

Transcriptoma do carrapato dos bovinos

Poliana Fernanda Giachetto

INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem um custo anual estimado em mais de três bilhões de dólares, decorrente da infestação de bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Grisi et al., 2014). Globalmente, considerando-se a população mundial de bovinos em 2015, Lew-Tabor; Rodriguez-Valle (2016) estimaram as perdas econômicas causadas pelo carrapato e pelas doenças por eles transmitidas como sendo da ordem de 22 a 30 bilhões de dólares anuais. Os prejuízos causados pelos carrapatos vão desde a redução no ganho de peso, baixa conversão alimentar, queda na produção de leite, redução da taxa de natalidade, desvalorização do couro, anemia e transmissão de agentes patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (Costa, 2008). A babesiose e a anaplasmose são as principais doenças transmitidas aos bovinos pelo *R. (B.) microplus* e provocam graves enfermidades aos rebanhos, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade (Costa, 2008).

O controle da infestação dos rebanhos, com o objetivo de reduzir tanto o efeito direto da ação do parasita sobre os animais quanto a transmissão de doenças, tem sido um desafio mundial que envolve criadores dos países compreendidos predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, onde a espécie é endêmica. A principal estratégia adotada na redução das infestações tem sido o método químico, com a aplicação de acaricidas. No entanto, esse método é parcialmente eficaz e o seu uso sistemático e extensivo tem levado à seleção de cepas de carrapatos resistentes à maioria dos princípios ativos comercialmente disponíveis, além do acúmulo de resíduos na carne, leite e no meio ambiente (Andreotti et al., 2011; Guerrero et al., 2012; Klafke et al., 2017).

O alto custo associado ao seu uso, problemas de resistência e contaminação de alimentos e do meio ambiente com a aplicação de acaricidas trouxeram a necessidade da

adoção de métodos alternativos de controle do parasita, como o manejo das pastagens, uso de predadores naturais e a seleção de animais resistentes ao carrapato. O aumento da resistência do hospedeiro através de sua imunização também é visto como uma boa opção, por se tratar de uma tecnologia sustentável e de menor custo, quando comparada ao uso de acaricidas. No Brasil, o uso de vacinas para o controle do carrapato, associada ao controle químico racional e manejo da pastagem, poderia criar possibilidades para o controle integrado, diminuindo os resíduos no ambiente e o desenvolvimento de resistência (Andreotti et al., 2018).

Esse capítulo irá abordar a utilização da transcriptômica como ferramenta para os estudos da interação carrapato-bovino, visando a identificação de alvos voltados ao delineamento de estratégias de controle do *R. (B.) microplus*, com ênfase no desenvolvimento de vacinas.

TRANSCRIPTÔMICA DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*: UMA FERRAMENTA NA BUSCA POR FORMAS DE CONTROLE DO PARASITA

O transcriptoma pode ser definido como o repertório de moléculas de RNA, incluindo os codificadores e não codificadores, transcritas em um determinado organismo, tecido ou célula. A transcriptômica, por sua vez, é o estudo do transcriptoma e possibilita a identificação dos transcritos presentes na célula em um dado momento, a determinação da estrutura dos genes (sítio de iniciação e extremidades 5' e 3'), a identificação do padrão de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais e a quantificação das alterações nos níveis de expressão de cada transcrito ao longo do desenvolvimento ou sob diferentes condições de um organismo (Wang et al., 2009).

Apesar do transcriptoma se referir a todos os tipos de RNA presentes na célula, os estudos acerca do mesmo baseiam-se, mais especificamente, na quantificação das moléculas de RNA mensageiro (RNAm) e de micro RNAs (miRNA). De acordo com o dogma central da biologia molecular, o RNAm é traduzido em uma proteína, e a expressão dos genes como proteínas é o que determina, na maior parte, o fenótipo das células e dos organismos. Os miRNAs, por sua vez - pequenas moléculas de RNA de 18 a 23 nt não codificadoras, estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica através do silenciamento de RNA, o que ocorre principalmente pela sua ligação à região 3' não traduzida de um RNAm alvo (Bushati; Cohen, 2007).

A transcriptômica tem sido aplicada em inúmeras áreas da pesquisa incluindo a quantificação da expressão gênica, o diagnóstico de doenças, a identificação de genes e vias metabólicas que respondem a estresses ambientais diversos – bióticos e abióticos, e a descoberta da função de genes e daqueles responsáveis por fenótipos particulares (Lowe et al., 2017). Como ferramenta utilizada na compreensão de aspectos da biologia de *R. (B.) microplus* visando a identificação de alvos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do parasita, a transcriptômica tem sido utilizada, principalmente, na elaboração de catálogos de genes e na identificação daqueles que são super ou sub expressos em um determinado tecido (Miranda-Santos et al., 2004; Costa, 2008; Carvalho et al., 2010; Maruyama et al., 2010; Stutzer et al., 2013; Van Zyl et al., 2015), fase de desenvolvimento do parasita (COSTA, 2004; Carvalho et al., 2010), durante sua interação com o hospedeiro (Rodriguez-Valle et al., 2010; Maruyama et al., 2017), infecção por patógenos (Zivkovic et al., 2010; Mercado-Curiel et al., 2011; Heekin et al., 2013; Bifano

et al., 2014) e exposição a acaricidas (Guerrero et al., 2007; Saldivar et al., 2008). A identificação dos genes diferencialmente expressos, entre condições específicas, geralmente é a análise mais utilizada nos estudos que envolvem a transcriptômica, uma vez que esses genes são fundamentais para o entendimento da variação fenotípica entre as diferentes condições. Ao se identificar os genes diferencialmente expressos em carrapatos alimentados em bovinos com diferentes níveis de tolerância ao parasita, por exemplo, pode-se chegar ao entendimento de quais genes e vias metabólicas estão envolvidos no mecanismo de fixação do parasita no hospedeiro. Interferir no mecanismo de fixação parasita-hospedeiro é uma forma de se controlar o carrapato, uma vez que esse passo é requerido para que o parasita possa iniciar o processo de alimentação (Maruyama et al., 2017).

Antes da introdução das tecnologias de geração de dados em larga escala – o que caracteriza a transcriptômica, os métodos disponíveis permitiam somente a análise de alguns transcritos individuais. Técnicas como o *Northern blotting* e a PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) quantitativa (qRT-PCR) foram bastante difundidas, mas eram laboriosas e permitiam a identificação e análise de uma fração muito pequena do transcriptoma, limitando a compreensão de como o transcriptoma é expresso (Lowe et al., 2017).

Na década de 1980, os sequenciadores Sanger começaram a ser usados para o sequenciamento de transcritos a partir de bibliotecas de cDNA construídas por meio da enzima transcriptase reversa – as chamadas ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) (Lowe et al., 2017). Largamente utilizado nos primeiros projetos genoma, o sequenciamento de ESTs possibilitou a descoberta de novos genes, a caracterização de estruturas genéticas e facilitou a anotação de genomas, aumentando exponencialmente a quantidade de informações sobre diferentes organismos, incluindo *R. (B.) microplus*. Com o sequenciamento das ESTs, surgiu o dbEST, banco público de ESTs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>), que contém hoje mais de 76 milhões de ESTs. Destas, 58.532 correspondem a sequências de *R. (B.) microplus* (dados de junho de 2018), o que representa uma vasta fonte de dados para estudos que utilizam informação baseada no transcriptoma na busca do entendimento de aspectos da biologia e por candidatos a serem utilizados em estratégias de controle do parasita. O sequenciamento de 20.417 ESTs a partir de ovos, larvas, ninfas, adultos e diversos órgãos do *R. (B.) microplus* deu origem ao banco de dados BmGI, contendo 8.270 sequências únicas do parasita (Guerrero et al., 2005), atualizado posteriormente com o sequenciamento de outras 22.095 ESTs, o que resultou no BmiGI Version 2, com um total de 13.643 ESTs (Wang et al., 2007). O CattleTickBase (<http://cattletickbase.ccgapps.com.au/>) é outro banco de dados que contém sequências de genomas e transcriptomas - cerca de 1,8Gb de sequências genômicas e dados de expressão gênica gerados a partir de vários experimentos com *R. (B.) microplus* conduzidos por um consórcio envolvendo o governo do Estado de Queensland, o Centro de Genômica Comparativa da Universidade de Murdoch e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Bellgard et al., 2012). Uma série de estudos, conduzidos a partir dos dados desse banco, levaram à identificação de genes importantes para a sobrevivência do carrapato durante o processo de interação parasita-hospedeiro, conforme descrito por Bellgard et al. (2012).

