atividades funcionais atribuídas aos *contigs* pelo B2G.

5.5 Categorização dos *contigs*

Todos os *contigs* foram agrupados em 31 categorias, conforme as funções e processos biológicos a eles atribuídos (Tabela 2). As categorias **atividade catalítica**, **transportadores-canais** e **desconhecido** foram as mais representativas, contendo 17,45% (390), 11% (246) e 37% (825) das sequências anotadas, respectivamente. Essas categorias também reportaram os maiores níveis acumulados de RPKM e de *reads* (Tabela 2). Oitocentos e vinte e cinco (825) transcritos foram agrupados na categoria de **desconhecido**, pois não apresentaram BLAST e GO *hits* com nenhuma sequência dos bancos de dados, ou porque tiveram similaridade com sequências de proteínas hipotéticas (*hypothetical protein*). Outras categorias, como **metabolismo de energia** (2,8%), **regulação nuclear** (2,4%), **metabolismo oxidante** (3%), **peptidase** (3%), **citoesqueleto** (2,3%), **mecanismo de transcrição** (2,8%) e **mecanismo de tradução** (2,7%) foram também representativas embora com menor número de transcritos associados.

A repartição dos *reads* dentro das categorias foi similar a proporção de distribuição do nível de RPKM acumulado nos grupos, sendo que 27, 14 e 12% dos *reads* pertencem as categorias **desconhecido**, **atividade catalítica** e **transportadores-canais**, respectivamente (Tabela 2).

5.6 Transcritos de maior nível de expressão (RPKM) no trato digestivo de *O. mimon*

A Tabela 3 apresenta os 50 *contigs* de maior valor de expressão. O *contig* de maior RPKM (8454,53) foi o *Contig4026*, uma quimotripsina elastase (*chymotrypsin-like elastase member 3b-like*), que possui 727 bp de comprimento e foi inserido na categoria **peptidase** (Tabela 3). Os melhores resultados do BLASTX para *Contig4026* (número de acesso GEIB01001133.1) foram com uma serino peptidase de *O. moubata* e com uma quimotripsina de *I. scapularis*. Esse transcrito que codifica para uma quimotripsina exibiu domínio proteico conservado de sítio catalítico de serino peptidase do tipo tripsina (cd00190, pfam00089 e smart00020), além de receber a função de proteólise e o código enzimático (CE) 3.4.21.0, que o classifica como uma hidrolase (número de acesso da sequência de proteína JAR86975.1).

Tabela 2. Categorização dos transcritos obtidos do intestino de fêmeas de *O. mimon* conforme a função biológica atribuída.

Categorias	Número de <i>Contigs</i>	%	RPKM acumulado	Total de Reads
Metabolismo de AA	7	0.31	3,475.77	223
Apoptose	12	0.54	4,000.15	136
Metabolismo de Carboidrato	19	0.85	6,282.83	377
Atividade Catalítica	390	17.45	117,687.08	5367
Maquinário de Regulação do Ciclo Celular	23	1.03	10,003.50	395
Citoesqueleto	50	2.24	25,052.17	1137
Metabolismo de Energia/Cadeia Respirató	63	2.82	58,631.91	3096
Inibidor de Enzima	3	0.13	1,322.80	88
Matrix extracelular e Adesão	25	1.12	8,284.17	478
Imunidade	4	0.18	2,480.54	41
Metabolismo de Lipídio	17	0.76	7,463.94	306
Regulação Nuclear	53	2.37	26,845.04	925
Metabolismo oxidativo	70	3.13	27,302.06	1101
Inibidor de Peptidases	17	0.76	11,049.58	395
Peptidases	67	3.00	42,802.16	1808
Maquinário Proteossômico	19	0.85	4,869.57	157
Maquinário de exportação de Proteína	3	0.13	1,037.33	26
Maquinário de Modificação de Proteína	42	1.88	19,357.70	1056
Síntese Proteica	4	0.18	3,538.37	118
Maquinário de Replicação	20	0.89	9,499.16	344
Proteínas Ribossomais	27	1.21	10,587.92	374
Transdução de sinal	33	1.48	9,390.29	322
Proteína Sinalizadora	8	0.36	2,034.22	83
Estocagem	6	0.27	5,618.01	175
Proteínas Salivares	12	0.54	4,729.74	141
Fator de transcrição	41	1.83	18,161.76	728
Maquinário de Transcrição	64	2.86	22,813.75	793
Maquinário de tradução	60	2.68	31,904.46	1589
Transportadores-Canais	246	11.01	90,811.27	4518
Elementos transponíveis	5	0.22	1,507.35	44
Desconhecido	825	36.91	331,830.85	9804

Tabela 3. Transcritos do trato digestivo de *O. mimon* que possuem altos níveis de expressão gênica (RPKM), totalizando 50 *contigs*.

<i>Contigs</i> – OMGU	Descrição da Sequência	Categoria	RPKM	Número do <i>Genbank</i>
<i>Contig4026</i>	Quimotripsina (<i>Chymotrypsin-like elastase member 3b-like</i>)	Peptidases	8,454.53	GEIB01001133.1
<i>Contig4778</i>	Citocromo C oxidase subunit i	Metabolismo de energia	7,564.57	GEIB01001132.1
<i>Contig4644</i>	Citocromo oxidase subunit 1	Metabolismo de energia	6,945.36	GEIB01000001.1
<i>Contig5056</i>	Proteína secretada desconhecida (<i>Unkown secreted protein PK-26 precursor</i>)	Desconhecido	6,464.70	GEIB01001617.1
<i>Contig5434</i>	Proteína secretada desconhecida (<i>Unkown secreted protein PK-26 precursor</i>)	Desconhecido	5,079.84	GEIB01001140.1
<i>Contig4262</i>	Citocromo partial	Metabolismo de energia	5,061.37	GEIB01001137.1
<i>Contig4611</i>	Ferritina	Estocagem	3,846.24	GEIB01001151.1
<i>Contig5135</i>	Actina	Citoesqueleto	3,832.29	GEIB01000003.1
<i>Contig5322</i>	Desconhecido	Desconhecido	3,569.30	GEIB01001168.1
<i>Contig5375</i>	Tiropina (<i>Thyropin precursor</i>)	Inibidor de peptidase	3,454.82	GEIB01000013.1
<i>Contig4193</i>	<i>Elongation factor 1 alpha</i>	Maquinário de tradução	3,448.40	GEIB01000005.1

<i>Contig5140</i>	NADH dehydrogenase subunit 4	Metabolismo de energia	3,432.30	GEIB01001136.1
<i>Contig5330</i>	Proteína secretada pk-2	Desconhecido	3,406.06	GEIB01001238.1
<i>Contig4523</i>	Histona h4-like	Regulação nuclear	3,361.93	GEIB01001148.1
<i>Contig4392</i>	Desconhecido secreted protein PK-26 precursor	Desconhecido	3,320.96	GEIB01000002.1
<i>Contig5201</i>	Hemelipoglicoproteína	Transportadores-canais	3,078.88	GEIB01000004.1
<i>Contig3883</i>	Citocromo C oxidase subunit i	Metabolismo de energia	3,066.59	GEIB01000009.1
<i>Contig4762</i>	Citocromo C oxidase subunit i	Metabolismo de energia	3,057.08	GEIB01001135.1
<i>Contig5313</i>	Catepsina B	Peptidases	3,006.84	GEIB01001153.1
<i>Contig3743</i>	Bud13 homolog	Maquinário de transcrição	2,730.72	GEIB01000159.1
<i>Contig4919</i>	Histona h2a	Regulação nuclear	2,619.56	GEIB01000023.1
<i>Contig4336</i>	Proteína ribossomal l6	Proteínas ribossomais	2,603.71	GEIB01001143.1
<i>Contig5277</i>	Ciclofilina (<i>Cyclophilin</i>)	Maquinário de modificação de proteína	2,515.60	GEIB01000035.1
<i>Contig4288</i>	<i>Fatty acid-binding protein</i>	Transportadores-canais	2,504.31	GEIB01000054.1
<i>Contig5102</i>	Desconhecido	Desconhecido	2,448.53	GEIB01000014.1
<i>Contig5184</i>	DNA double-strand break repair rad50	Desconhecido	2,324.17	GEIB01001138.1
<i>Contig5044</i>	Tiropina (<i>Thyropin precursor</i>)	Inibidor de peptidase	2,269.30	GEIB01001163.1
<i>Contig5275</i>	Zinc finger protein 713	Fatores de transcrição	2,260.39	GEIB01001185.1
<i>Contig5248</i>	Secretado	Desconhecido	2,215.95	GEIB01001174.1
<i>Contig4891</i>	NADH dehydrogenase subunit 2	Metabolismo de energia	2,169.13	GEIB01000031.1
<i>Contig4474</i>	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein 90</i>)	Maquinário de modificação de proteína	2,131.22	GEIB01000006.1
<i>Contig4274</i>	Histona	Regulação nuclear	2,127.77	GEIB01001170.1
<i>Contig4950</i>	Hypothetical protein IscW_ISCW001908	Desconhecido	2,107.83	GEIB01000017.1
<i>Contig4683</i>	Citocromo C oxidase subunit iii	Metabolismo de energia	2,093.83	GEIB01001248.1
<i>Contig4660</i>	Elongation factor 1 alpha	Maquinário de tradução	2,092.82	GEIB01000016.1
<i>Contig4668</i>	Citocromo partial	Metabolismo de energia	2,088.05	GEIB01001157.1
<i>Contig4030</i>	Beta 2c	Transportadores-canais	2,025.46	GEIB01001139.1
<i>Contig3663</i>	Translationally controlled tumor protein	Maquinário de regulação do ciclo celular	2,009.01	GEIB01001156.1
<i>Contig2925</i>	Desconhecido	Desconhecido	2,006.74	GEIB01001144.1
<i>Contig3126</i>	Vacuolar sorting protein 9 domain containing protein	Desconhecido	1,967.28	GEIB01001225.1
<i>Contig4250</i>	ADP ATP translocase 1	Transportadores-canais	1,916.54	GEIB01000011.1
<i>Contig4745</i>	Desconhecido	Desconhecido	1,913.49	GEIB01001201.1
<i>Contig3140</i>	Catepsina D	Peptidases	1,912.04	GEIB01001141.1
<i>Contig5082</i>	Glutathiona-s-transferase	Metabolismo oxidativo	1,900.88	GEIB01001162.1
<i>Contig5023</i>	Desconhecido	Desconhecido	1,866.64	GEIB01001194.1
<i>Contig5037</i>	ATP sintase c-subunit	Metabolismo de energia	1,836.66	GEIB01000055.1
<i>Contig5042</i>	Desconhecido	Desconhecido	1,824.90	GEIB01001336.1
<i>Contig4241</i>	Catepsina L	Peptidases	1,806.54	GEIB01000021.1
<i>Contig4889</i>	Desconhecido	Desconhecido	1,740.50	GEIB01000033.1
<i>Contig4307</i>	Zinc finger	Fatores de transcrição	1,717.53	GEIB01001161.1

A categoria **metabolismo de energia** foi representada por 10 *contigs* entre os 50 transcritos de maior valor de expressão (Tabela 3), *Contig4778*, *Contig4644*, *Contig4262*, *Contig5140*, *Contig3883*, *Contig4762*, *Contig4891*, *Contig4683*, *Contig4668* e *Contig5037*. Esses são genes que coficam para citocromo oxidases, NADH desidrogenases e ATP sintases, que são enzimas mitocondriais carreadoras de elétrons e sintetizadoras de adenosina trifosfato (ATP), que operam na cadeia respiratória para a obtenção de energia celular.

Quinze *contigs* com alto nível de RPKM foram agrupados na categoria **desconhecido** (Tabela 3). Os transcritos *Contig5056*, *Contig5434* e *Contig4392* tiveram

hit de 39% de identidade somente com uma proteína secretada desconhecida (*unknown secreted protein PK-26*) de *O. moubata*, e não exibiram nenhum domínio conservado. O transcrito *Contig5322* de 535 bp exibiu domínio proteico conservado intracelular (pfam03448) de MgtE (*Magnesium transporter*) e apresentou *hits* com a proteína hipotética (*hypothetical protein*) de *Maricaulis* sp. (Bacteria: Hyphomonadaceae) e *Laccaria amethystine* (Fungi: Tricholomataceae). *Contig5322* é provavelmente uma proteína secretada e de membrana, pois ele apresentou SignalP e TMHMM. O transcrito *Contig5330* também exibiu sinais de SignalP e TMHMM e teve *hit* de 53% de identidade com uma proteína secretada (*secreted protein pk-2*) de *O. moubata*. O *Contig5102* não teve *scores* e nem *e-values* significativos no BLASTX. Também não apresentou nenhum domínio conservado de proteína, mas exibiu os sinais SignalP e TMHMM. *Contig5184* teve *hit* com dna *double-strand break repair rad50* de *I. scapularis* e exibiu múltiplos domínios conservados putativos de proteína em dois *frames* de leitura (+1 e +3). No *frame* +1, *Contig5184* revelou quatro domínios putativos de FHC-F-BAR (cd07610), Mplasa_alpha_rch (TIGR04523), EzrA (pfam06160) e COG1340. A mesma quantidade de domínios foi encontrada no *frame* +3, como TPR-MLP1-2 (pfam07926), COG1579, SMC-prok-A (TIGR02169) e PRK04778. O transcrito *Contig5248* foi identificado como uma proteína secretada (*secreted protein*) no BLASTX, que foi confirmada com a exibição de sinal de SignalP, porém nenhuma função foi atribuída ao transcrito. O *Contig4950* teve *hit* de 29% de identidade com uma proteína hipotética “*hypothetical protein*” *IscW* de *I. scapularis*, que tem função desconhecida. O *Contig3126*, identificado como *vacuolar sorting protein 9 domain containing protein*, teve melhores *hits* com *predicted telomerase-binding protein* de *Saccoglossus kowalevskii* (Enteropneusta: Harrimaniidae) e com *Ankyrin repeat domain-containing protein 27* de *Zootermopsis navadensis* (Insecta: Termopsidae). Os transcritos *Contig2925*, *Contig4745*, *Contig5023*, *Contig5042* e *Contig4889* não tiveram similaridade significativas com as sequências dos bancos de dados no BLASTX e não exibiram nenhum domínio putativo conservado de proteína.