Como um desdobramento do sequenciamento das ESTs e da informação gerada por meio dessa tecnologia, surgiram os microarranjos, ou *microarrays* (Schena et al., 1995). Os microarranjos consistem de lâminas sólidas, nas quais fragmentos de cDNA, denominados sondas, são depositados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas,

chamadas spots. Na lâmina, cada spot contém milhões de cópias de um único e determinado transcrito que pode posteriormente ser identificado – o princípio da técnica baseia-se na hibridização por complementaridade das moléculas de ácido nucleico, que ocorre entre a sonda depositada na lâmina e o seu RNAm correspondente, transformado em cDNA, extraído das amostras a serem analisadas e comparadas (Giachetto, 2010). Lâminas de microarranjos foram construídas a partir das sequências das ESTs identificadas e depositadas nos bancos de dados acima citados e utilizadas em estudos onde se buscou identificar genes expressos em diferentes estágios ao longo do desenvolvimento do parasita, em especial durante a interação com o hospedeiro, para o desenvolvimento de novas estratégias de controle. Dados gerados a partir das hibridizações de microarranjos com amostras de diferentes organismos e condições podem ser encontrados nos repositórios GEO (*Gene Expression Omnibus*) do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) e *ArrayExpress* (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), do *European Bioinformatics Institute* (EBI). Esses repositórios contam hoje com resultados gerados a partir da hibridização de 122 amostras de *R. (B.) microplus*, que incluem a comparação da expressão gênica em diferentes estágios e tecidos do parasita, entre cepas resistentes e sensíveis a acaricidas, carrapatos infectados e livres de *A. marginale* e *B. bovis*, crescidos em hospedeiros sensíveis e resistentes. Esses dados podem ser acessados para a mineração de candidatos a alvos em estratégias de controle ou também utilizados em meta análises – análises que integram dados gerados por experimentos independentes, o que permite a obtenção de mais informações do que aquelas extraídas de um único experimento.

Em meados dos anos 2000, a introdução das tecnologias de sequenciamento de próxima geração – NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*) revolucionou a transcriptômica através do RNA-Seq, o sequenciamento de cDNA em escala massiva. Comparado ao método de Sanger, as novas tecnologias de sequenciamento inovaram ao usar sistemas livres de células para a construção das bibliotecas. No entanto, o principal avanço certamente foi obtido com a capacidade de produção de um volume extraordinário de dados a um custo baixo (Metzker, 2010). Por proporcionarem uma cobertura do transcriptoma sem precedentes, as tecnologias NGS possibilitaram um desenvolvimento importante no estudo das interações carrapato-hospedeiro ao permitirem a análise quantitativa da dinâmica da expressão gênica e a detecção de um grande número de novos transcritos, devido à sua capacidade de detectar genes poucos expressos (Chmelar et al., 2016).

O RNA-Seq baseia-se na conversão dos transcritos em moléculas de cDNA, as quais são sequenciadas diretamente por meio de uma abordagem de sequenciamento paralelo massivo e em grande profundidade (Mortazavi et al., 2008). Dependendo da plataforma a ser utilizada, as moléculas de cDNA podem ou não ser amplificadas antes do sequenciamento e uma vez gerados, os trechos de sequências obtidos são mapeados contra um genoma ou transcriptoma de referência para dedução da estrutura e dos níveis de expressão de um dado transcrito na amostra (Marguerat; Bahler, 2010; Westermann et al., 2012; Costa-Silva et al., 2017). Por meio de métodos estatísticos e de aprendizado de máquina, os genes diferencialmente expressos são identificados e avaliados dentro de um contexto biológico (Costa-Silva et al., 2017).

Comparado aos microarranjos, o RNA-Seq apresenta uma série de vantagens, como a identificação de isoformas e detecção de novos transcritos (os microarranjos limitam-se a analisar o conjunto de transcritos presentes na lâmina), expressão alelo-específica e identificação das junções do splicing. A técnica possui também um ruído (ou *background* do sinal) muitas vezes menor do que o decorrente da hibridização cruzada dos microarranjos

(Wang et al., 2009; Zhao et al., 2014). Isso tudo resulta em uma elevada sensibilidade, maior faixa de detecção da expressão gênica e maior poder discriminatório (Westermann et al., 2012). No entanto, em função de sua popularidade na comunidade científica, relação custo-benefício e facilidade da análise, os microarranjos ainda permanecem sendo largamente utilizados na análise de transcriptomas (Rai et al., 2018).

COMPREENDENDO A BIOLOGIA DO PARASITA – RESULTADOS OBTIDOS COM A ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E DOS CANDIDATOS IDENTIFICADOS

O entendimento da interação parasita-hospedeiro é o principal passo para o desenvolvimento de novas formas de controle do *R. (B.) microplus* (Parizi et al., 2009). Quando as células de um hospedeiro são submetidas à infecção por agentes diversos em sua complexidade, tem início uma cascata dinâmica de eventos que culminam na alteração dos padrões de expressão gênica em ambos os organismos, o que leva à adaptação e persistência do patógeno ou sua remoção do hospedeiro através de uma resposta imune (Westermann et al., 2012). Até agora, os experimentos utilizando a transcriptômica no estudo da interação carrapato-bovino têm sido focados ou no parasita, ou no hospedeiro, o que certamente tem desvendado aspectos da fisiologia do parasita e do sistema imune do hospedeiro e aumentado o nosso entendimento acerca dos mecanismos envolvidos nessa interação.

Os bovinos apresentam respostas contrastantes à infestação com *R. (B.) microplus* e espécies de carrapatos relacionadas, como consequência da co-evolução dos animais resistentes com o parasita (Ali et al., 2017). Animais de raças taurinas - *Bos taurus taurus*, são largamente preferidos pelos carrapatos em comparação aos animais de raças zebuínas - *Bos taurus indicus*. Em animais cruzados, quanto maior a contribuição da raça zebuína, maior a resistência ao carrapato (Oliveira; Alencar, 1990). Dessa maneira, um entendimento mais abrangente dos mecanismos moleculares que regulam o estabelecimento do processo de interação do parasita com o hospedeiro pode ser obtido se forem considerados os efeitos ambientais que permeiam a seleção do hospedeiro pelo carrapato, como o impacto da raça do animal sobre a sua expressão gênica (Rodriguez-Valle et al., 2010). O conhecimento da natureza dos mecanismos da resposta imune desencadeados pelo parasita em hospedeiros resistentes e susceptíveis é de extrema importância quando se busca o delineamento de uma vacina como forma de controle do carrapato (Garcia, 2009).

Nesse contexto, Carvalho et al. (2010) verificaram que bovinos hospedeiros susceptíveis ao *R. (B.) microplus* apresentaram um aumento no tempo de coagulação do sangue nas imediações do local da picada do carrapato, quando comparado com a pele não ferida. Por outro lado, o tempo de coagulação do sangue no local da picada em bovinos geneticamente resistentes foi menor do que na pele intacta. Avaliando a expressão de transcritos que codificam para proteínas putativas anti-hemostáticas na glândula salivar do parasita, os autores encontraram uma super expressão desses transcritos na glândula salivar de ninfas e machos alimentados nos animais susceptíveis, o que indica que, no fenótipo resistente, maiores quantidades de células anti-inflamatórias foram recrutadas e a expressão de moléculas anticoagulantes foi reduzida nas glândulas salivares, dificultando a refeição de sangue pelos carrapatos.

Franzin et al. (2017) utilizaram a tecnologia de RNA-Seq para comparar as diferenças na expressão gênica de larvas, ninfas, glândulas salivares e larvas provenientes de fêmeas

de *R. (B.) microplus* alimentadas em bovinos das raças Nelore e Holstein, e verificaram um aumento no número de transcritos de evasinas, proteínas imuno supressoras, lipocalinas e reprotinas metaloproteases associados ao hospedeiro susceptível (Holstein). Por outro lado, houve um aumento na expressão de chitinases e cisteína proteinases relacionadas aos animais resistentes. As evasinas são proteínas ligantes de quimiocinas, envolvidas na inibição do recrutamento de células imunes, o que é essencial para o desenvolvimento da reposta imune no hospedeiro (Bonvin et al., 2016) e as lipocalinas pertencem à classe de proteínas ligantes de histamina que são secretadas no momento da alimentação do parasita para superar a resposta anti-inflamatória do hospedeiro (Sangamnatdej et al., 2002).

Rodriguez-Valle et al. (2010) utilizaram um microarranjo elaborado a partir das ESTs depositadas no banco BmGI (Wang et al., 2007) para comparar a influência de raças bovinas susceptíveis (*Bos taurus*) e resistentes (*Bos indicus*) ao carrapato sobre o transcrito de larvas e fêmeas adultas do *R. (B.) microplus*. Ao analisarem um total de 13.601 transcritos, os autores identificaram um número maior de genes diferencialmente expressos envolvidos na adesão do carrapato, proteases requeridas para a digestão do sangue, proteínas relacionadas à adaptação ao estresse oxidativo e de defesa contra mediadores no hospedeiro, nas larvas crescidas em contato com o hospedeiro resistente. Serpina 2, lipocalinas e proteínas de ligação à histamina foram super expressas nessas larvas, a exemplo do que foi observado nos resultados de Franzin et al. (2017). Partindo da premissa de que transcritos que codificam para proteínas salivares importantes para o parasitismo são mais expressos quando os carrapatos são alimentados em hospedeiros susceptíveis, Maruyama et al. (2017) compararam bibliotecas de ESTs construídas a partir de glândulas salivares e larvas provenientes de fêmeas alimentadas em bovinos susceptíveis e resistentes ao parasita. Os autores identificaram e testaram quatro candidatas a partir dos genes super expressos nos carrapatos obtidos em hospedeiros resistentes - proteínas com similaridade à proteínas ricas em glicina, inibidores de serina proteases e metaloproteases, e elaboraram uma vacina multicomponentes, contendo quatro proteínas recombinantes obtidas a partir dos genes identificados, a qual reduziu a infestação de bovinos susceptíveis, com uma eficácia de 73,2%.

Os carrapatos são ectoparasitas que praticam hematofagia obrigatória. Processos associados à adesão do parasita ao hospedeiro, hematofagia continuada, digestão intracelular de grandes volumes de sangue e o processamento do sangue digerido em uma grande quantidade de ovos depositados pelas fêmeas ingurgitadas estão associados à evolução e adaptação do parasita aos hospedeiros (De La Fuente et al., 2016). Durante a hematofagia, as glândulas salivares secretam uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas com propriedades imunossupressoras, que garantem a continuidade da alimentação, além de facilitar a transmissão de patógenos (Kazimirová; Stibraniova, 2013). Por essa razão, os componentes da saliva do carrapato têm atraído atenção na prospecção de antígenos candidatas a vacinas e o número de moléculas identificadas nas glândulas salivares, principalmente com o uso de técnicas de sequenciamento de RNAm em larga escala, tem aumentado dramaticamente (Chmelar et al., 2016).

Vacinas derivadas de antígenos da glândula salivar podem bloquear a adesão e alimentação do carrapato pela estimulação de uma resposta imune do hospedeiro e neutralização das moléculas secretadas (Leal et al., 2017). Mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro mediados pela secreção salivar foram descritos em diferentes espécies de carrapatos e revisados por Chmelar et al. (2016). Nesses estudos, uma série de proteínas foi identificada, sendo as metaloproteases largamente citadas. As metaloproteases são essenciais a diversas funções biológicas em organismos hematófagos, onde

estão envolvidas com a inibição da coagulação do sangue, degradação de proteínas da matriz extracelular e inibição do reparo do tecido do hospedeiro via atividade antiangiogênica (ALI et al., 2015), funções consideradas cruciais para a manutenção da hematofagia, sendo sua super expressão nas glândulas salivares correlacionada com a ingestão de sangue pelo parasita (Harnnoi et al., 2007; Barnard et al., 2012).

A busca por antígenos presentes na saliva é uma estratégia que tem sido largamente utilizada também no desenvolvimento de vacinas contra outros artrópodes, como os mosquitos vetores de arbovírus que causam doenças importantes em humanos, como o Zika e o chikungunya (Manning et al., 2018). Assim como acontece com o carrapato, a saliva secretada pelos mosquitos contém compostos ativos que facilitam a transmissão de patógenos aos hospedeiros (Pingen et al., 2016). A abordagem de desenvolver uma vacina contra o vetor tem se mostrado bastante interessante, uma vez que apresenta vantagens às vacinas desenvolvidas especificamente contra os arbovírus: ela perpassa uma série de limitações, como a diversidade existente entre os arbovírus, o que demanda a existência de vacinas específicas. Vacinas elaboradas contra os mosquitos vetores podem ser uma das soluções contra as doenças transmitidas por eles, com a vantagem de terem como alvo somente uma variável, a saliva do mosquito (Conway et al., 2014).

Os bancos de dados de ESTs constituem uma importante fonte para a busca de novos alvos moleculares para o controle do carrapato. A busca nesses bancos por sequências anotadas como similares à metaloproteases foi o início de uma abordagem que levou à identificação de candidatos interessantes por Ali et al. (2015). Os autores imunizaram bovinos com a metaloprotease BrRm-MP4 recombinante e verificaram uma redução no número de fêmeas ingurgitadas e na taxa de oviposição e eclosão dos ovos, resultando em uma proteção aos animais vacinados em torno de 60% e evidenciando o papel da proteína como antígeno imunoprotetor. Utilizando a mesma abordagem, Rodriguez-Valle et al. (2012) alimentaram fêmeas de *R. (B.) microplus* com soro anti-RMS-3, uma serpina expressa nas glândulas salivares do parasita e verificaram redução no peso dos ovos e na porcentagem de transformação das larvas.