Os transcritos *Contig5277* e *Contig4474* foram associados à categoria **maquinário de modificação de proteína**. O *Contig5277* é uma ciclofilina (*cyclophilin*) (domínio conservado – cd01926) e recebeu o código enzimático 5.2.1.8, que o classifica como uma peptidilprolil isomerase. O *Contig4474* foi identificado como uma proteína de choque térmico “*heat shock protein*” (Hsp) 90 e teve *hit* de 94% de identidade com a proteína Hsp90 de *I. scapularis*. Os transcritos *Contig4523*, *Contig4919* e *Contig4274* são genes que codificam para proteínas histonas, pois estes exibiram domínios putativos conservados de H4 (cd00076) e dois H2B (cd00074), respectivamente. Esses transcritos foram incluídos na categoria **regulação nuclear**, e tiveram *hits* de 99 a 100% de identidade com histonas de carrapatos, ácaros e peixes.

O transcrito *Contig3663* foi associado à categoria **maquinário regulatório de ciclo celular**. Esse foi identificado como um gene que codifica para uma proteína que controla tumor translacionalmente “*translationally controlled tumor protein*” (TCTP), pois este exibiu domínio putativo conservado de TCTP (pfam00838 e PTZ00151), apresentando *match* com TCTPs de aranhas e carrapatos (Tabela 3).

Os transcritos *Contig4611* (ferritina) e *Contig5201* (hemelipoglicoproteína) são possivelmente genes associados com o processo de nutrição dos carrapatos. O *Contig4611* apresentou *hits* de 92% de identidade com ferritinas de *O. moubata* e *Ornithodoros coriaceus* Koch, 1844, exibindo um domínio conservado de ferroxidase citoplasmática (cd01056, COG1528, PRK1034 e pfam00210). Foi, portanto, agrupado na categoria **estocagem**, pois ferritina é uma enzima que reage com ferro. O transcrito *Contig5201* foi nomeado como uma hemelipoglicoproteína (*hemelipoglycoprotein*) e

apresentou melhor *hit* com uma vitelogenina de *H. longicornis*. Possui 2623 bp e é provavelmente um gene de proteína carreadora de heme, pois a função de transporte foi atribuída a ele, sendo então incluído na categoria **transportadores-canaís**. O *Contig5135* apresentou *hits* de 96-100% de identidade com actina (domínio conservado pfam00022) e está incluído na categoria **citoesqueleto** (Tabela 3).

Três *contigs* de alto RPKM (*Contig4288*, *Contig4030* e *Contig4250*) foram identificados como genes transportadores de lipídios e elementos químicos. O transcrito *Contig4030* exibiu domínio conservado de beta-tubulina (cd02187), enquanto *Contig4250* apresentou múltiplos domínios conservados de proteínas mitocondriais carreadoras (pfam00153), em três diferentes *frames* de leitura (+1, +2 e +3). O transcrito *Contig4336* foi identificado como uma proteína ribossomal 16 (cd13156), apresentando sinais de SignalP e TMHMM, e teve melhor *hit* com *ribossomal protein L6* putative de *I. scapularis*.

Dois transcritos de *O. mimon* (*Contig5275* e *Contig4307*) que estão entre os melhores 50, codificam para proteínas ligantes, denominadas *zinc finger* (Tabela 3). Esses transcritos foram associados ao processo de regulação de transcrição e foram incluídos na categoria **fator de transcrição**. O *Contig3743* exibiu domínio conservado de *Bud13* (pre-mRNA splicing fator of RES complex) e foi classificado na categoria **maquinário de transcrição**. Os transcritos *Contig4193* e *Contig4660* foram associados à atividade funcional de fator de alongamento de tradução e receberam o CE 2.7.7, que os classifica como nucleotidiltransferases (*nucleotidyltransferases*). O restante dos transcritos entre os top 50 mais expressos são apresentados nos subitens abaixo.

5.7 Transcritos envolvidos na digestão do repasto sanguíneo e na absorção de nutrientes

Os transcritos de *O. mimon* associados com as funções do intestino, como digestão, absorção, transporte, desintoxicação e imunidade, são destacados nas próximas seções: enzimas digestivas e outros transcritos associados com as atividades funcionais do tecido intestinal.

5.7.1 Enzimas digestivas

Identificou-se 103 transcritos digestivos que foram divididos em três categorias: peptidases (67), metabolismo de lipídio (17) e metabolismo de carboidrato (19) (Tabela 2). A participação em processos metabólicos de lipídios, carboidratos e proteínas foi atribuída a esses transcritos digestivos.

5.7.1.1 Peptidases

Encontrou-se cDNA de proteinases pertencentes as classes de serino, cisteína, aspártico e metalo, que totalizaram em 67 transcritos. Para todos esses transcritos foi atribuído a função de atividade proteolítica.

As cisteínas peptidases foram as mais representativas com 32 transcritos (48% das peptidases). Genes que coficam para caspases, calpaínas, catepsinas e legumainas constituíram o grupo das enzimas proteolítica do tipo cisteína. Para os transcritos de caspases e cisteínas apoptóticas de *O. mimon* atribuiu-se a participação na programação mediata da morte celular (apoptose), pois esses transcritos exibiram o domínio conservado catalítico de cisteína caspase aspartase (cd00032, pfam00656 e smart00115). Os cDNAs de calpainas apresentaram domínio conservado de proteína do código cd00044, que os caracterizam como cisteínas proteinases citoplasmáticas de cálcio

dependente. Este grupo tem diferentes funções, como processo de remodelagem do citoesqueleto, diferenciação celular, apoptose e sinal de tradução.

As catepsinas do tipo cisteínas de *O. mimon* foram representadas pelos transcritos de catepsinas B, C, L e O, sendo a peptidase B a mais abundante. O *Contig5313* (RPKM 3006,84), classificado como uma catepsina B, teve melhor *hit* do BLASTX com catepsina de *I. scapularis*. O código enzimático 3.4.22.1 atribuído ao transcrito *Contig5313* e a exibição de domínio conservado de catepsina B (cd02620 e pfam00112), indicam que esse *contig* é um gene que codifica para uma enzima proteolítica pertencente à família das papaínas cisteínas peptidases (número de acesso JAR86966.1). No total, foram encontrados cinco genes codificadores para catepsina B (RPKM entre 273,25 e 3006,84; média 1144,16), dos quais somente um (*Contig5218-GEIB01001273.1*) apresentou sinal predito de secreção (SignalP). Dois transcritos, *Contig4241* (GEIB01000021.1) e *Contig4886* (GEIB01000047.1), nomeados como catepsina L foram identificados no intestino de fêmeas de *O. mimon* e mostraram também o predito sinal de secreção. O *Contig4241* (RPKM 1086,54) apresentou melhor *hit* com catepsina L de *Strongylocentrotus purpuratarus* (Echinoida: Strongylocentrotidae – Ouriço-do-mar) e não apresentou similaridade com catepsinas L de carrapatos. Diferentemente, o transcrito *Contig4886* (RPKM 998,78) teve *hits* principalmente com catepsinas L de carrapatos.

Identificou-se somente uma única sequência de cDNA de catepsina C (*Contig653*; RPKM 686,42- GEIB01001207.1). Esse transcrito exibiu domínio conservado de proteína de cisteína proteinase da família papaína (cd02621 e pfam00112). O transcrito *Contig2830* (RPKM 559, 20- GEIB01000303.1) foi identificado como catepsina O e apresentou similaridades com uma cisteína protease e um putativo inibidor de protease “*cysteine protease and A protease inhibitor, putative*” de *I. scapularis* e com uma proteína cisteína peptidase semelhante à catepsina O “*cathepsin O-like cysteine peptidase protein*” de *Tityus serrulatus* (Arachnida: Scorpiones: Buthidae). Esse transcrito exibiu domínio putativo de peptidase C1A (cd002248, pfam00112 e COG4870), que o classifica como uma cisteína peptidase papaína que pertence à família C1 e subfamília C1A. A proteína codificada pelo transcrito *Contig2830* (número de acesso JAR87535.1) tem um conservado motivo de 12 resíduos de aminoácidos (QLNCGACWAFST), que é característico do sítio ativo de proteases tiol (cisteína) de eucariotos. No alinhamento múltiplo de sequências de catepsina O observou-se seis conservados similares resíduos na região do motivo (Figura 9).

Sequências	* * * * * *
> Contig2830 JAR87535.1 cathepsin o like, partial [<i>Ornithodoros mimon</i>]	Q L N C G A C W A F S T
> XP_002399230.1 _cysteine_protease_and_A_protease_inhibitor_putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	Q R D C G A C W A F S T
> CDJ26736.1 cathepsin O-like cysteine peptidase protein [<i>Tityus serrulatus</i>]	Q K E C G A C W A F S T
> XP_003696831.2 PREDICTED: cathepsin O-like [<i>Apis florea</i>]	Q G S C G A C W A F S T
> XP_008547449.1 PREDICTED: cathepsin O [<i>Microplitis demolitor</i>]	Q G N C G A C W A Y S T
> XP_695717.3 PREDICTED: cathepsin O [<i>Danio rerio</i>]	Q G S C G G C W A F S I
> KFM83070.1 Cathepsin O, partial [<i>Stegodyphus mimosarum</i>]	Q E Q C G A C W A F S T
> XP_009805315.1 PREDICTED: cathepsin O, partial [<i>Gavia stellata</i>]	Q R T C G G C W A F S V
> XP_970512.2 PREDICTED: cathepsin O [<i>Tribolium castaneum</i>]	Q G S C G A C W A Y S V
> XP_009961473.1 PREDICTED: cathepsin O, partial [<i>Tyto alba</i>]	Q Q T C G G C W A F S V
> XP_012284997.1 PREDICTED: cathepsin O-like isoform X2 [<i>Orussus abietinus</i>]	Q G T C G A C W A F S T
> XP_003490694.1 PREDICTED: cathepsin O-like [<i>Bombus impatiens</i>]	Q G S C G A C W A F S T
> XP_006121910.1 PREDICTED: cathepsin O, partial [<i>Pelodiscus sinensis</i>]	Q Q T C G G C W A F S T
> XP_011308766.1 PREDICTED: cathepsin O-like [<i>Fopius arisanus</i>]	Q G S C G A C W A Y T A
> XP_008937868.1 PREDICTED: cathepsin O, partial [<i>Merops nubicus</i>]	Q Q T C G G C W A F S I
> KFW09681.1 Cathepsin O, partial [<i>Eurypyga helias</i>]	Q Q T C G G C W A F S V
> KGM00196.1 Cathepsin O, partial [<i>Charadrius vociferus</i>]	Q Q T C G G C W A F S V
> NP_001026300.1 cathepsin O precursor [<i>Gallus gallus</i>]	Q Q T C G G C W A F S V
> KDR16812.1 Cathepsin O [<i>Zootermopsis nevadensis</i>]	Q K T C G A C W A F S T
> KFP46127.1 Cathepsin O, partial [<i>Cathartes aura</i>]	Q Q T C G G C W A F S V
> CAA54562.1 cathepsin O [<i>Homo sapiens</i>]	Q Q M C G G C W A F S V
Posição dos resíduos de aminoácidos do motivo	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Figura 9. Comparação das sequências de catepsina O no alinhamento da região motivo do sítio ativo da protease tiol de eucariotos. O símbolo asterisco (*) representa os resídeos de aminoácidos conservados e idênticos entre as sequências.

O transcrito *Contig957* (RPKM 1258,64- GEIB01000015.1), nomeado como cisteína de intestino “*midgut cysteine*”, mostrou 66% de identidade com *midgut cysteine* proteinase putative de *I. scapularis*. A função dessa cisteína não foi totalmente elucidada, mas o transcrito também contém o domínio conservado de proteína de cisteína proteinase da família papaína (cd02248 e pfam00112). Identificaram-se quatro moléculas de cDNA de transcritos que codificam para legumaínas (*Contig5200*-GEIB01001220.1, *Contig4866*-GEIB01001229.1, *Contig1966*-GEIB01000064.1 e *Contig5258*-GEIB01000075.1) com RPKM entre 510,71 e 811,89. Todos os transcritos de legumaínas exibiram domínio conservado da família de peptidase C13 (pfam01650), que os definem como peptidases asparaginilos.

Treze transcritos (19% das peptidases) apresentaram a função de atividade de serinos endopeptidases, conforme a similaridade de sequência, e foram agrupados no grupo das serinos. Dentre eles, destacam-se as serino proteinase de carrapato (*tick serine proteinase*), quimotripsina, proteína lisossomal, carboxipeptidase e outras serino proteinases. O transcrito de maior nível de expressão entre as serinos foi o *Contig5086* (RPKM 1491,85- GEIB01000042.1), designado como uma serino proteinase de carrapato e teve *hits* de 76% de identidade com uma proteína precursora semelhante à serino proteinase “*serine protease-like protein precursor*” de *O. moubata*. Esse transcrito contém sinal de predição de secreção, além do domínio conservado de tripsina (cd00190 e pfam00089) e o código enzimático 3.4.21, que o classifica como uma quimotripsina. Os transcritos *Contig3496* (RPKM 378,88-GEIB01000176.1) e *Contig4814* (RPKM 125,76-GEIB01002008.1) contém domínio de serino carboxipeptidase (pfam00450), tanto que a função de atividade de carboxipeptidase foi atribuída a eles. Três transcritos, *Contig3702* (RPKM 255,96-GEIB01001026.1), *Contig1413* (RPKM 240,14-GEIB01000923.1) e *Contig3285* (RPKM 181,16-GEIB01002101.1) apresentaram domínio de microsomal peptidase sinal da subunidade de 25 e 12 kDa (SPC – pfam06703), pertencendo,

provavelmente, ao complexo de peptidase sinal do retículo endoplasmático. Duas moléculas de cDNA codificadoras para quimotripsinas foram bem expressas (*Contig4026*-RPKM 8454,53 e *Contig4983*-RPKM 1223,48- GEIB01000056.1), que tiveram similaridade com serino protease de *O. moubata*.

Os genes de metalopeptidases do intestino de *O. mimon* foram compostos por endo e exopeptidases, como oligopeptidase, dipeptidase, dipeptidil-peptidase e aminopeptidases, representando 28% (19 *contigs*) das peptidases intestinais. Cinco transcritos de metalo proteinases (*Contig621*-RPKM 421,73- GEIB01000425.1; *Contig5173*-RPKM 396,41- GEIB01001324.1; *Contig5085*-RPKM321,65-GEIB01000292.1; *Contig4027*-RPKM 202,48- GEIB01001988.1; e *Contig5249*-RPKM 157,45-GEIB01002015.1) tiveram GO *hit* de atividade funcional de exopeptidases, exibindo domínio conservado de aminopeptidase (pfam05195), e apresentando código enzimático 3.4.11.1, que os caracterizam como aminopeptidases. Por outro lado, os transcritos *Contig3475* (GEIB01000240.1), *Contig2224* (GEIB01000674.1) e *Contig435* (GEIB01000370.1) (RPKM 401,61, 302,04 e 267, respectivamente) compreenderam as metaloendopeptidases, sendo designado a eles o código enzimático 3.4.24. Os *contigs* *Contig2690* (GEIB01000301.1) e *Contig3707* (GEIB01002128.1) apresentaram domínio de metalopeptidase do tipo M19 e foram classificados como dipeptidil-peptidase por sua atividade funcional.

Três transcritos (*Contig3140*-RPKM 1912,04-GEIB01001141.1, *Contig4774*-RPKM 977,20- GEIB01001183.1 e *Contig3706*-RPKM 769,09- GEIB01001344.1) apresentaram funções preditas de endopeptidases do tipo aspártica. O *Contig3140* foi identificado no BLASTX como catepsina D, exibindo domínio conservado catalítico de ácido aspartico de catepsina D. Este transcrito apresentou predição de peptídeo sinal (SignalP) e de região de transmembrana (TMHMM). Os transcritos *Contig4774* e *Contig3706*, identificados como proteases lisossomais aspárticas, receberam o código enzimático 3.4.23, que os classificam como pertencentes ao grupo das endopeptidases aspárticas, além de apresentarem o domínio de catepsina D. Todas esses transcritos aspárticos enzimáticos tiveram similaridade principalmente com aspártica proteinases de carrapatos, como *I. ricinus* e *H. longicornis*.

5.7.1.2 Metabolismo de carboidrato

A categoria **metabolismo de carboidrato** foi contemplada por 19 transcritos que representam genes que codificam para chitinase, fructose, galactosidase, maltase, fucosidase, fosfatase e glucosidase. Dois *contigs*, *Contig4231* (RPKM 846.71-GEIB01000065.1) e *Contig4692* (RPKM 212.64- GEIB01000144.1), exibiram domínio conservado de quitinase (cd02872 e COG3325) e o código CE 3.2.1.14, que os classificam como genes que codificam para proteínas quitinases. O transcrito *Contig4231* apresentou sinal predito de secreção (SignalP), enquanto que *Contig4692* teve sinal de região de transmembrana (TMHMM). Três moléculas cDNA (*Contig571*-RPKM 508,41; GEIB01000076.1, *Contig4163*-RPKM 506,43; GEIB01001334.1 e *Contig3170*-RPKM 173,88; GEIB01002097.1) de maltases intestinais foram identificados no transcriptoma de *O. mimon*. Todas apresentaram o domínio conservado catalítico de alfa amilase (cd11328), que é encontrado em proteínas maltases.

Os transcritos *Contig79* (RPKM 548,19; GEIB01001240.1) e *Contig3343* (RPKM 286,33; GEIB01000239.1) são genes que codificam para fructose, pois exibiram domínio conservado e atividade funcional de fructose-bisfosfato-aldolase (cd00344 e cd00354). Os códigos enzimáticos 4.1.2.13 para *Contig79* e 3.1.3.11 para *Contig3343* os caracterizam como fructose-bisfosfato-aldolase e fructose-bisfosfato, respectivamente.

Atividade funcional de α -glucosidase e o código enzimático 3.2.1.20 foram atribuídos aos transcritos *Contig4153* (RPKM 237,32; GEIB01000542.1) e *Contig3020* (RPKM 150.55; GEIB01000699.1), classificando-os como genes de glucosidases. O transcrito *Contig39* (RPKM 274.70; GEIB01001233.1) foi identificado como um glicogênio fosforilase, sendo atribuído a ele o código enzimático 2.4.1.1. Esse exibiu domínio conservado de GT1 gliconênio fosforilase (cd04300 e pfam00343). O domínio conservado de α -l-fucosidase foi identificado em duas moléculas de cDNA (*Contig103*-RPKM 138.33; GEIB01002031.1 e *Contig5179*- RPKM 130.22; GEIB01000885.1), representando assim as fucosidases intestinais de *O. mimon*. Glucosiltransferase, α -galactosidase, hexosaminidase e aminotransferase contemplaram o restante das carboidrases.

5.7.1.3 Metabolismo de lípidio

A categoria metabolismo de lípidio foi composta principalmente de lipases, fosfolipases, reductases, transferases e fosfodiesterase e ligase. Todos estes transcritos foram associados com o processo celular de metabolismo de lípidio. Identificou-se um único transcrito codificante da enzima fosfolipase B (*Contig1795*-RPKM- 394,32-GEIB01001359.1), que teve *hits* de 66% de identidade com fosfolipase de *Limulus polyphemus* (Line, 1758). Outro transcrito de lipase (*Contig2581*-RPKM 294,38-GEIB01000804.1) teve similaridade (72% de identidade) com triacilglicerol lipase de *I. scapularis*.

5.7.2 Outros transcritos associados com as atividades funcionais do intestino

Nesta seção, são destacados os transcritos das categorias inibidor de peptidase, imunidade, metabolismo oxidativo e transportadores-canais, que estão associados com as funções intestinais.

5.7.2.1 Inibidor de peptidase

Dezessete transcritos intestinais foram associados à categoria **inibidor de peptidases**. Serpinas, cistatinas e inibidores com domínio Kunitz foram os mais representativos. O domínio putativo conservado de inibidor de serino proteinase – “*serine proteinase inhibitor serpin*” (cd00172 e pfam00079) foi identificado em 12 transcritos. O transcrito *Contig4823* (RPKM 990,82-GEIB01001172.1) apresentou identidade de 46% com *serine protease inhibitor 5* Rms5 de *R. microplus*. Cinco transcritos (*Contig2329*-RPKM 525,76-GEIB01000354.1, *Contig5352*-RPKM 479,84-GEIB01001620.1, *Contig3495*-RPKM 407,87- GEIB01000363.1, *Contig3309*-RPKM 328,78-GEIB01001820.1 e *Contig3457*-RPKM 204,22- GEIB01001015.1) exibiram o domínio Kunitz (cd0019, pfam00014 e smart00131). Destes, somente *Contig3309* e *Contig3457* apresentaram sinal predito de secreção. O transcrito *Contig3309*, identificado como um precursor de veneno inibidor de protease - “*venom protease inhibitor precursor*”, apresentou *hits* de 48 a 58% de identidade com inibidores Kunitz de serpentes. Um dos genes inibidores de peptidases de *O. mimon* (*Contig3184*- RPKM 457,08-GEIB01001287.1) exibiu domínio conservado de macroglobulina “*macroglobulin*” (cd02897, pfam07677 e pfam07678) e teve melhor *hit* com uma macroglobulina “ α -2-macroglobulin splice variant” de *O. moubata*.

A atividade de inibir endopeptidases do tipo cisteína foi associada a quatro transcritos, duas cistatinas (*Contig4119*-RPKM 446,61-GEIB01001544.1 e *Contig3897*-RPKM 271,95-GEIB01001844.1) e duas tiropinas (*thyropins*) (*Contig5375* e

Contig5044). Os transcritos *Contig4119* e *Contig3897* exibiram domínio conservado de cistatinas (cd00042, smart00043 e pfam00031) nas sequências de cDNAs e tiveram *hits* de 53 e 58% de identidade, respectivamente, com cistatinas de *O. moubata*. As duas moléculas de cDNA que codificam para tiropinas apresentaram domínio conservado de tiroglobulina (*thyroglobulin*) (cd00191) e foram bem expressas no tecido intestinal.

5.7.2.2 Imunidade

A categoria imunidade foi representada principalmente por 4 transcritos, três genes de defensina A e um de lisozima. Foram atribuídos aos transcritos de defensina A, a participação de resposta de defesa contra bactérias gram-negativas e positivas, e para o transcrito de lisozima, foi conferida a atividade lisossomal. Um transcrito de defensina foi bem expresso (*Contig5007*-RPKM 1115,41-GEIB01000200.1) e apresentou 80% de identidade com defensina de *O. moubata*, enquanto que *Contig2696* (RPKM 312,63-GEIB01000589.1) teve o melhor *hit* com lisozima dessa mesma espécie de carrapato.

5.7.2.3 Metabolismo oxidativo

Na categoria **metabolismo oxidativo** foram associados 70 transcritos, que são enzimas atuantes nos processos de óxido-redução de compostos e na reposta de estresse oxidativo, como a fosfolípideo-hidroperóxido glutaciona peroxidase (*Contig5141*-GEIB01001198.1, *Contig5040*-GEIB01001224.1, *Contig5426*-GEIB01000051.1 e *Contig3924*-GEIB01000721.1) e a glutaciona-S-transferase (*gst*) (*Contig5082*, *Contig5045*-GEIB01000083.1, *Contig5342*-GEIB01001199.1 e *Contig3084*-GEIB01000333.1). Um dos transcritos de glutaciona peroxidase teve alto nível de expressão (*Contig5141*-RPKM 1710,24-GEIB01001198.1) e teve similaridade de 81% com à fosfolípideo-hidroperóxido glutaciona peroxidase de *R. microplus*. Esse transcrito exibiu o código enzimático 1.11.1.9 e o domínio conservado de glutaciona peroxidase (GSH) (cd00340). Outros transcritos altamente expressos associados com o metabolismo oxidativo foram *Contig5082* (RPKM 1900,88) e *Contig5045* (RPKM 1153,50), e esses exibiram os domínios conservados das classes de *gst* de delta e epsilon (cd03045) e mu (cd03075), respectivamente. *Contig5045* também exibiu os preditivos sinais de pepetideo de secreção e de região de transmembrana. Os transcritos de *gst* tiveram similaridade com putativas glutaciona-s-transferase de *I. scapularis*. O transcrito *Contig131* (RPKM 166,75-GEIB01001909.1) foi identificado como uma microsomal glutaciona-s-transferase, pois exibiu domínio de MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (pfam01124), além de SingalP.

5.7.2.4 Transportadores-canais

Foram agrupados 246 transcritos na categoria **transportadores-canais**, com atividade funcional de transporte e de receptores de elementos biológicos e químicos, como proteínas, carboidratos, lipídios, ânions e íons. Os transcritos mais representativos foram vitelogenina (10 transcritos) e hemelipogliproteína (6). Ambos foram associados à função de transporte de elementos lipídicos. O transcrito *Contig4329* (RPKM 713,31), identificado como vitelogenina-B, apresentou melhor *hit* com vitelogenina-B de *H. longicornis*. Esse transcrito (GEIB01001142.1) exibiu domínio conservado de fator de von Willebrand (pfam00094 e smart00216), que foi também encontrado nas demais vitelogeninas de *O. mimon*. Dentre os genes que codificam para hemelipogliproteína, destacam-se o transcrito *Contig5201* (RPKM 3078,88) que foi altamente expresso e apresentou sinal preditos de secreção.

5.8 Filogenia

Nesta seção, é apresentado os resultados das inferências filogenéticas relacionadas às peptidases digestivas e ao conjunto de dados transcritômicos de carrapatos.