Utilizando ESTs disponíveis no NCBI e no banco de dados BmGI (Wang et al., 2007), Stutzer et al. (2013) delinearam um microarranjo para comparar a expressão gênica na glândula salivar, intestino e ovários de fêmeas de *R. (B.) microplus* e identificaram um total de 588 transcritos compartilhados entre os tecidos durante a alimentação no hospedeiro bovino, além de transcritos super expressos de maneira específica em cada tecido. Entre esses, foram identificados, na glândula salivar, transcritos que codificam para proteínas de defesa e anti-hemostáticas, necessárias à alimentação do parasita, proteases, enzimas e transportadores para digestão e aquisição de nutrientes a partir do sangue ingerido, no intestino, e proteínas e fatores envolvidos na replicação do DNA e controle do ciclo celular da ovogênese nos ovários. Os resultados obtidos, além de promoverem o avanço no conhecimento com relação à biologia do carrapato, constituem um repositório para a busca a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

Durante a alimentação do carrapato, o sangue do hospedeiro concentra-se no intestino, de modo que o parasita consegue ingerir várias vezes o seu peso em sangue de uma única vez. Ao longo da coevolução, os carrapatos desenvolveram estratégias para lidar com o ferro e a heme liberados após o sangue ter sido digerido e cujo excesso deve ser detoxificado e excretado. Assim, o mecanismo de proteção contra o dano oxidativo causado pela ingestão de grandes quantidades de sangue e os mecanismos que se opõem às defesas hemostáticas do hospedeiro são elementos importantes nas

estratégias direcionadas à descoberta de novas moléculas como potenciais candidatos ao desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato (Parizi et al., 2009). Apesar de ser um elemento inorgânico indispensável à maioria dos organismos, o ferro também participa da formação de radicais tóxicos que causam danos a proteínas, lipídeos e ao DNA, e sua homeostase é mantida por um conjunto de proteínas que regulam sua captação, utilização, transporte e armazenamento (Hentze et al., 2004; Hamza; Dailey, 2012;), potenciais candidatas ao desenvolvimento de vacinas contra o parasita. Durante esse processo, a hemoglobina é digerida e detoxificada no intestino do parasita (Sojka et al., 2013) e as proteases do hospedeiro são neutralizadas (Hajdusek et al., 2009). O ferro não heme é sequestrado pela ferritina, uma proteína de armazenamento de ferro que desempenha um papel essencial na homeostase do ferro durante a alimentação do parasita, prevenindo sua toxicidade (Galay et al., 2014). A ferritina 2 (Fer2), que parece não ter um ortólogo funcional em vertebrados, foi caracterizada como uma proteína específica do intestino secretada na hemolinfa do parasita, onde age como um transportador (Hajdusek et al., 2009). O silenciamento dessa ferritina 2 (RmFER2) por meio de RNAi e a vacinação com a proteína recombinante resultou em redução na alimentação, oviposição e fertilidade em *R. (B.) microplus*, além de *Rhipicephalus annulatus* e *Ixodes ricinus* (Hajdusek et al., 2009, 2010), evidenciando o potencial uso dessa proteína como candidata a antígeno protetor. A Fer2 apresenta atributos esperados para um antígeno oculto ideal, uma vez que não está presente no hospedeiro mamífero, é codificada por um único gene (não há problemas de redundância), é expressa no intestino, podendo interagir com anticorpos a partir da hematofagia em hospedeiro vacinado e a proteína recombinante tem se mostrado altamente imunogênica (De La Fuente et al., 2016). O fato de serem proteínas envolvidas no processo digestivo, e localizadas no intestino do parasita, consideradas antígenos ocultos, que podem manter-se escondidos do sistema imune do hospedeiro (Nuttall et al. 2006) e assim se sobrepõem aos seus efeitos imunomoduladores de defesa (Heekin et al., 2013), faz desses candidatos alvos muito interessantes para o desenvolvimento de vacinas. A glutatona S-transferase (GST) é outra enzima que possui papel fundamental no mecanismo celular de detoxificação de compostos xenobióticos e endógenos (Agianian et al., 2003), garantindo o sucesso do ingurgitamento das fêmeas e sobrevivência do carrapato (Silva Vaz Jr et al., 2004). O potencial de proteção de uma GST recombinante de *Haemaphysalis longicornis* foi avaliado em bovinos contra infestações com *R. (B.) microplus* e os animais imunizados apresentaram uma redução de 50% no número de fêmeas adultas ingurgitadas (Parizi et al., 2011).

Uma fração significativa das imunoglobulinas ingeridas durante a alimentação do carrapato mantém sua atividade biológica ao longo da passagem pelo intestino, hemolinfa e glândulas salivares (Kumar; Ghosh, 2016). Isso possibilita que potenciais alvos a uma resposta imune protetora também incluam antígenos presentes nos órgãos internos, que entrarão em contato com anticorpos, como antígenos dos ovários (Lew-Tabor; Rodriguez-Valle et al., 2016). Genes expressos durante a embriogênese e vitelogênese representam candidatos importantes para o controle do parasita, uma vez que, com a oviposição afetada, pode-se esperar uma redução nas populações de carrapatos no ambiente (SEIXAS et al., 2012; ALI et al., 2015; De La Fuente et al., 2016). Esses processos são regulados por uma série de proteínas, incluindo inibidores de serino proteases (SPI) (Blisnick et al., 2017). Andreotti et al. (2002) mostraram uma redução de 69,7 e 71,3% no número de fêmeas ingurgitadas e no peso dos ovos, respectivamente, em fêmeas de *R. (B.) microplus* após imunização de bovinos com inibidores de serino proteases denominados de BmTIs, confirmando o papel crucial dessas proteínas na produção e desenvolvimento dos ovos.

TRANSCRIPTÔMICA NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE ACARICIDAS

Como mencionado, o foco deste capítulo é a utilização da transcriptômica na identificação de candidatos para vacinas. No entanto, o uso de acaricidas como estratégia de controle do carrapato é uma alternativa que também tem evoluído na identificação de alvos com o auxílio da transcriptômica.

A maior parte dos acaricidas tem como alvo o sistema nervoso do carrapato (Lees; Bowman, 2007), o que faz com que o entendimento dos seus componentes, especificamente moléculas sinalizadoras e seus receptores seja requerido para a identificação de novos alvos para o desenvolvimento desse tipo de estratégia de controle (Guerrero et al., 2016). Utilizando a tecnologia de RNA-Seq para a obtenção do transcriptoma de singânglios de *R. (B.) microplus*, Guerrero et al. (2016) identificaram sequências codificadoras de membros da super família de receptores acoplados à proteína G, a partir de estratégias baseadas em similaridade estrutural e similaridade de sequência, obtendo um vasto banco de dados de proteínas preditas, as quais podem contribuir para estudos relacionados à neurobiologia do parasita, como objetivo de se desenvolver novas formas de controle. A partir de um microarranjo construído a partir de sequências depositadas no banco de dados BmGI (Wang et al., 2007), genes diferencialmente expressos envolvidos no processo de digestão do sangue do hospedeiro - uma legumaina e uma glutatona S-transferase, foram identificados em larvas de *R. (B.) microplus* expostas aos acaricidas cumafós, permetrina, amitraz e ivermectina e associados ao mecanismo de resistência do carrapato aos acaricidas (Saldivar et al., 2008).

VACINOLOGIA REVERSA

Em 1994, foram lançadas as primeiras vacinas comerciais contra o *R. (B.) microplus*, a australiana TickGard[®] e a cubana Gavac[™], ambas desenvolvidas com a glicoproteína Bm86 como antígeno. A Bm86, isolada do intestino de *R. (B.) microplus* em 1989 (Willadsen et al., 1989), é capaz de induzir uma resposta imune do hospedeiro, resultando em uma diminuição progressiva da eficácia reprodutiva do carrapato, com redução no número, peso e na capacidade de postura de fêmeas ingurgitadas, sendo o seu maior benefício a redução do número de larvas nas gerações subsequentes (Willadsen et al., 2006). As vacinas baseadas no antígeno Bm86 têm mostrado eficácia contra infestações de *R. (B.) microplus* e *Rhipicephalus annulatus* (Lew-Tabor; Rodriguez-Valle, 2016) e induzem uma proteção parcial contra outras espécies de carrapatos, como *Boophilus decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma anatolicum* e *Hyalomma dromedarii* (Rodriguez-Valle et al., 2012). No entanto, a adoção das vacinas foi limitada, devido ao seu efeito obtido em longo prazo – o que requeria a aplicação associada de acaricidas para a redução da carga parasitária, e ao fato das mesmas não serem efetivas contra todos os estágios de vida do parasita, além de terem apresentado baixa eficácia contra algumas cepas regionais de *R. (B.) microplus* (Garcia-Garcia et al., 2000; Andreotti, 2006). Desde 2010, a TickGard[®] não tem sido mais comercializada.