5.8.1 Filogenia de peptidases digestivas

As diferentes classes de peptidases formaram dois distintos grupos: um grupo parafilético contendo as serinas, cisteínas e metalo proteinases e um grupo monofilético com as peptidases aspárticas (Figura 10). A classe das cisteínas foi representada pelas catepsinas (família de peptidases C1) e pelas legumainas (família C13). O clado monofilético das catepsinas do tipo cisteínas foi formado pelas catepsinas, pelas cisteínas proteinases digestivas, pelas cisteínas intestinais (*midgut cysteine*) e pelas dipeptidil peptidases do tipo 1. A maioria das cisteínas catepsinas de *O. mimon* são relativamente próximas às catepsinas de carrapatos, formando assim grupos monofilético fortemente suportados (Figura 10). A exceção foi o transcrito *Contig4241*, que agrupou com o ramo de catepsinas L de anfíbios, aves e peixes (Figura 10). Cada catepsina (B, C, L e O) formou um grupo monofilético que foi bem suportado dentro do clado das cisteínas catepsinas. As catepsinas B e C ocorrem no mesmo ramo, e catepsina O formou um grupo irmão com as endopeptidases B e C. A catepsina L foi dividida em dois distintos cladros com forte suporte. Um dos cladros foi constituído somente por sequências de proteinases L de artrópodes, enquanto que o outro clado foi formado por proteases de bivalves, equinodermos, artrópodes (aranhas, escorpiões e carrapatos) e vertebrados. Demonstrou-se, pela primeira vez, a presença de uma catepsina O em carrapatos. Essa catepsina (*Contig2830*) é filogeneticamente próxima à uma proteína de *I. scapularis* que foi anotado como uma putativa cisteína protease e inibidor de protease. O grupo da catepsina O também formou dois distintos cladros na inferência filogenética: um grupo representado por peptidases de artrópodes, e o outro por sequências de aves e peixes (Figura 10).

A classe de serino peptidase formou dois distintos cladros não relacionados de carboxipeptidase e quimotripsina. O clado das carboxipeptidases (família S10 – grupo I de serino) divergiu a partir do mesmo ramo das legumainas (família C13), mas o ramo é fracamente suportado (Figura 10). A serino carboxipeptidase de *O. mimon* (*Contig3496*) foi filogeneticamente próxima a dipetidase de *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt, 1951) (Acari: Mesostigmata), enquanto que o transcrito *Contig5200* (legumaina) posicionou-se com um grupo irmão de legumainas de peixes, mamíferos e aves. As quimotripsinas (família S1- grupo II de serino) formaram um grupo irmão com as metalo aminopeptidases (grupo II de metalo peptidases). As serinos peptidases de *O. mimon*, *Contig4026* e *Contig5086*, são filogeneticamente próximas no clado das serinos peptidases de carrapatos.

As metalo peptidases também formaram dois cladros não correlacionados de dipeptidil peptidase III (família M49) mais dipeptidases específicas não citosólica (família M20) (grupo I das metalo peptidases) e de aminopeptidases (grupo II de metalo peptidases). Ambos transcritos (*Contig4173* e *Contig2690*) que pertencem ao grupo I das metalo peptidases são relativamente próximos as dipeptidases de *I. scapularis* (Figura 10). Porém, a aminopeptidase de *O. mimon* posicionou-se próximo das aminopeptidases de dípteros. As peptidases aspárticas formaram um grupo monofilético bem suportado representado pelas catepsinas D e proteases lisossomais aspárticas (família A1A – pepsina). Os transcritos *Contig3140* (catepsina D) e *Contig4774* (protease lisossomal aspártica) parecem ser relativamente próximos e foram incluídos no grupo das proteinases aspárticas de carrapatos (Figura 10).

5.8.2 Filogenia de carrapatos: árvore de espécies construída usando conjunto de dados de transcrito

O software *Get Homologues* identificou e selecionou 425 famílias de genes homólogos dos conjuntos de dados de transcritos de carrapatos. A árvore de espécies geradas a partir das 425 árvores de máxima verossimilhança dos transcritos homólogos dos transcritomas de carrapatos inferiu a relação filogenética das espécies destes acarinos (Figura 11). Nesta inferência filogenética, dois distintos clados monofiléticos das famílias de carrapatos (Argasidae e Ixodidae) foram estabelecidos (Figura 11). A espécie de ácaro *M. occidentalis* foi usada como grupo externo na análise filogenética. No clado da família da Argasidae, a subfamília Ornithodorinae foi composta pelas espécies dos gêneros *Ornithodoros* e *Antricola*. O gênero *Ornithodoros* é parafilético, formando dois grupos: Neotropical Ornithodorinae (*O. mimon* e *Antricola delacruzii* Estrada-Peña, Barros-Battesti and Venzal, 2004) e *Ornithodoros* sensu stricto (s.s.) (*O. parkeri*, *O. moubata*, *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 e *O. coriaceus*). No grupo Neotropical Ornithodorinae, as espécies *O. mimon* e *A. delacruzii* são filogeneticamente relacionadas, formando um grupo monofilético. A subfamília Argasinae foi composta pela espécie *Ar. monolakenis*.

O clado da família Ixodidae é dividido em dois distintos grupos: Metastriata e Prostriata. O grupo Metastriata é formado pelas subfamílias Rhipicephalinae (*R. microplus*, *R. appendiculatus*, *R. sanguineus*, *D. variabilis* e *D. andersoni*), Amblyomminae (*A. maculatum*, *A. variegatum*, *A. americanum* e *A. cajennense*) e Haemaphysalinae (*H. longicornis*). A espécie *H. longicornis* formou um grupo basal com os outros carrapatos metastriatos. O grupo Prostriata é representado somente pelo gênero *Ixodes* (subfamília Ixodinae).

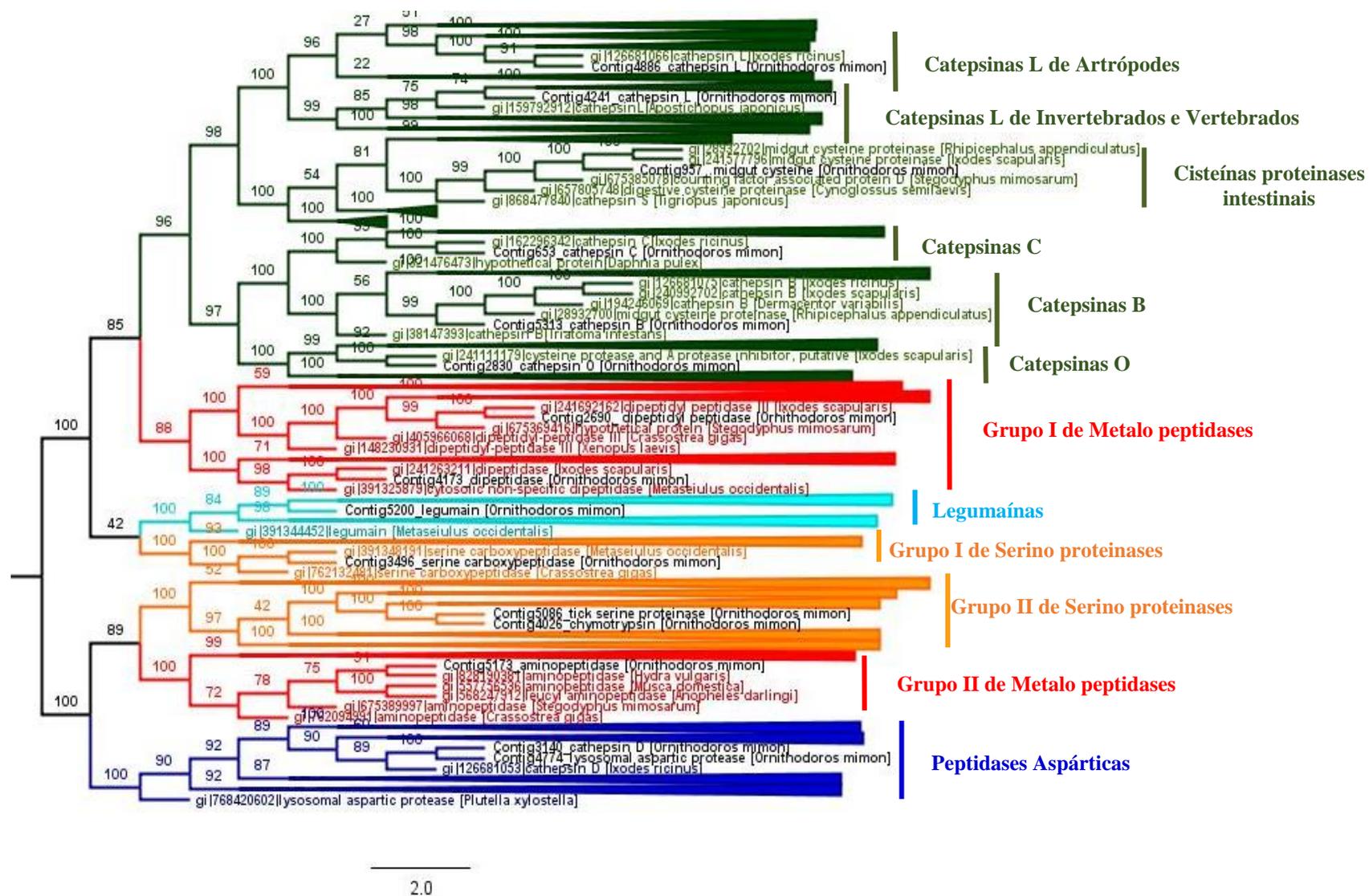


Figura 10. Árvore Filogenética de peptidases. Comparação filogenética de peptidases de *O. mimon* com as proteínas selecionadas que tiveram *hit* na busca do BLAST. A árvore foi construída usando o método de máxima verossimilhança e o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de peptidases. Os ramos de coloração verde e azul claro representam as cisteínas peptidases, enquanto que os ramos azul, vermelho e laranja são as proteínas aspártica, metalo e serino, respectivamente. Em preto estão destacadas as peptidases de *O. mimon*. O método de enraizamento foi o de *midpoint*.

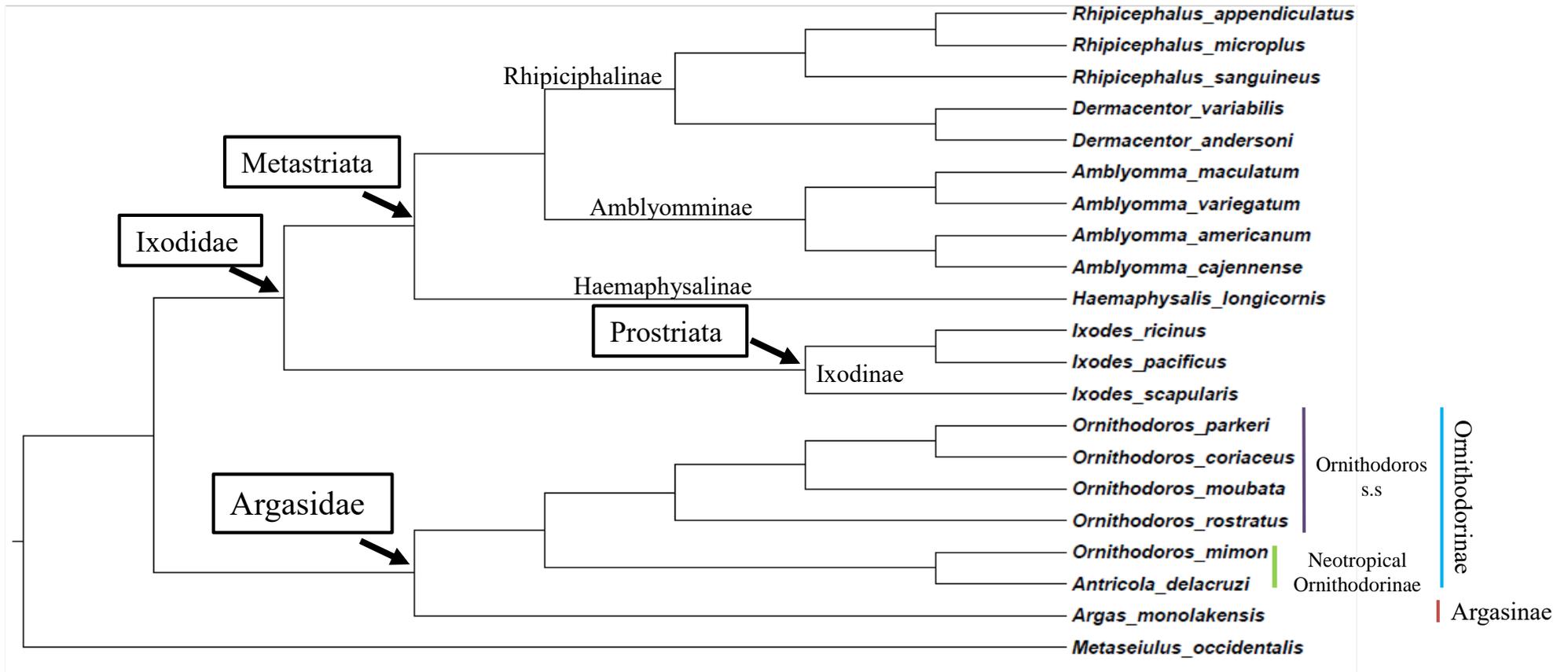


Figura 11. Relação filogenética de carrapatos baseado em 425 árvores de máxima verossimilhança dos transcritos homólogos dos carrapatos, construído no MuRF.

6 DISCUSSÃO

A análise do transcrito do intestino de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon* identificou diversos transcritos que podem estar associados com as funções do órgão. Os transcritos obtidos no presente estudo foram analisados e anotados funcionalmente conforme os melhores resultados de similaridade em relação às sequências depositadas nos bancos de dados gênicos e proteicos, como *GenBank* e *Uniprot*, propostos pelas ferramentas de busca automatizadas, BLASTX, BLASTP e BLAST2GO (ALTSCHUL et al., 1990, 1997; CONESA et al., 2005). A busca por analogia no BLAST identificou os *contigs* obtidos por meio de uma comparação de similaridade. A etapa de mapeamento do BLAST2GO recuperou os termos GO associados às sequências de interesse (*query*) no processo de busca do BLAST, e os utilizou, conforme a pontuação (*score*) final de cada termo escolhido, na fase de anotação para a atribuição funcional do termo GO ao *query* (CONESA; GÖTZ, 2008).