Tradicionalmente, as vacinas são desenvolvidas, de maneira empírica, por meio do isolamento, inativação e injeção do agente patogênico (ou parte dele) causador da doença, no hospedeiro. Há cerca de 20 anos, com o advento do sequenciamento dos genomas, a descoberta de alvos para a obtenção de vacinas passou a ser feita diretamente a partir

da sequência do genoma do patógeno. A estratégia, denominada de vacinologia reversa, publicada pela primeira vez por Rino Rappuoli, foi baseada originalmente no screening *in silico* do genoma de um patógeno para identificar genes que codificam proteínas com atributos para serem alvos de vacinas, como por exemplo, proteínas preditas como expostas na superfície e conservadas entre as cepas (Rappuoli, 2000). As proteínas selecionadas eram então expressas em *Escherichia coli* e usadas para imunização de camundongos e avaliação da imunogenicidade e proteção, com base na análise dos anticorpos produzidos.

Ao longo de quase duas décadas, a metodologia evoluiu. Hoje, utilizando ferramentas de bioinformática, não só os genomas, mas pangenomas (Serruto; Rappuoli, 2006; Tettelin, 2009; Zeng et al., 2017), transcriptomas e proteomas (Revelli et al., 2009; Villar et al., 2017) de patógenos são interrogados *in silico*, na busca por potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas. As proteínas preditas são selecionadas com base em atributos desejáveis, associados com indução de imunidade (He et al., 2010), obtidas como proteínas recombinantes e testadas *in vitro* e *in vivo*, para se determinar a imunogenicidade e o nível de proteção (Seib et al., 2012). Hoje, na área de saúde humana, a denominada “vacinologia reversa 2.0” já é uma realidade: a descoberta em larga escala de anticorpos protetores, o sequenciamento do repertório de células B e a crescente caracterização estrutural de antígenos protetores e epítopos têm possibilitado o entendimento molecular de mecanismos para direcionar a descoberta de novas vacinas de uma forma jamais imaginada (Rappuoli et al., 2016).

A eficácia da vacinologia reversa tem sido demonstrada por meio do desenvolvimento de vacinas para uma série de patógenos, principalmente bactérias e vírus (Rappuoli, 2000; Sette, 2010). A primeira vacina obtida por meio dessa metodologia, desenvolvida contra a doença meningocócica invasiva, causada pela bactéria *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, foi recentemente patenteada (O’ryan et al., 2014) e liberada para uso na Europa (Andrews; Pollard, 2014).

A demora na utilização da vacinologia reversa para o desenvolvimento de vacinas contra parasitas, comparada aos avanços já observados em vacinas bacterianas e virais, reside no fato de que poucos genomas de parasitas foram sequenciados até o momento. No entanto, o recém-publicado *draft* do genoma do *R. (B.) microplus*, obtido por meio da estratégia de sequenciamento híbrido PacificBiosciences/Illumina, irá possibilitar inúmeras aplicações, incluindo o entendimento de sua biologia, a transmissão de patógenos e o delineamento de novas estratégias para contornar a resistência do parasita aos acaricidas (Barrero et al., 2017).

A grande vantagem de se ter um genoma num *pipeline* de vacinologia reversa é que este contém todo o repertório de genes que um patógeno pode expressar como antígeno (Goodswen et al., 2012). No entanto, a identificação de antígenos protetores candidatos com base em dados transcriptômicos e proteômicos tem sido realizada com base na informação presente nos repositórios e artigos publicados.

As ferramentas de vacinologia reversa executam buscas por proteínas e domínios presentes na interface molecular parasita-hospedeiro (porção extracelular) e capazes de serem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro (presença de epítopos lineares de células T e B). Ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas para predizer domínios de proteínas, sinais de secreção, hélices transmembrana, âncoras GPI (glicosilfosfatidilinositol) e localização celular. No entanto, ainda faltam ferramentas específicas para análises dessa natureza em ectoparasitas, sendo a maioria delas desenvolvidas com base na descoberta de antígenos virais e bacterianos (De La Fuente et al., 2016).

Atualmente, os algoritmos mais usados para predizer epítomos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) bovino (I e II) são baseados em alelos humanos e murinos (Lew-Tabor; Rodríguez-Valle, 2016). Os epítomos (ou determinantes antigênicos), sequências de resíduos de aminoácidos presentes no antígeno, que participam diretamente das interações antígeno-anticorpo (Pellequer et al., 1993), constituem a estrutura mínima reconhecida pelo sistema imune (Korber et al., 2006) e o reconhecimento dos epítomos pelas células B e T consistem no cerne da resposta imune do hospedeiro ao carrapato (Vivona et al., 2008). Os epítomos têm sido uma alternativa interessante no desenvolvimento de vacinas, por serem potencialmente mais específicos, seguros e fáceis de produzir do que as vacinas tradicionais, e o uso de múltiplos epítomos em uma vacina tem se mostrado uma alternativa interessante, pelo seu potencial em estimular no hospedeiro uma resposta imune mais robusta (Villar et al., 2017).

Vacinologia reversa na identificação de alvos contra o *R. (B.) microplus*

Embora o genoma do *R. (B.) microplus* só tenha se tornado disponível agora, vários pipelines baseados em vacinologia reversa foram desenvolvidos e utilizados em estudos visando o desenvolvimento de vacinas (De La Fuente et al., 2005; Lew-Tabor et al., 2010; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; Díaz-Martín et al., 2015). No entanto, apesar de todos os esforços e resultados potencialmente promissores, não existe hoje uma vacina altamente efetiva e/ou largamente aceita para a prevenção das infestações com *R. (B.) microplus* (Lew-Tabor; Rodríguez-Valle, 2016). O desenvolvimento de vacinas contra o carrapato e doenças por ele transmitidas será largamente melhorado por estratégias que têm início com o entendimento da interação parasita-patógeno-hospedeiro, terminando com a caracterização e validação das formulações das vacinas (De La Fuente; Merino, 2013). O conhecimento de como os genes são expressos durante a interação com o hospedeiro é de fundamental importância para o desenvolvimento de uma vacina, e as proteínas expressas ao longo da infecção representam os antígenos protetores mais efetivos para a sua composição (Kuleš et al., 2016).

A descoberta de novos antígenos que apresentem mínima variabilidade genética entre populações de *R. (B.) microplus* poderia aumentar a eficácia da vacinação e reduzir a variação no nível de proteção proporcionado pelas vacinas baseadas na proteína Bm86 (Parizi et al., 2012). A facilidade na obtenção de genomas de diferentes cepas e espécies de carrapatos, com o advento das novas tecnologias de sequenciamento, irá possibilitar estudos sobre a estrutura da população do parasita, o que permitirá a identificação de antígenos com amplo espectro de cobertura (Donati; Rappuoli, 2013). Além disso, uma outra estratégia para se aumentar a eficácia da vacina poderia ser a combinação de dois ou mais antígenos (Willadsen et al., 2008), conforme comprovaram resultados de experimentos nos quais misturas de antígenos, incluindo a Bm86, foram mais eficazes do que o uso de somente uma molécula (Willadsen et al., 2004). De acordo com Goodswen et al. (2012), moléculas candidatas a induzirem a resposta imune esperada deveriam ser derivadas de proteínas presentes na superfície do patógenos, excretadas ou secretadas por eles e homólogas a proteínas envolvidas na patogênese e virulência.

Radulović et al. (2014) analisaram o proteoma da glândula salivar de *Amblyomma americanum* e identificaram uma série de proteínas constitutivas imunogênicas, as quais foram avaliadas por Rodríguez-Mallon et al. (2015) na busca de um candidato à vacina contra o carrapato bovino. Os autores identificaram um ortólogo da proteína ribossomal P0 em *R. (B.) microplus* contendo uma região imunogênica não conservada quando comparado

à proteína ortóloga no hospedeiro, predita por meio de ferramentas de bioinformática que avaliaram características como a hidrofobicidade, grau de acessibilidade dos resíduos de aminoácidos e potenciais epítomos B (Rodríguez-Mallon et al., 2012). A vacinação de bovinos com o antígeno sintético elaborado a partir dessa região apresentou uma eficácia de 96%, com uma redução significativa no peso de fêmeas ingurgitadas, no peso da massa de ovos e na eclodibilidade dos ovos, além de uma alta mortalidade dos carrapatos. O fato de se tratar de uma proteína altamente conservada entre várias espécies de carrapatos torna esse candidato interessante ao desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro (Rodríguez-Mallon et al., 2012).

A vacinação de bovinos utilizando a proteína sublisina recombinante reduziu a infestação dos animais com o carrapato *R. (B.) microplus* com uma eficiência avaliada em torno de 60% (Almazán et al., 2010, Merino et al., 2013). No entanto, a utilização de epítomos preditos a partir da sublisina resultou em efeitos potencialmente superiores sobre a reprodução do parasita, 79% de eficácia, aos observados com a proteína recombinante. Os autores apontam o mapeamento e predição de epítomos protetores por meio de ferramentas de bioinformática como uma estratégia adequada para a identificação e delineamento de moléculas, as quais podem aumentar a eficácia de alvos das vacinas contra o carrapato.

A partir de um estudo realizado por Ali et al. (2014), que identificaram uma metaloprotease com padrão de expressão ubíquo entre os tecidos de *R. (B.) microplus* e contendo sequências altamente antigênicas comparadas com as demais proteínas avaliadas, Ali et al. (2015) imunizaram bovinos com a metaloprotease BrRm-MP4 recombinante e verificaram uma redução no número de fêmeas ingurgitadas e na taxa de oviposição e eclosão dos ovos, resultando em uma proteção aos animais vacinados em torno de 60%. Também utilizando uma estratégia baseada em vacinologia reversa, Aguirre et al. (2016) identificaram um peptídeo potencialmente imunogênico na ATAQ, uma proteína homóloga da Bm86 e verificaram uma taxa de proteção variando de 35 a 98% em bovinos infestados com o *R. (B.) microplus* com a aplicação da vacina formulada com o peptídeo sintético.

PERSPECTIVAS

O conhecimento da função biológica de uma proteína na interação parasita-hospedeiro, assim como o seu perfil de expressão ao longo dos estágios de desenvolvimento do carrapato tem uma importância chave na identificação de um candidato alvo ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o carrapato bovino. A transcriptômica fornece ferramentas que permitem a análise da expressão gênica nos dois lados da interação. A tecnologia de RNA-seq tem o potencial de revolucionar o estudo da expressão gênica durante a interação entre parasita e hospedeiro, provendo novos conhecimentos acerca dos mecanismos que determinam a fixação e alimentação do parasita e a resposta imune do hospedeiro. Com a evolução da técnica, o recém-denominado “dual RNA-seq” irá capturar simultaneamente todas as classes de transcritos codificadores e não codificadores expressos na interação (Westermann et al., 2017), evidenciando as alterações fisiológicas que ocorrem ao longo de todo o processo da infecção, incluindo aquelas causadas pelos RNAs não codificadores. Novos dados serão gerados e depositados nos repositórios públicos, abertos à mineração pelas ferramentas de bioinformática para uso nas abordagens de vacinologia reversa, que vêm emergindo como promissoras para a identificação de novos e efetivos alvos para a elaboração de vacinas como forma de controle do carrapato bovino. Como exemplo, podemos citar os dados de RNA-Seq gerados pela Embrapa Gado de Corte em colaboração com a Embrapa Informática Agropecuária, os quais serão publicados em

breve, onde foram caracterizados os transcriptomas de três tecidos – glândula salivar, intestino e ovários – e dois estágios do *R. (B.) microplus*, larva e ninfa. Além disso, o efeito da imunidade de hospedeiros resistentes e suscetíveis, sobre a expressão gênica do parasita também será apresentado, por meio da identificação dos genes diferencialmente expressos em cada tecido e estágio de desenvolvimento obtido a partir do carrapato.

Referências

- AGIANIAN, B.; TUCKER, P. A.; SCHOUTEN, A.; LEONARD, K.; BULLARD, B.; GROS, P. Structure of a *Drosophila sigma* class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 1, 2003. 151-165 p.
- AGUIRRE, A. A. R.; LOBO, F.; CUNHA, R. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 221, 2016. 30-38 p.
- ALI, A.; TIRLONI, L.; ISEZAKI, M.; SEIXAS, A.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; SILVA VAZ Jr, I.; TERMIGNONI, C. Reprolysin metallopeptidases from *Ixodes persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 4, 2014. 559-578 p.
- ALI, A.; KHAN, S.; ALI, I.; KARIM, S.; SILVA VAZ, I.; TERMIGNONI, C. Probing the functional role of tick metalloproteases. **Physiological Entomology**, v. 40, n. 3, 2015. 177-188 p.
- ALI, A.; ROCHA GARCIA, G.; FONSECA ZANGIROLAMO, A.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N.; TABOR, A. E. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: A review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers of Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017. 506 p.
- ALMAZÁN, C.; LAGUNES, R.; VILLAR, M.; CANALES, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; JONGEJAN, F.; De La FUENTE, J. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. **Parasitology Research**, v. 106, 2010. 471-479 p.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, 2002. 557-563 p.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, 2006. 97-100 p.
- ANDREOTTI, R.; De LEÓN, A. A. P.; DOWD, S. E.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, 2011. 6 p.
- ANDREOTTI, R.; GIACHETTO, P. F.; CUNHA, R. C. Advances in tick vaccinology in Brazil: from gene expression to immunoprotection. **Frontiers of Bioscience (Scholar Edition)**, v. 10, 2018. 127-142 p.
- ANDREWS, S. M.; POLLARD, A. J. A vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*: dealing with uncertainty. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, 2014. 426-34 p.
- BARNARD, A. C.; NIJHOF, A. M.; GASPAS, A. R.; NEITZ, A. W.; JONGEJAN, F.; MARITZ-OLIVIER, C. Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, 2012. 403-414 p.
- BARRERO, R. A.; GUERRERO, F. D.; BLACK, M.; MCCOOKE, J.; CHAPMAN, B.; SCHILKEY, F.; De LEÓN, A. A. P.; MILLER, R. J.; BRUNS, S.; DOBRY, J.; MIKHAYLENKO, G. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 9, 2017. 569-583 p.
- BELLEGARD, M. I.; MOOLHUIJZEN, P. M.; GUERRERO, F. D.; SCHIBECI, D.; RODRIGUEZ-VALLE, M.; PETERSON, D. G.; DOWD, S. E.; BARRERO, R.; HUNTER, A.; MILLER, R. J.; LEW-TABOR, A. E. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 2, 2012. 161-169 p.
- BIFANO, T. D.; UETI, M. W.; ESTEVES, E.; REIF, K. E.; BRAZ, G. R.; SCOLES, G. A.; BASTOS, R. G.; WHITE, S. N.; DAFFRE, S. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of *Anaplasma marginale* transmission. **PloS One**, v. 9, n. 5, p.e98614, 2014.