A maior parte dos transcritos foi completamente anotado usando a ferramenta BLAST2GO, com exceção de uma porcentagem (22,60%) que não apresentou similaridade com nenhuma sequência dos bancos de dados, mesmo alterando os padrões de busca do BLAST para menos estridentes. Na literatura, estas sequências completas são referidas como genes órfãos (*orphan genes*), e a proporção difere consideravelmente entre um genoma para outro (DUJON, 1996; SATOSHI; NISHIKAWA, 2004). Eles são abundantes entre os transcritos de carrapatos (GIBSON et al., 2013). Anderson et al. (2008) identificou 396 transcritos desconhecidos (47%) no transcrito do intestino de *D. variabilis*. Francischetti et al. (2008a,b) classificou 59% e 49% dos conjuntos de sequências como desconhecidos nos transcritos das glândulas salivares de *O. coriaceus* e *O. parkeri*, respectivamente. No sialotranscritoma de *I. scapularis*, 34 % dos seus transcritos pertencem à categoria desconhecido, enquanto que o sialoma de *A. variegatum* mostrou que a maioria dos genes (466) é de função desconhecida (RIBEIRO et al., 2006, 2011). Gibson et al. (2013) identificaram que aproximadamente 71% das sequências do transcrito de *A. americanum* falta similaridade com sequências dos bancos de dados. As principais razões para a falta de similaridade podem estar atribuídas a qualidade das sequências, a baixa qualidade da montagem, a ausência de função gênica, a isolamento taxonômica das espécies e a emergência de novos genes por duplicação e/ou mecanismos de transposição (TAUTZ; LOSO, 2011; GIBSON et al., 2013). Outra razão para a ocorrência do grupo desconhecido possa estar associada ao pouco número de estudos genômicos de carrapatos. Os transcritos que não apresentaram GO *hit* provavelmente são genes cuja função ainda não é totalmente conhecida ou simplesmente anotada pobremente.

A análise predita de sublocalização celular identificou uma baixa porcentagem de proteínas secretadas e de transmembrana, indicando que a maior parte dos constituintes proteicos de *O. mimon* é intracelular. Resultado similar foi observado por Anderson et al. (2008), que obtiveram uma pequena porcentagem de transcritos secretados entre os genes expressados no intestino da espécie *D. variabilis*. Cinquenta e três por cento dos transcritos diferencialmente expressos no transcrito do intestino de fêmeas de *R. microplus* foram classificados como intracelular e 18% como proteínas de membrana (HEEKIN et al., 2013a). Xu et al. (2016) identificaram que 56,05% dos transcritos intestinais de *H. flava* são pertencentes a componentes celulares, como a membrana.

Na análise por atribuição funcional, as atividades funcionais mais predominantes no conjunto de transcritos foram adesão e atividade catalítica, indicando que grande parte dos genes do intestino são enzimas e proteínas de interação (como canais, receptores e

transportadores). Assim como na análise automatizada, a categorização identificou que a categoria atividade catalítica foi prevalente, indicando que a maioria dos transcritos intestinais são proteínas enzimáticas, como oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Heekin et al. (2013a) também identificaram adesão e atividade catalítica como as mais comuns funções no transcrito do intestino de *R. microplus*. O mesmo foi observado por Xu et al. (2016) que classificaram 47, 25% e 42, 75% dos transcritos de *H. flava* nas categorias funcionais adesão e atividade catalítica, respectivamente, e a terceira categoria funcional mais representativa foi atividade de transportar. Transcritos associados com a categoria transportadores-canais foram abundantes, pois diversos transcritos com funções de adesão, proteínas carreadoras, receptores e canais, foram agrupadas na categoria. A categoria desconhecido foi abundante em termos do número de transcritos devido a muito transcritos sem função definida e que falta similaridade foram agrupadas dentro desta categoria.

Concomitantemente, os níveis de RPKM acumulado foram maiores nas categorias desconhecido, atividade catalítica e transportadores-canais. Diversos transcritos com altos níveis de RPKM são genes mitocondriais, como citocromo oxidase, sintase ATP e desidrogenase. Outra categoria que predominou entre os transcritos de alto nível de RPKM foi a categoria desconhecido. Alguns dos transcritos desconhecidos exibiram domínio conservado ou tiveram *hits* com proteínas hipotéticas que falta anotação funcional. Histonas, Hsp90, TCTP, zinc finger, β -tubulina, proteínas ribossomais e ciclofilina contemplaram os transcritos *tops50* do trato digestivo de *O. mimon*. Esses, somados aos genes mitocondriais de obtenção de energia, de maquinário de transcrição e tradução, de regulação nuclear e de fatores de transcrição e tradução, são provavelmente genes essenciais para a manutenção das funções básicas das células, sendo denominados de “*housekeeping*”, pois são frequentemente expressos para as atividades celulares (EISENBERG; LEVANON, 2013).

6.1 Transcritos envolvidos nas funções do intestino

Baseado no maquinário digestivo de hemoglobina de *I. ricinus* descrito por Horn et al. (2009) e Sojka et al. (2013), a digestão intracelular do repasto sanguíneo ocorre pela ação de enzimas proteolíticas lisossomais, como catepsinas do tipo cisteína e aspartica, leucina-aminopeptidase, legumainas e serinas peptidases. Conforme estes autores, a degradação inicial da hemoglobina nos carrapatos é realizada pela catepsina D, associadas as enzimas auxiliares, catepsina L e legumainas; e as catepsinas B e C clivam os grandes fragmentos de hemoglobina em dipeptídeos. Outras peptidases, como metalo e serino proteinases, ainda não tiveram o papel totalmente revelado na digestão, mas especula-se que as serinas carboxipeptidases e aminopeptidases possam participar clivagem para liberação de aminoácidos livres na digestão (HATTA et al., 2006; ANDERSON et al., 2008; HORN et al., 2009). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o maquinário digestivo dos carrapatos é presente na análise transcritômica de fêmeas ingurgitadas de *O. mimon*. Tdoos as proteinases digestivas descritas acima foram identificadas em diferentes níveis de expressão (RPKM), com as catepsinas B, D e L bem expressas no intestino das fêmeas ingurgitadas. Essas peptidases também foram identificadas nas análises transcritômicas do intestinos de *I. ricinus*, *D. variabilis* e *H. flava* (KOTSYFAKIS et al., 2015a; ANDERSON et al., 2008; XU et al., 2016), concordando assim com os nossos resultados.

Além do maquinário digestivo, os carrapatos tem um mecanismo de desintoxicação de heme através do acúmulo deste composto em organelas especializadas no epitélio intestinal, chamado de hemossomos (LARA et al., 2003). Essas organelas são formadas pelo transporte e entrega de proteínas carreadoras, como a

hemelipoglicoproteína, que são associadas ao heme (MAYA-MONTEIRO et al., 2000; LARA et al., 2003, 2005; DUPEJOVA et al., 2011). A hemelipoglicoproteína de *O. mimon* constitui de um transcrito de alto nível de RPKM, possivelmente indicando a expressão gênica em resposta a digestão do repasto sanguíneo, com o objetivo de acumular heme. Outro transcrito que pode estar associado com a absorção de nutriente é o gene de ferritina. Em respostas à exposição de ferro, células de insetos produzem moléculas de ferritinas de dois tipos, citosólica e secretada (GEISER et al., 2006). O transcrito de ferritina foi bem expresso nas fêmeas ingurgitadas de *O. mimon*, possivelmente em resposta ao sangue do hospedeiro, que é rico em ferro. Moléculas de cDNA de ferritina de duas espécies de carrapatos (*O. moubata* e *I. ricinus*) foram caracterizadas e essas moléculas não demonstraram evidências de serem proteínas secretadas, indicando que sejam proteínas citoplasmáticas (KOPÁČEK et al., 2003). Estes achados estão de acordo com o resultado do presente estudo, pois o transcrito de ferritina de *O. mimon* não exibiu nenhum sinal preditivo de secreção. O ferro é uma substância derivada da degradação da hemoglobina presente no repasto sanguíneo, que resulta em componentes que servem como nutrientes para os carrapatos alimentarem, desenvolverem e reproduzirem. A ferritina é frequentemente encontrada nas análises de mialomas e sialomas transcritomas de carrapatos (ANDERSON et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012; KOTSYFAKIS et al., 2015).

O intestino dos carrapatos também expressa enzimas que digerem outros constituintes do repasto sanguíneo, como carboidratos e lipídios (MORETI et al., 2013; KOTSYFAKIS et al., 2015). Transcritos de carbohidrases foram identificadas no trato digestivo de *O. mimon*, dos quais quitinases e alfa-glicosidases foram os mais prevalentes. O papel destas enzimas na digestão não tem sido totalmente compreendido e há poucos estudos sobre isto. Porém, por outro lado, a atividade de carbohidrases, como glucosaminidase, quitinase e fucosidase, no conteúdo intestinal de *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*) foi recentemente identificada e caracterizada, e foi sugerido que a digestão dos carboidratos ocorre no lúmen intestinal, diferentemente da digestão intracelular da proteína (MORETI et al., 2013).

Inibidores de proteases são expressos tanto nas glândulas salivares como no intestino de carrapatos (KOPÁČEK et al., 2010). A função destes inibidores nestes acarinos não está totalmente esclarecida; porém, Mulenga et al. (2001; 2003) e Tirloni et al. (2014) sugerem que inibidores, como serpinas, podem ser utilizadas pelos carrapatos para regular a atividade das endopeptidases e a hemostasia. Segundo Imamura et al. (2005), os inibidores de peptidases são apontados como eficientes antígenos para elaboração de vacinas, pois são genes essenciais para a sobrevivência dos carrapatos, uma vez que estariam associados com processos endógenos, como regulação da coagulação da hemolinfa. Inibidores de serino peptidases do tipo Kunitz são conhecidos por atuarem na defesa do intestino contra infecções de rickettsiais e/ou protegendo as células de carrapatos contra acaricidas (KOPÁČEK et al., 2010). Além dos inibidores Kunitz de carrapatos, identificamos um cDNA de veneno de serpente inibidor de protease no intestino de *O. mimon*, que demonstrou similaridade com sequências de inibidores Kunitz de serpentes.

Schwarz et al (2012) citaram que as cistatinas de carrapatos atuam como reguladores da digestão do repasto sanguíneo e como moduladores da resposta imune do hospedeiro. Além disso, essas cistatinas participam da imunidade inata do carrapato através da inibição de enzimas específicas de microrganismos, sendo assim potenciais alvos de interesse para elaboração de drogas e vacinas (KOPÁČEK et al., 2010). Grunclóva et al. (2006) reportaram pela primeira vez a existência de duas cistatinas de carrapatos da família Argasidae. A cistatina tipo I é citosólica e a tipo II é secretada, e

essas divergem bastante das cistatinas de outros invertebrados, vertebrados e plantas (SCHWARZ et al., 2012). As cistatinas de *O. mimon* não apresentaram sinal para via de secreção, indicando que podem ser pertencentes ao tipo I. Porém, essas apresentaram similaridade com sequências de cistatinas de *O. moubata*, que conforme Grunclóva et al. (2006) é do tipo II, ou seja, secretada. É possível que o algoritmo SignalP não identificou o peptídeo sinal nas sequências de cDNA das cistatinas de *O. mimon*. Outro transcrito inibidor de cisteína peptidase é a tiropina. Esse não tem a função totalmente conhecida, mas o transcrito de tiropina de *O. mimon* ficou entre os *top 10* genes mais expressivos no trato digestivo desta espécie.

No transcrito de *O. mimon*, identificou-se somente a isoforma de defensina A, que é comum nas espécies de *Ornithodoros* (CHRUDIMSKÁ et al., 2010). Os principais transcritos associados à categoria imunidade foram defensina e lisozima. Ambos transcritos têm sido identificados no intestino de *O. moubata* e tiveram as suas atividades antibacterianas comprovadas, tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (KOPÁČEK et al., 1999, 2010; NAKAJIMA et al., 2002a,b). Nakajima et al. (2001, 2002a, b) identificaram quatro isoformas bastante similares de defensinas (A, B, C e D) em *O. moubata*, que são reguladas em resposta ao repasto sanguíneo. Similarmente, Chrudimská et al. (2010) identificaram as mesmas isoformas em outras espécies de *Ornithodoros* e em ixodídeos, sendo que a quantidade variou entre as espécies. Os carrapatos têm um eficiente mecanismo de proteção dentro do intestino que combate e impede o desenvolvimento de microrganismos no repasto sanguíneo, assegurando assim o recurso nutritivo (GRUNCLÓVA et al., 2003).

De maneira diferente, mas também envolvidos na imunidade dos carrapatos, os transcritos associados ao metabolismo oxidativo, como glutathione-S-transferase (*gst*) e fosfolípido-hidroperóxido glutathione peroxidase, são conhecidos por atuarem na desintoxicação celular causada pelos acaricidas. Dessa forma, participam na resistência dos carrapatos aos produtos químicos de controle, como os organofosforados (HE et al., 1999; COSSÍO-BAYÚGAR et al., 2005; DUSCHER et al., 2014). Genes de *gst* de *O. mimon* são membros pertencentes às classes Delta, Epsilon e Mu. Segundo Shahein et al. (2013), as duas primeiras classes são específicas da ordem Insecta, enquanto que a classe Mu é de mamíferos. Reddy et al. (2011) identificaram as mesmas classes (Delta, Epsilon e Mu) e outros genes de *gst* no genoma de *I. scapularis*, e citaram que as classes Delta e Epsilon podem exibir a mesma função de desintoxicação encontrada em mosquitos contra inseticidas.