- BLISNICK, A. A.; FOULON, T.; BONNET, S. I. Serine protease inhibitors in ticks: an overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017. 1-24 p.
- BONVIN, P.; POWER, C. A.; PROUDFOOT, A. E. Evasins: therapeutic potential of a new family of chemokine-binding proteins from ticks. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016. 208 p.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. MicroRNA functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, 2007. 175-205 p.
- CARVALHO, W. A.; MARUYAMA, S. R.; FRANZIN, A. M.; ABATEPAULO, A. R. R.; ANDERSON, J. M.; FERREIRA, B. R.; RIBEIRO, J. M. C.; MORÉ, D. D.; MAIA, A. A. M.; VALENZUELA, J. G. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: clotting time in tick-infested skin varies according to local inflammation and gene expression patterns in tick salivary glands. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 4, 2010. 428-435 p.
- CHMELARĚ J.; KOTÁL, J.; KARIM, S.; KOPACEK, P.; FRANCISCHETTI, I. M.; PEDRA, J. H.; KOTSYFAKIS, M. Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick–host interactions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 3, 2016. 242-254 p.
- CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. **Annual Review of Virology**, 1, 2014. 71-88 p.
- COSTA, G. H. **Sequenciamento de genes expressos em larvas infestantes e ninfas de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae)**, 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2004.
- COSTA, G. H. **Identificação de antígenos de intestino, ovário e glândula salivar de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae)**. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2008.
- COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p.e0190152, 2017.
- De La FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; KOCAN, K. M. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. **Journal of Parasitology Research**, v. 96, n. 3, 2005. 137-141 p.
- De La FUENTE, J.; MERINO, O. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 50, 2013. 5923-5929 p.
- De La FUENTE, J.; KOPÁČEK, P.; LEW-TABOR, A.; MARITZ-OLIVIER, C. Strategies for new and improved vaccines against tick and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 38, 2016. 754-769 p.
- DÍAZ-MARTÍN, V.; MANZANO-ROMÁN, R.; OBOLO-MVOULOUGA, P.; OLEAGA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: an update. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 3, 2015. 211-220 p.
- DONATI, C.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1285, n. 1, 2013. 115-132 p.
- FRANZIN, A. M.; MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; RIBEIRO, J. M. C.; BISHOP, R.; MAIA, A. A. M.; MORÉ, D. D.; FERREIRA, B. R.; MIRANDA SANTOS, I. K. F. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017. 51 p.
- GALAY, R. L.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; BACOLOD, E. T.; MAEDA, H.; KUSAKISAKO, K.; KOYAMA, J.; TSUJI, N.; MOCHIZUKI, M.; FUJISAKI, K.; TANAKA, T. Two kinds of ferritin protect Ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p.e90661, 2014.
- GARCIA, G.R. **Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e suscetíveis ao parasita**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRÍGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZÁLEZ, I. L.; VALDÉS, M. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, 2000. 2275-2287 p.
- GIACHETTO, P. F. A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura. Campinas, SP: Embrapa Informática Agropecuária, 2010. 35 p.

- GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to in silico vaccine discovery for eukaryotic pathogens. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 6, 2012. 753-774 p.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. D. S.; BARROS, A. T. M. D.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. D.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, 2014. 150-156 p.
- GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; ROUSSEAU, M. E.; SUNKARA, S.; QUACKENBUSH, J.; LEE, Y.; NENE, V. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, 2005. 585-595 p.
- GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; CHEN, A. C.; LI, A. Y.; MILLER, R. J.; PLEASANCE, E.; VARHOL, R.; ROUSSEAU, M. E.; NENE, V. M. Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 1, 2007. 49-60 p.
- GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; PEREZ De LEON, A. A. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? **International Journal of Parasitology**, v. 42, 2012. 421-427 p.
- GUERRERO, F. D.; KELLOGG, A.; OGREY, A. N.; HEEKIN, A. M.; BARRERO, R.; BELLGARD, M. I.; DOWD, S. E.; LEUNG, M. Y. Prediction of G protein-coupled receptor encoding sequences from the synganglion transcriptome of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 5, 2016. 670-677 p.
- HAJDUSEK, O.; SOJKA, D.; KOPACEK, P.; BURESOVA, V.; FRANTA, Z.; SAUMAN, I.; WINZERLING, J.; GRUBHOFFER, L. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 106, n. 4, 2009. 1033-1038 p.
- HAJDUSEK, O.; ALMAZÁN, C.; LOOSOVA, G.; VILLAR, M.; CANALES, M.; GRUBHOFFER, L.; KOPACEK, P.; De La FUENTE, J. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v. 28, n. 17, 2010. 2993-2998 p.
- HAMZA, I.; DAILEY, H. A. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. **BBA Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, 2012. 1617-1632 p.
- HARNNOI, T.; SAKAGUCHI, T.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, n. 1, 2007. 93-101 p.
- HE Y.; XIANG Z.; MOBLEY, H. L. T. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. **Journal of Biomedical Biotechnology**, v. 15, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2910479/>>. Acesso em: 16 out. 2018.
- HEEKIN, A. M.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SALDIVAR, L.; SCOLES, G. A.; DOWD, S. E.; GONDRO, C.; 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. **Journal of Parasitology Research**, v. 112, n. 9, 2013. 3075-3090 p.
- HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell Press**, v. 117, n. 3, 2004. 285-297 p.
- KAZIMÍROVÁ, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers of Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 2013. 43 p.
- KLAFKE, G.; WEBSTER, A.; AGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; De La CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, n. 1, 2017. 73-80 p.
- KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computacional Biology**, v. 2, 2006. 484-492 p.
- KULEŠ, J.; HORVATIC, A.; GUILLEMIN, N.; GALAN, A.; MRLJAKA, V.; BHIDE, M. New approaches and omics tools for mining of vaccine candidates against vector-borne diseases. **Molecular BioSystems**, v. 12, 2016. 2680-2694 p.
- KUMAR, B.; GHOSH, S. Cloning and molecular analysis of voraxin- α gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, 2016. 184-188 p.

- LEAL, B. F.; ALZUGARAY, M. F.; SEIXAS, A.; VAZ, I. D. S.; FERREIRA, C. A. S. Characterization of a glycine-rich protein from *Rhipicephalus microplus*: tissue expression, gene silencing and immune recognition. **Parasitology**, 2017. 1-12 p.
- LEES, K.; BOWMAN, A. S. Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, 2007. 183-198 p.
- LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P. M.; VANCE, M. E.; KURSCHEID, S.; VALLE, M. R.; JARRETT, S.; MINCHIN, C. M.; JACKSON, L. A.; JONSSON, N. N.; BELLGARD, M. I.; GUERRERO, F. D. Suppressive subtractive hybridization analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval and adult transcript expression during attachment and feeding. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, 2010. 304-320 p.
- LEW-TABOR, A. E.; RODRIGUEZ-VALLE, M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, 2016. 573-585 p.
- LOWE, R.; SHIRLEY, N.; BLEACKLEY, M.; DOLAN, S.; SHAFEE, T. Transcriptomics technologies. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 5, e1005457, 2017.
- MANNING, J. E.; MORENS, D. M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; MEMOLI, M. Mosquito saliva: the hope for a universal arbovirus vaccine? **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 1, 2018. 7-15 p.
- MARGUERAT, S.; BAHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 67, 2010. 569-579 p.
- MARITZ-OLIVIER, C.; VAN ZYL, W.; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidate in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick- Borne Diseases**, v. 3, 2012. 179-187 p.
- MARUYAMA, S. R.; ANATRIELLO, E.; ANDERSON, J. M.; RIBEIRO, J. M.; BRANDÃO, L. G.; VALENZUELA, J. G.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, G. R.; SZABÓ, M. P.; PATEL, S.; BISHOP, R. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, 2010. 363 p.
- MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; TEIXEIRA, F. R.; BRANDÃO, L. G.; ANDERSON, J. M.; RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G.; HORACKOVA, J.; VERÍSSIMO, C. J.; KATIKI, L. M.; BANIN, T. M. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017. 206 p.
- MERCADO-CURIEL, R. F.; PALMER, G. H.; GUERRERO, F. D.; BRAYTON, K. A. Temporal characterisation of the organ-specific *Rhipicephalus microplus* transcriptional response to *Anaplasma marginale* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 8, 2011. 851-860 p.
- MERINO, O.; ALBERDI, P.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.M.; De La FUENTE, J. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-10, 2013.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, 2010. 31 p.
- MIRANDA-SANTOS, I. K.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J.; MARCOS, C.; CASTRO, M.; COSTA, J. N.; COSTA, A.; SILVA, E. R.; NETO, O. B. R.; ROCHA, C.; DAFFRE, S. 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, 2004. 242-246 p.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, 2008. 621-628 p.
- NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M.; LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, 2006. 155-163 p.
- O'RYAN, M.; STODDARD, J.; TONEATTO, D.; WASSIL, J.; DULL, P. M. A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program. **Drugs**, v. 74, n. 1, 2014. 15-30 p.
- OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 2, 1990. 127-135 p.

- PARIZI, L. F.; POHL, P. C.; MASUDA, A.; JUNIOR, V.; SILVA, I. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, 2009. 1-7 p.
- PARIZI, L. F.; UTIUMI, K. U.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OHASHI, K.; MASUDA, A.; SILVA VAZ Jr, I. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, 2011. 113-118 p.
- PARIZI, L. F.; RECK J. R. J.; OLDIGES, D. P.; GUIZZO, M. G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J. R.; SILVA VAZ Jr, I. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. **Vaccine**, v. 30, n. 48, 2012. 6912-6917 p.
- PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E.; Van REGENMORTEL, M. H. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. **Immunology Letters**, v. 36, n. 1, 1993. 83-99 p.
- PINGEN, M.; BRYDEN, S. R.; PONDEVILLE, E.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; MERITS, A.; FAZAKERLEY, J. K.; GRAHAM, G. J.; MCKIMMIE, C. S. Host inflammatory response to mosquito bites enhances the severity of arbovirus infection. **Immunity**, v. 44, n. 6, 2016. 1455-1469 p.
- RADULOVIĆ, Ž. M.; KIM, T. K.; PORTER, L. M.; SZE, S. H.; LEWIS, L.; MULENGA, A. A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014. 518 p.
- RAI, M. F.; TYCKSEN, E. D.; SANDELL, L. J.; BROPHY, R. H. Advantages of RNA-seq compared to RNA microarrays for transcriptome profiling of anterior cruciate ligament tears. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, 2018. 484-497 p.
- RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, 2000. 445-450 p.
- RAPPUOLI, R.; BOTTOMLEY, M. J.; D'ORO, U.; FINCO, O.; GREGORIO, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 3, 2016.
- REVELLI, A.; DELLE PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 40, 2009. 1-13 p.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A.; FERNÁNDEZ, E.; ENCINOSA, P. E.; BELLO, Y.; MÉNDEZ-PÉREZ, L.; CEPERO, L.; PÉREZ, D.; GONZÁLEZ, M.; GARAY, H.; REYES, O.; MÉNDEZ, L.; ESTRADA, M. P. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, v. 30, 2012. 1782-1789 p.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A.; ENCINOSA, P. E.; MÉNDEZ-PÉREZ, L.; BELLO, Y.; FERNÁNDEZ, R. R.; GARAY, H.; CABRALES, A.; MÉNDEZ, L.; BORROTO, C.; ESTRADA, M. P. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 4, 2015. 530-537 p.
- RODRIGUEZ-VALLE, M.; LEW-TABOR, A.; GONDRO, C.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.; GUERRERO, F. D.; BELLGARD, M.; JORGENSEN, W. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, 2010. 437 p.
- RODRIGUEZ-VALLE, M.; VANCE, M.; MOOLHUIJZEN, P. M.; TAO, X.; LEW-TABOR, A. E. Differential recognition by tick-resistant cattle of the recombinantly expressed *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor-3 (RMS-3). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 3, n. 3, 2012. 159-169 p.
- SALDIVAR, L.; GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; BENDELE, K. G.; GONDRO, C.; BRAYTON, K. A. Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 6, 2008. 597-606 p.
- SANGAMNATDEJ, S.; PAESEN, G. C.; SLOVAK, M.; NUTTALL, P. A. A high affinity serotonin-and histamine-binding lipocalin from tick saliva. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 1, 2002. 79-86 p.
- 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, 1995. 467-470 p.
- SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n.109-116, 2012.
- SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; SILVA VAZ Jr, I. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 1-2, 2012. 149-156 p.
- SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS Letts**, v. 580, 2006. 2985-2992 p.

- SETTE, A. Reverse Vaccinology: Developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, 2010. 530-541 p.
- SILVA VAZ Jr, I.; LOGULLO, C.; TERMIGNONI, C. Caracterização de novos antígenos em *Boophilus microplus*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES**, Outro Preto, MG. 2004, 13 p.
- SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; CAFFREY, C. R.; MAREŠ, M.; KOPÁČEK, P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, 2013. 276-285 p.
- STUTZER, C.; VAN ZYL, W. A.; OLIVIER, N. A.; RICHARDS, S.; MARITZ-OLIVIER, C. Gene expression profiling of adult female tissues in feeding *Rhipicephalus microplus* cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 43, 2013. 541-554 p.
- TETTELIN, H. The bacterial pan-genome and reverse vaccinology. **Microbial Pathogenomics**, vol. 6, 2009. 35-47 p.
- Van ZYL, W. A.; STUTZER, C.; OLIVIER, N. A.; MARITZ-OLIVIER, C. Comparative microarray analyses of adult female midgut tissues from feeding *Rhipicephalus* species. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 1, 2015. 84-90 p.
- VILLAR, M.; MARINA, A.; De La FUENTE, J. Applying proteomics to tick vaccine development: where are we? **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 3, 2017. 211-221 p.
- VIVONA, S.; GARDY, J. L.; RAMACHANDRAN, S.; BRINKMAN, F. S.; RAGHAVA, G. P. S.; FLOWER, D. R.; FILIPPINI, F. Computer-aided biotechnology: from immuno-informatics to reverse vaccinology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 4, 2008. 190-200 p.
- WANG, M.; GUERRERO, F. D.; PERTEA, G.; NENE, V. M. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Genomics**, v. 8, 2007. 368, p.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, 2009. 57-63 p.
- WESTERMANN, A. J.; GORSKI, S. A.; VOGEL, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nature Review Microbiology**, v. 10, n. 9, 2012. 618 p.
- WESTERMANN, A. J.; BARQUIST, L.; VOGEL, J. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p.e1006033, 2017.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129 (Suppl.), 2004. 367-387 p.
- WILLADSEN P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, 2006. 161-168 p.
- WILLADSEN, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope. **Trends in Parasitology**, v. 4, 2008. 164-167 p.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, 1989. 1346-1351 p.
- ZENG, L.; WANG, D.; HU, N.; ZHU, Q.; CHEN, K.; DONG, K.; ZHANG, Y.; YAO, Y.; GUO, X.; CHANG, Y. F.; ZHU, Y. A novel pan-genome reverse vaccinology approach employing a negative-selection strategy for screening surface-exposed antigens against leptospirosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. 396 p.
- ZHAO, S.; FUNG-LEUNG, W. P.; BITTNER, A.; NGO, K.; LIU, X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p.e78644, 2014.
- ZIVKOVIC, Z.; ESTEVES, E.; ALMAZÁN, C.; DAFFRE, S.; NIJHOF, A. M.; KOCAN, K. M.; JONGEJAN, F.; De La FUENTE, J. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, 2010. 186 p.