6.2 Filogenia

A inferência da relação filogenética das peptidases digestivas demonstrou que as proteinases de *O. mimon* são relativamente próximas as proteinases de carrapatos. Esta relação pode ser uma evidência que os transcritos digestivos de *O. mimon* são atuantes no maquinário digestivo de hemoglobina, principalmente as catepsinas B, C, D e L. Além disso, essas catepsinas foram claramente classificadas em distintos grupos monofiléticos que foram fortemente suportados. Os distintos clados de catepsinas foram também identificados na análise da atividade digestiva do intestino de *I. ricinus* (SOJKA et al., 2008). Com base na inferência filogenética obtida no presente estudo, sugere-se que os diferentes transcritos de catepsina L de *O. mimon* passaram por distintos processos evolutivos. O transcrito *Contig4241* pode ter divergido de catepsinas L de vertebrados, formando um clado moderadamente suportado (*bootstrap* de 74), enquanto que o gene *Contig4886* aparentemente evoluiu de um gene ancestral comum ao gene de carrapatos. A catepsina O de *O. mimon* divergiu das catepsinas de artrópodes e formou um grupo monofilético com cisteína proteinase de *I. scapularis*. Assim, é possível assumir que essa

proteína de *I. scapularis* possa ser também uma catepsina O. Portanto, registrou-se a presença desta lisossomal papaína cisteína endopeptidase (catepsina O) em carrapatos pela primeira vez.

Os grandes grupos de peptidases, como serinos, cisteínas e metalo, demonstraram serem parafiléticos. Barrett e Rawlings (1995, 1996) e Rawlings e Barret (1993) já apresentaram evidências que as peptidases do tipo serino, metalo e cisteína tem separadas origens evolucionárias, formando particulares e separadas famílias dentro das classes de enzimas proteolíticas. Rawlings e Barrett (1993) usa o termo família para descrever um grupo de enzimas em que cada membro demonstram relação evolucionária, e clã para definir as famílias que compartilham um ancestral em comum.

Na análise filogenética, as famílias S1 (Clan A) e S10 (Clan C) de serino proteinases, quimotripsina e carboxipeptidase, respectivamente, não são filogeneticamente relacionadas e provavelmente tem origens evolutivas separadas. Similar observação foi detectada para a classe de metalo peptidase, no qual dois distintos grupos filogenéticos foram identificados. Um dos grupos foi representado por aminopeptidases pertencentes a família M17, que é filogeneticamente relacionado com as quimotripsinas (família S1), enquanto que o outro grupo compreende as famílias M20 e M49, que são as dipeptidases e dipeptidil peptidases, respectivamente, e que compartilham um ancestral comum. A classe de cisteína peptidase também formou dois cladões não relacionados, com as famílias C1 (catepsinas) e C13 (legumaínas). A família C1 compartilha um gene ancestral com o grupo I de metalo peptidases (dipeptidases e dipetidilpeptidase), e C13 é um grupo irmão da família S10 (carboxipeptidase). Diferentemente das outras classes de peptidases, as proteinases pertencentes à classe aspártica formaram um grupo monofilético, provavelmente devido os transcritos selecionados no presente estudo pertencerem à mesma família A1.

A análise filogenética de carrapatos, baseada na união e estimação de 425 árvores de máxima verossimilhança de transcritos homólogos, foi bastante similar a recente inferência feita por Burger et al. (2014), que construíram uma filogonia molecular baseada em sequências do genoma mitocondrial e em sequências nucleares de rRNA. Ambas inferências filogenéticas identificaram o gênero *Ornithodoros* como parafilético, com os carrapatos Neotropicais associados a morcegos (*O. mimon* e *A. delacruzii*) no grupo Neotropical Ornithodorinae e as outras espécies de *Ornithodoros* em *Ornithodoros s. s.* Klompen e Oliver (1993) já tinham proposto o parafilético de *Ornithodoros* por análises filogenéticas de caracteres morfológicos e de desenvolvimento. Estes autores modificaram a sistemática e taxonomia da família Argasidae através da elevação do subgênero *Carios* para gênero, adicionando nesse novo gênero os carrapatos associados com morcego pertencentes aos gêneros *Antricola* e *Nothoaspis*, e aos subgêneros de *Ornithodoros* (*Alectorobius*, *Subparmatius* e *Reticulinus*) e *Argas* (*Chiropterargas* e *Carios*). As modificações propostas por Klompen e Oliver (1993) foram adotadas por alguns taxonomistas (HORAK et al., 2002; BAKER; MURREL, 2004; LABRUNA et al., 2008; BARRROS-BATTESTI et al., 2011), porém outros autores (LABRUNA et al., 2008; VENZAL et al., 2006, 2008; NAVA et al., 2009, 2010; ESTRADA-PEÑA et al., 2010) questionam a posição de *Antricola* e *Nothoaspis*, e revalidaram estes como gêneros em diferentes análises filogenéticas. No entanto, assim como Klompen e Oliver (1993) e Burger et al. (2014), outros estudos na região Neotropical sugerem a próxima relação filogenética entre os gêneros *Antricola* e *Ornithodoros* (*Alectorobius*) (ESTRADA-PEÑA et al., 2006; LABRUNA et al. 2008; VENZAL et al. 2012, 2015; BARROS-BATTESTI et al. 2011, 2015; NAVA et al. 2009). Em todas estas inferências os membros de *Antricola* e *Ornithodoros* (*Alectorobius*) formam dois distintos grupos monofiléticos que compartilham um ancestral em comum. O grupo *Ornithodoros s. s.* compreende as

verdadeiras espécies de *Ornithodoros* dentro da subfamília Ornithodorinae baseado na classificação de Klompen e Oliver (1993), que na análise filogenética do presente estudo, são representadas por *O. parkeri*, *O. moubata*, *O. coriaceus* e *O. rostratus*. Burger et al. (2014) também identificaram as mesmas espécies e outras *Ornithodoros* sp dentro de *Ornithodoros* s. s., concordando com os nossos achados. Desta maneira, a nossa inferência filogenética concorda com a proposta de Burger et al. (2014) para os grupos Neotropical Ornithodorinae e *Ornithodoros* s. s. na família Argasidae.

No clado da família Ixodidae, as espécies de *Rhipicephalus* (*R. microplus*, *R. appendiculatus* e *R. sanguineus*) formaram um grupo irmão com os membros de *Dermacentor* (*D. variabilis* e *D. andersoni*), suportando assim a subfamília Rhipicephalinae citada por Black et al. (1997) e Barker e Murrell (2003). Na inferência filogenética do presente estudo, Rhipicephalinae é grupo irmão de Amblyomminae, enquanto que Haemaphysalinae forma um grupo basal em Metastrata. Há controvérsias na posição filogenética destas subfamílias e gêneros (NAVA et al., 2009). Crampton et al. (1996), Black et al. (1997) e Mangold et al. (1998) inferiram que há uma próxima relação entre Rhipicephalinae e Haemaphysalinae, sendo Amblyomminae um grupo basal às outras famílias. No entanto, Black e Piesman (1994) construíram uma filogenia baseada em 16s rDNA em que Amblyomminae e Haemaphysalinae ocorrem no mesmo ramo, mas com Amblyomminae sendo parafilético, com as espécies *A. americanum* e *A. cajennense* próximos de Rhipicephalinae, e *A. variegatum* e *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 relacionados com Haemaphysalinae. Dobson e Barker (1999) também identificaram o parafiletismo de Amblyomminae, sendo esta subfamília grupo irmão de Rhipicephalinae. O resultado do presente estudo demonstrou uma topologia similar as de Black e Piesman (1994) e Dobson e Barker (1999), e discordou do restante das inferências anteriores da família Ixodidae.

Desta maneira, conclui-se que os transcritos de transcritoma de carrapatos são um recurso viável para demonstrar, inferir e avaliar a relação filogenética dos carrapatos, com uma resolução similar a outros conjuntos de dados, como genoma mitocondrial e rRNA nuclear. Porém, destaca-se a necessidade de mais estudos transcritômicos de carrapatos, principalmente com os argasídeos, para aperfeiçoar a resolução do conjunto de dados transcritômicos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise transcritômica do presente trabalho é o primeiro estudo transcritômico do intestino de uma espécie de carrapato argasídeo da fauna brasileira. Desta maneira, o presente estudo contribui para um melhor entendimento dos transcritos intestinais dos carrapatos, pois forneceu informações de transcritos relacionados à importantes processos dos carrapatos, como a digestão, nutrição e imunidade, e adicionou aos bancos de dados públicos genômicos diversas sequências transcritômicas da espécie de argasídeo. Porém, é necessário constatar a necessidade de um estudo transcritômico comparativo entre espécimes alimentados e não alimentados para confirmar o perfil expressivo do tecido intestinal, uma vez que no presente estudo foi analisado somente uma condição de expressão (ingurgitado). Além disso, estudos proteômicos aumentaram a compreensão das funções biológicas, bioquímicas e fisiológicas dos transcritos intestinais, fornecendo informações que podem ser o ponto de partida para a descoberta de novas moléculas alvos para o desenvolvimento de medidas alternativas de controle de carrapatos.

8 CONCLUSÃO

1) A análise transcritômica do intestino de *O. mimon* infere que importantes genes associados com a função do intestino, como a digestão do repasto sanguíneo e nutrição de carrapatos, estão presentes em fêmeas ingurgitadas da espécie de estudo.

2) O conjunto de dados de transcritos serviu como uma fonte viável para a inferência filogenética de espécies de carrapatos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **International journal for parasitology**, v.15, n. 2, p. 147-157, 1985.

ALARCON-CHAIDEZ, F. J.; SUN, J.; WIKEL, S. K. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 48-71, 2007.

ALJAMALI, M. N.; HERN, L.; KUPFER, D.; DOWNARD, S.; SO, S.; ROE, B. A.; ESSENBERG, R. C. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Insect molecular biology**, v. 18, n. 2, p. 129-154, 2009.

ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5350-5354, 1977.

ANATRIELLO, E.; RIBEIRO, J. M.; DE MIRANDA-SANTOS, I. K.; BRANDÃO, L. G.; ANDERSON, J. M.; VALENZUELA, J. G.; FERREIRA, B. R. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 450, 2010.

AMORIM, D. S. Tempo e Forma: Plesiomorfia e Apomorfia. In: AMORIM, D. S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Holos, 2002. p.19-29.

ANDERSON, J. M.; SONENSHINE, D. E.; VALENZUELA, J. G. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **BMC Genomics**, v. 9, n.1, p. 552, 2008.

AKOV, S.; SAMISH, M.; GALUN, R. Protease activity in female *Ornithodoros tholozani* ticks. **Acta tropica**, v. 33, n. 1, p. 37-52, 1975.

AKOV, S. Blood digestion in ticks. In: OBENCHAIN, F.; GALUN, R (eds). **Physiology of ticks**, Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford OX3 0BW, England, 1982. p.197-211.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 3, p. 935, 1986.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 2, p. 247-250, 1995.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of cysteine peptidases. **Perspectives in drug discovery and design**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 1996.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, p. 15-36, 2004.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado Para Identificação de Espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. p 5-7.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L.H.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B. *Carios mimon* (Acari: Argasidae): description of adults and redescription of larva. **Experimental and applied acarology**, v. 54, n. 1, p. 93-104, 2011.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, v. 3178, v. 31, p. 22-32, 2012.

BARROS-BATTESTI, D. M., RAMIREZ, D. G., LANDULFO, G. A., FACCINI, J. L. H., DANTAS-TORRES, F., LABRUNA, M. B., ... & ONOFRIO, V. C. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 443-456, 2013.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n.1, p. 1-11, 2015.

BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.

BARKER, Stephen C.; MURRELL, Anna. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. In: *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. Springer Netherlands, 2003. p. 55-68.

BECKER-ANDRE, M.; HAHLBROCK, K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). **Nucleic acids research**, v. 17, n. 22, p. 9437-9446, 1989.

BLACK, W. C.; KLOMPEN, J. S. H.; KEIRANS, J. E. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 7, n. 1, p. 129-144, 1997.

- BIOR, A. D.; ESSENBERG, R. C.; SAUER, J. R. Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 6, p. 645-655, 2002.
- BOGIN, E.; HADANI, A. Digestive enzymes in “hard ticks”(ixodoidea, ixodidae). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 41, n. 2, p. 139-146, 1973.
- BOLDBAATAR, D.; SIKASUNGE, C. S.; BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 1, 25-36, 2006.
- BOLDBAATAR, D.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; LIAO, M.; TANAKA, T.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 11, p. 1587-1598, 2010.
- BOWNAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 277-285, 1997.
- BOWMAN, A. S.; SAUER, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S67-S81, 2004.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p.10034-10038, 1994.
- BRAZ, G. R.; COELHO, H. S.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology**, v. 9, n. 13, p. 703-706, 1999.
- BURGER, T. D.; SHAO, R.; LABRUNA, M. B.; BARKER, S. C. Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 2, p. 195-207, 2014.
- CARVALHO, M. C. D. C. G.; SILVA, D. C. G. D. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.
- CHAUDHARY, R.; BURLEIGH, J. G.; FERNÁNDEZ-BACA, D. Inferring species trees from incongruent multi-copy gene trees using the Robinson-Foulds distance. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 28, 2013.
- CHMELÁŘ, J.; ANDERSON, J. M.; MU, J.; JOCHIM, R. C.; VALENZUELA, J. G.; KOPECKÝ, J. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 233, 2008.

CHRUDIMSKÁ, T., CHRUDIMSKÝ, T., GOLOVCHENKO, M., RUDENKO, N., & GRUBHOFFER, L. New defensins from hard and soft ticks: Similarities, differences, and phylogenetic analyses. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2, p. 298-303, 2010.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International journal of plant genomics**, v. 2008, 2008.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7696-7701, 2013.

COSTA, V.; ANGELINI, C.; DE FEIS, I.; CICCODICOLA, A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. **BioMed Research International**, v. 2010, n. 1, p.207-247, 2010.

COSSÍO-BAYÚGAR, R.; MIRANDA, E.; HOLMAN, P. J. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 12, p. 1378-1387, 2005.

CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S. C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 5, p. 511-517, 1996.

DANTAS-TORRES F.; ONOFRIO V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The Ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, p. 30-46, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J. M.; BERNARDI, L. F. O.; FERREIRA, R. L.; ONOFRIO, V. C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S. E.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 36-45, 2012.

DÍAZ-MARTÍN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; OLEGA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: An update. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 3, p. 211-220, 2015.

DÍAZ-MARTÍN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; VALERO, L.; OLEGA, A.; ENCINAS-GRANDES, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. **Journal of proteomics**, v. 80, p. 216-235, 2013.

DOBSON, S. J.; BARKER, S. C. Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus *Aponomma* Is Paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 288-295, 1999.

DUGGAN, D. J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature genetics**, v. 21, p. 10-14, 1999.

DUJON, B. The yeast genome project: what did we learn? **Trends Genetics**, v. 12, n.7, p. 263-27, 1996.

DUPEJOVA J, STERBA J, VANCOVA M, GRUBHOFFER L. Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 4, 2011.

DUSCHER, G. G.; GALINDO, R. C.; TICHY, A.; HUMMEL, K.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Glutathione S-transferase affects permethrin detoxification in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 3, p. 225-233, 2014.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 214, 2007.

EISEN, J. A. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 163-167, 1998.

EISEN, J. A.; WU, M. Phylogenetic analysis and gene functional predictions: phylogenomics in action. **Theoretical population biology**, v. 61, n. 4, p. 481-487, 2002.

EISENBERG, E.; LEVANON, E. Y. Human housekeeping genes, revisited. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 569-574, 2013.

EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A. S. Examination of the internal morphology of the ixodid tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “how-to” pictorial dissection guide. **Midsouth Entomol**, v. 2, n. 1, p. 28-39, 2009.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; TRAJANO, E.; FIRMINO, J. V. L. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae) from Brazil, with a key for the known species in the genus. **The Journal of Parasitology**, v. 90, p. 490–498, 2004.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MANGOLD, A. J.; Guglielmo, A. A. Notes on New World Persicargas ticks (Acari: Argasidae) with description of female *Argas* (P.) *keiransi*. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 5, p. 801-809, 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the Systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). **Acarologia**, v. 50, n. 3, p. 317-333, 2010.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. NBL Editora, 1973.

FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N.; LANE, R. S.; RIBEIRO, J. M. The transcriptome of the salivary glands of the

female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 10, p. 1142-1161, 2005.

FRANCISCHETTI, I. M.; MENG, Z.; MANS, B. J.; GUDDERRA, N.; HALL, M.; VEENSTRA, T. D.; RIBEIRO, J. M. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 5, p. 493-512, 2008a.

FRANCISCHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MENG, Z.; GUDDERRA, N.; VEENSTRA, T. D.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. **Insect biochemistry and molecular biology**, 38(1), 1-21, 2008b.

FRANCISCHETTI, I. M.; ANDERSON, J. M.; MANOUKIS, N.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. An insight into the sialotranscriptome and proteome of the coarse bontlegged tick, *Hyalomma marginatum rufipes*. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2892-2908, 2011.

FRANTA, Z.; FRANTOVÁ, H.; KONVICKOVA, J.; HORN, M.; SOJKA, D.; MARES, M.; KOPACEK, P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Parasit Vectors**, v. 3, p. 119, 2010.

GABALDÓN, T.; KOONIN, E. V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 5, p. 360-366, 2013.

GARCIA, G. R.; GARDINASSI, L. G.; RIBEIRO, J. M.; ANTRIELLO, B.; FERREIRA, B. R.; MOREIRA, H. N. S.; MAFRA, C.; MARTINS, M. M.; SZABÓ, M. P. J.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; MARUYAMA, S. R. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasit Vectors**, v. 7, n. 1, p. 430, 2014.

GEISER, D. L.; ZHANG, D.; WINZERLING, J. J. Secreted ferritin: mosquito defense against iron overload? **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 3, p. 177-187, 2006.

GIBSON, A. K.; SMITH, Z.; FUQUA, C.; CLAY, K.; COLBOURNE, J. K. Why so many unknown genes? Partitioning orphans from a representative transcriptome of the lone star tick *Amblyomma americanum*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 135, 2013.

GONZALEZ RIVAS, C. J.; CASTILLO, G. N.; ACOSTA, J. C.; VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. **Cuadernos de herpetología**, v. 26, n. 2, p. 95-97, 2012.

GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; WILLIAMS, T. D.; NAGARAJ, S. H.; NUEDA, M. J.; ROBLES, M.; TALÓN, M.; DOPAZO, J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: methodology and application. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 8, p. e11, 2013.

GRANDJEAN, O.; AESCHLIMANN, A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea, Argasidae). **Acta tropica**, v. 30, n. 4, p. 193, 1973.

GRANDJEAN, O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton females (Ixodoidea: Argasidae) II. Modifications of midgut cells related to the digestive cycle and to the triggering action of mating. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 58, n. 5, p. 493-514, 1982.

GRANDJEAN, O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray Sensu stricto Walton (Ixodoidea: Argasidae) females. I: Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. **Acarologia**, v. 25, n. 2, p. 147-165, 1984.

GRANJENO-COLIN, G.; HERNANDEZ-ORTIZ, R.; MOSQUEDA, J.; ESTRADA-MONDACA, S.; FIGUEROA, J. V.; GARCIA-VAZQUEZ, Z. Characterization of a vitellogenin gene fragment in *Boophilus microplus* ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 58-61, 2008.

GRUNCLOVÁ, L.; FOUQUIER, H.; HYPSE, V.; KOPÁČEK, P. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 8, p. 651-660, 2003.

GRUNCLOVA, L.; HORN, M.; VANCOVA, M.; SOJKA, D.; FRANTA, Z.; MAREŠ, M.; KOPÁČEK, P. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. **Biological chemistry**, v. 387, n. 12, p. 1635-1644, 2006.

GUDDERRA, N. P.; SONENSHINE, D. E.; APPERSON, C. S.; ROE, R. M. Tissue distribution and characterization of predominant hemolymph carrier proteins from *Dermacentor variabilis* and *Ornithodoros parkeri*. **Journal of insect physiology**, v. 48, n. 2, p. 161-170, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. **A special publication sponsored by International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-2)**. Atalanta, Houten, The Netherlands. ISBN 987-43-6828-4, hardbound, p. 173, 2003.

GUGLIOMONE, A. A.; ROBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v.2528, p. 1-28, 2010.

HATTA, T.; KAZAMA, K.; MIYOSHI, T.; UMEMIYA, R.; LIAO, M.; INOUE, N.; XUAN, V.; TSUJI, N.; FUJISAKI, K. Identification and characterisation of a leucine aminopeptidase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 10, p. 1123-1132, 2006.

- HATTA, T.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; ALIM, M. A.; ISLAM, M. K.; FUJISAKI, K. Leucine aminopeptidase in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*: endogenous expression profiles in midgut. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 5, p. 589-594, 2009.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 8, p. 737-743, 1999.
- HEEKIN, A. M.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SALDIVAR, L.; SCOLES, G. A.; DOWD, S. E.; NENE, V.; DJIKENG, A.; BRAYTON, K. A. Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a Babesia bovis-infected bovine host. **Parasitology research**, v. 112, n. 9, 3075-3090, 2013a.
- HEEKIN, A. M.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SALDIVAR, L.; SCOLES, G. A.; DOWD, S. E.; NENE, V.; DJIKENG, A.; BRAYTON, K. A. The ovarian transcriptome of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a bovine host infected with Babesia bovis. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 276, 2013b.
- HEAD, S. R.; KOMORI, H. K.; LAMERE, S. A.; WHISENANT, T.; VAN NIEUWERBURGH, F.; SALOMON, D. R.; ORDOUKHANIAN, P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. **Biotechniques**, v. 56, n. 2, p. 61, 2014.
- HENNIG, W. Phylogenetic systematics. **Annual review of entomology**, v. 10, n. 1, p. 97-116, 1965.
- HODCROFT, E.; HADFIELD, J. D.; FEARNHIL, E.; PHILLIPS, A.; DUNN, D.; O'SHEA, S.; PILLAY, D. The contribution of viral genotype to plasma viral set-point in HIV infection. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004112, 2014.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. 8, p.135-238, 1985.
- HORN, M.; NUSSBAUMEROVÁ, M.; SANDA, M.; KOVÁROVÁ, Z.; SRBA, J.; FRANTA, Z.; SOJKA, D.; BOYO, M.; CAFFREY, C. R.; KOPÁCEK, P.; MARES, M. Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics. **Chemistry & Biology**, v. 16, n.10, p. 1053-1063, 2009.
- HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 27-54, 2002.
- IMAMURA, S.; JUNIOR, I. S. V.; SUGINO, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, n. 10, p.1301-1311, 2005.

LABRUNA, M. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; BRANDÃO, P. E.; RIBEIRO, A. F.; ESTRADA-PENÑA, A. New reports of *Antricola guglielmonei* and *Antricola delacruzii* in Brazil, and a description of a new argasid species (Acari). **The Journal of Parasitology**, v. 94, p.788–792, 2008.

LABRUNA, M. B.; MARCILI, A.; ORGRZEWALSKA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; DANTAS-TORRES, F.; FERNANDES, A. A.; LEITE, R. C.; VENZAL JM. New records and human parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil, **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 283:287, 2014.

LABRUNA, M.; VENZAL, J. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 4, p. 355-363, 2009.

LANDULFO, Gabriel Alves. **Estudo do Ciclo Biológico de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) em condições de laboratório**. 2012. 32p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

LANDULFO, G. A.; PEVIDOR, L. V.; SAMPAIO, J. S.; LUZ, H. R.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in laboratory conditions. **Experimental Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 69-80, 2012.

LANDULFO, G. A.; PEVIDOR, L. V.; LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; NUNES, P. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Description of nymphal instars of *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 (Acari: Argasidae). **Zootaxa**, v. 3710, n. 2, p. 179-191, 2013.

LARA, F. A.; LINS, U.; PAIVA-SILVA, G.; ALMEIDA, I. C.; BRAGA, C. M.; MIGUENS, F. C.; DANSA-PETRETSKI, M. A. new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 10, p. 1707-1715, 2003.

LARA, F. A.; LINS, U.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 16, p. 3093-3101, 2005.

LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome research**, v. 13, n. 9, p. 2178-2189, 2003.

KARCZEWSKI, J.; WAXMAN, L.; ENDRIS, R. G.; CONNOLLY, T. M. An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 208, n. 2, p. 532-541, 1995.

KARIM, S.; SINGH, P.; RIBEIRO, J. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. 28525, 2011.

- KATOH, K.; KUMA, K. I.; TOH, H.; MIYATA, T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 2, p. 511-518, 2005.
- KAUFMAN WR. Ticks: physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2010.
- KOH, K.; SHIRAIISHI, S.; UCHIDA, T. A. Digestion of bloodmeal protein after detachment in nymphal *Haemaphysalis longicornis*. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 34, n. 3, p. 241-246, 1990.
- KOHL, G. M.; CLIFFORD, C. M.; JONES, E. K. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). IV. Eight new species of *Ornithodoros* from the Western Hemisphere. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 5, p. 1035-1043, 1969.
- KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; ZHU, Y.; PEARSON, R.; GOUGH, J.; COLGRAVE, M. L. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 2, p. 212-226, 2010.
- KOPÁČEK, P.; VOGT, R.; JINDRÁK, L.; WEISE, C.; SAFARÍK, I. Purification and characterization of the lysozyme from gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 29, n. 11, p. 989-997, 1999.
- KOPÁČEK, P.; ŽDYCHOVÁ, J.; YOSHIGA, T.; WEISE, C.; RUDENKO, N.; LAW, J. H. Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species—*Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 1, p. 103-113, 2003.
- KOPÁČEK, P.; HAJDUŠEK, O.; BUREŠOVÁ, V.; DAFFRE, S. Tick innate immunity. In: **Invertebrate Immunity**. Springer US, 2010. p. 137-162.
- KOTSYFAKIS, M., SCHWARZ, A.; ERHART, J.; RIBEIRO, J. M. C. Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. **Scientific reports**, v. 5, p. 9103, 2015a.
- KOTSYFAKIS, M.; KOPÁČEK, P.; FRANTA, Z.; PEDRA, J. H.; RIBEIRO, J. M. (2015). Deep Sequencing Analysis of the *Ixodes ricinus* Haemocytome. **Plos one**, v. 13, n. 9, e0003754, 2015b.
- KLOMPEN, J. S. H.; OLIVER, Jr. J. H. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). **Systematic Entomology**, v. 18, p. 313-331, 1993.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
- MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 84, n. 1, p. 31-37, 1997.

- MANS, B. J.; VENTER, J. D.; COONS, L. B.; LOUW, A. I.; NEITZ, A.W.H.A. Reassessment of argasid tick salivary gland ultrastructure from an immune cytochemical perspective. **Experimental & applied acarology**, v. 33, n. 1-2, p. 119-129, 2004.
- MANS, B. J.; ANDERSEN, J. F.; FRANCISCHETTI, I. M.; VALENZUELA, J. G.; SCHWAN, T. G.; PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M. (2008). Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 42-58, 2008.
- MAYA-MONTEIRO, C. M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F. A.; ALVES, E. W.; CAPURRO, M. L.; OLIVEIRA, P. L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36584-36589, 2000.
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 9, p. 387-402, 2008.
- MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671-682, 2011
- MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current opinion in chemical biology**, v. 17, n. 1, p. 4-11, 2013.
- MENDIOLA, J.; ALONSO, M.; MARQUETTI, M. C.; FINLAY, C. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. **Experimental parasitology**, v. 82, n.1, p. 27-33, 1996.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.
- MILLER, J. R.; KOREN, S.; SUTTON, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v. 95, n. 6, p. 315-327, 2010.
- MIRANDA SANTOS, I. K. F. VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C.; CASTRO, M.; COSTA, J. N.; MARIA COSTA, A.; SILVA, E. R.; REGO NETO, O. B.; ROCHA, C.; DAFFRE, S.; FERREIRA, B. R.; DA SILVA, J. S. SZABÓ, M. P.; BECHARA, G. H. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 242-246, 2004.
- MIYOSHI, T.; TSUJI, N.; ISLAM, M. K.; ALIM, M. A.; HATTA, T.; HUANG, X.; FUJISAKI, K. A set of serine proteinase paralogs are required for blood-digestion in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **Parasitology international**, v. 57, n 4, p. 499-505, 2008.
- MORETI, R.; PERRELLA, N. N.; LOPES, A. R. Carbohydrate digestion in ticks and a digestive α -l-fucosidase. **Journal of insect physiology**, v. 59, n. 10, p. 1069-1075, 2013.

MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 135-151, 2009.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008.

MULENGA, A.; SUGINO, M.; NAKAJIMA, M.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 10, p. 1063-1069, 2001.

MULENGA, A.; TSUDA, A.; ONUMA, M.; SUGIMOTO, C. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 2, p. 267-276, 2003.

MUÑOZ-LEAL, S.; ERIKSSON, A.; SANTOS, C. F.; FISCHER, E.; DE ALMEIDA, J. C.; LUZ, H. R.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting bats (Mammalia: Chiroptera) in the Brazilian Pantanal. **Experimental and Applied Acarology**, p. 1-13, 2016.

NAKAJIMA, Y.; VAN NATERS, A. V. D. G.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 8, p. 747-751, 2001.

NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 1, p. 78-81, 2002a.

NAKAJIMA, Y.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. **Experimental & applied acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 135-140, 2002b.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Front Biosci**, v. 14, n. 8, p. 2857-2877, 2009.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO L. M. A.; LABRUNA, M. B. Description of a New Argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **The Journal of Parasitology**, v. 96, p. 1089-1101, 2010.

NENE, V.; LEE, D.; QUACKENBUSH, J.; SKILTON, R.; MWAURA, S.; GARDNER, M. J.; BISHOP, R. AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick *Amblyomma variegatum*. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1447-1456, 2002.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein engineering**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1997.

NOONAN, K. E. BECK, C.; HOLZMAYER, T. A.; CHIN, J. E.; WUNDER, J. S.; ANDRULIS, I. L.; GAZDAR, A. F.; WILLMAN, C. L.; GRIFFITH, B.; VON HOFF, D. D.; RONINSON, I. B. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 18, p. 7160-7164, 1990.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESLER, A.; MINH, B. Q. IQ-tree: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

OLEAGA, A.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; MANZANO-ROMÁN, R.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2015.

OLIVEIRA, M. F.; SILVA, J. R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; LINS, U.; BRAGA, C. M.; OLIVEIRA, P. L. (1999). Haem detoxification by an insect. **Nature**, v. 400, n. 6744, p. 517-518, 1999.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature reviews genetics**, v. 12, n. 2, p. 87-98, 2011.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-1236, 2008.

PATINO, W. D.; MIAN, O. Y.; HWANG, P. M. Serial analysis of gene expression technical considerations and applications to cardiovascular biology. **Circulation research**, v. 91, n. 7, p. 565-569, 2002.

RAMOS, D. G. D. S.; MELO, A. L.; MARTINS, T. F.; ALVES, A. D. S.; PACHECO, T. D. A.; PINTO, L. B.; LABRUNA, M. B.; DUTRA, V.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Rickettsial infection in ticks from wild birds from Cerrado and the Pantanal region of Mato Grosso, midwestern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 836-842, 2015.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.**, v. 290, p. 205-218, 1993.

REAST, Charlene Olivia. **The Anatomy and Histology of Ornithodoros Concanensis**. 1971. Tese de Doutorado. Texas Tech University.

RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; MASUDA, A. Cloning and functional expression of a Boophilus microplus cathepsin L-like enzyme. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 11, p. 1017-1026, 2000.

REDDY, B. P. N.; PRASAD, G. B. K. S.; RAGHAVENDRA, K. In silico analysis of glutathione S-transferase supergene family revealed hitherto unreported insect specific δ - and ϵ -GSTs and mammalian specific μ -GSTs in Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). **Computational biology and chemistry**, v. 35, n. 2, p. 114-120, 2011.

- RIBEIRO, J. M. C.; ENDRIS, T. M.; ENDRIS, R. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 100, n. 1, p. 109-112, 1991.
- RIBEIRO, J. M.C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives*. **Annual review of entomology**, v. 48, n. 1, p. 73-88, 2003.
- RIBEIRO, J. M.; ALARCON-CHAIDEZ, F.; FRANCISCHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G.; WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 36, n. 2, p. 111-129, 2006.
- RIBEIRO, J. M. C.; ANDERSON, J. M.; MANOUKIS, N. C.; MENG, Z.; FRANCISCHETTI, I. M. B. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 136, 2011.
- RIBEIRO, J. M. C.; LABRUNA, M. B.; MANS, B. J.; MARUYAMA, S. R.; FRANCISCHETTI, I. M.; BARIZON, G. C.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42 n. 5, p. 332-342, 2012.
- RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome research**, v. 11, n. 1, p. 3-11, 2001.
- RONQUIST, F; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- ROSELL-DAVIS, R.; COONS, L. B. Relationship between feeding, mating, vitellogenin production and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis*. **Experimental & applied acarology**, v. 7, n. 1, p. 95-105, 1989.
- ROSELL, R.; COONS, L. B. The role of the fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. **International journal for parasitology**, v. 22, n. 3, p. 341-349, 1992.
- ROSHDY, M. A. Comparative internal morphology of subgenera of *Argas* ticks (Ixodoidea, Argasidae). I. Subgenus *Carios*: *Argas vespertilionis* (Latreille, 1802). **The Journal of Parasitology**, v. 47, n. 6, p. 987-994, 1961.
- ROSHDY, M. A. Comparative internal morphology of subgenera of *Argas* ticks (Ixodoidea, Argasidae). 2. Subgenus *Chiropterargas*: *Argas boueti* Roubaud and Colas-Belcour, 1933. **The Journal of Parasitology**, v. 48, n. 4, p. 623-630, 1962.
- ROTHBERG, J. M.; LEAMON, J. H. The development and impact of 454 sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1117-1124, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SATOSHI, F.; NISHIKAWA, K. Estimation of the number of authentic orphan genes in bacterial genomes. **DNA Research**, v. 11, n. 4, p. 219-231, 2004.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1069-1078, 2000.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SCHWARZ, A.; VALDÉS, J. J.; KOTSYFAKIS, M. The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 3, p. 117-127, 2012.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SILVERMANN, G. A.; BIRD, P. I.; CARRELL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G. W.; IRVING, J. A.; LOMAS, D. A.; LUKE, C. J.; MOYER, R. W.; PEMBERTON, P. A.; REMOLD-O'DONNELL SALVESEN, G. S.; TRAVIS J.; WHISSTOCK, J. C. The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33293-33296, 2001.

SIMONS, S. M.; JUNIOR, P. L. S.; FARIA, F.; BATISTA, I. F. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 443-450, 2011.

SJÖLANDER, K. Phylogenomic inference of protein molecular function: advances and challenges. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 170-179, 2004.

SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; MARTINS, T. F.; KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, N. C. Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae, Argasidae) of small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 3, p. 389-401, 2015.

SOJKA, D.; HAJDUŠEK, O.; DVOŘÁK, J.; SAJID, M.; FRANTA, Z.; SCHNEIDER, E. L.; KOPÁČEK, P. (2007). IrAE—An asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 7, p. 713-724, 2007.

SOJKA, D.; FRANTA, D.; HORN, M.; HAJDUSEK, O.; CAFFREY, C. R.; MARES, M.; KOPÁČEK, P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus*

reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. **Parasit Vectors**, v. 1, n. 7, 2008.

SOJKA, D.; FRANCISCHETTI, I. M.; CALVO, E.; KOTSYFAKIS, M. Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. In: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. (Ed.). **Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms**. Springer US, 2011. p. 177-191.

SOJKA, D.; FRANTA, Z.; FRANTOVÁ, H.; BARTOŠOVÁ, P.; HORN, M.; VÁCHOVÁ, J.; KOPÁČEK, P. Characterization of gut-associated cathepsin D hemoglobinase from tick *Ixodes ricinus* (IrCD1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 25, p. 21152-21163, 2012.

SOJKA, D.; FRANTA, D.; HORN, M.; CAFFREY, C. R.; MARES, M.; KOPÁČEK, P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 6, p. 276-285, 2013.

SOJKA, D.; PYTELKOVÁ, J.; PERNER, J.; HORN, M.; KONVICKOVÁ, J. S.; MARES, M.; KOPÁČEK, P. Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, 2015.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York Oxford, Oxford University Press, 1991, p 446.

SHANBAKY, N. M.; HELMY, N.; KHATER, H. M.; YOUSERY, A. Proteolytic digestion of blood meal in *Ornithodoros erraticus*, a vector of *Borrelia crociduræ* causing relapsing fever in Egypt. **Egypt. Acad. J. biolog. Sci.**, v. 3, n. 1, p. 37-50, 2011.

SHAHEIN, Y.; ABOUELELLA, A.; HAMED, R. Glutathione S-Transferase Genes from Ticks. In: **An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Dr. Gandhi Radis-Baptista (Ed.)**, 2013. ISBN: 978-953-51-1151-1, InTech, DOI: 10.5772/52482. Available from: <http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications/glutathione-s-transferase-genes-from-ticks>

STEIN, L. Genome annotation: from sequence to biology. **Nature reviews genetics**, v. 2, n. 7, p. 493-503, 2001.

TAYLOR, D.; CHINZEI, Y.; MIURA, K.; ANDO, K. Vitellogenin synthesis, processing and hormonal regulation in the tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). **Insect biochemistry**, v. 21, n. 7, p. 723-733, 1991.

TAUTZ, D.; DOMAZET-LOŠO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 692-702, 2011.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 11–Biochemistry and molecular biology of digestion. **Insect molecular biology and biochemistry**, p. 365-418, 2012.

- TIRLONI, L.; SEIXAS, A.; MULENGA, A.; DA SILVA VAZ, I.; TERMIGNONI, C. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental parasitology**, v. 137, p. 25-34, 2014.
- THOMPSON, D. M.; KHALIL, S. M.; JEFFERS, L. A.; SONENSHINE, D. E.; MITCHELL, R. D.; OSGOOD, C. J.; ROE, R. M. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 363-374, 2007.
- VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology*, 205(18), p.2843-2864, 2002.
- VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S83-S94, 2004.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.
- VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A. Larval feeding performance of two Neotropical *Ornithodoros* ticks (Acari: Argasidae) on reptiles. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, p. 315-320, 2006.
- VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; GUGLIELMONE, A. A. The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* Species Group (Acari: Ixodida: Argasidae): Description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp. From South America. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 832-840, 2008.
- VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; CASÁS, G.; GUGLIELMONE, A. A. *Ornithodoros quilinensis* sp. nov. (Acari, Argasidae), a new tick species from the Chacoan region in Argentina. **Acta parasitologica**, v. 57, n. 3, p. 329-336, 2012.
- VENZAL, J. M.; NAVA, S.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MANGOLD, A. J.; MUÑOZ-LEAL, S.; LADO, P.; GUGLIELMONE, A. A. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus* spp. (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 1, p. 128-132, 2013.
- VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MUÑOZ-LEAL, S.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Two new species of *Ornithodoros* (Ixodida; Argasidae) from the Southern Cone of South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 66, n. 1, p. 127-139, 2015.
- VIAL, L. Biological and Ecological Characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Parasite**, v. 16, p. 191-202, 2009.
- XU, X. L.; CHENG, T. Y.; YANG, H.; LIAO, Z. H. De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 38, p. 62-72, 2016.

YU, X.; GONG, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; CAO, J.; ZHOU, J. Differential sialotranscriptomes of unfed and fed *Rhipicephalus haemaphysaloides*, with particular regard to differentially expressed genes of cysteine proteases. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2015.

WAGNER, G. P.; KIN, K.; LYNCH, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. **Theory in Biosciences**, v. 131, n. 4, p. 281-285, 2012.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.