

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Rafael Destro Rosa Tiveron

VACINOLOGIA REVERSA DE CANDIDATOS CONTRA VETORES  
PARASITIFORMES E AGENTES CAUSADORES DE FEBRE MACULOSA DAS  
AMÉRICAS

Uberaba

2023

Rafael Destro Rosa Tiveron

VACINOLOGIA REVERSA DE CANDIDATOS CONTRA VETORES  
PARASITIFORMES E AGENTES CAUSADORES DE FEBRE MACULOSA DAS  
AMÉRICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical e Infectologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

Uberaba

2023

**Catálogo na fonte:**

**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

T544v Tiveron, Rafael Destro Rosa  
Vacinologia reversa de candidatos contra vetores parasitiformes e agentes causadores de febre maculosa das Américas / Rafael Destro Rosa Tiveron. -- 2023.  
97 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023  
Orientador: Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira  
Coorientador: Prof. Dr. Siomar de Castro Soares

1. Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. 2. Rickettsia. 3. Infestações por Carrapato. 4. Vacinas. I. Oliveira, Carlo José Freire de. I. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.993

## **AGRADECIMENTOS**

Ao orientador Prof. Carlo José Freire de Oliveira, por encorajar a retomada dos estudos de pós-graduação e por me permitir continuar a me aperfeiçoar na área de Bioinformática, agora com enfoque em Imunoparasitologia. Agradeço por proporcionar essa jornada mais leve, com humildade, amizade e perseverança diante dos novos desafios que a vida nos trás.

À UFTM, por meio da qual me habilita profissional e financeiramente desenvolver minhas habilidades acadêmico-científicas, dentro das diversas atividades que o servidor pode participar nesta Instituição.

A Deus e aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado e me apoiando ao enfrentar novos desafios, com carinho, com respeito e com paciência. Agradeço a Deus por estes pais, mais perfeitos não poderiam ser.

Ao co-orientador Prof. Siomar Soares e aos colegas de pesquisa, Tamires, Juliana, Andrei, Maisa e Bruno, que me auxiliaram e possibilitaram com que eu adquirisse conhecimentos teóricos e práticos, por meio dos quais eu chegaria, em conjunto com o orientador, a definir e executar o projeto final descrito nesta monografia, e a gerar os seus resultados. Agradeço pelas oportunidades de colaboração e pela paciência em trabalhos que infelizmente não puderam ser continuados até o momento.

Aos demais colegas e familiares, por aguardar e se manterem firmes diante das minhas ausências, pelo quanto pude contribuir profissional e socialmente diante dos diversos momentos de convivência e trocas de experiências.

## RESUMO

A febre maculosa é uma infecção de rápida progressão e causada por bactérias do gênero *Rickettsia*. Nas Américas, até 80% dos casos sintomáticos humanos evoluem para óbito. Já nos animais, a doença também pode evoluir para formas graves, com destaque especial aos cães dentre os animais domésticos. As riquetsias causadoras desta enfermidade são majoritariamente transmitidas por carrapatos, cuja maior diversidade de espécies transmissoras pertencem ao gênero *Amblyomma*. Ensaio recentes demonstraram que já existem alvos vacinais promissores provenientes dessas riquetsias. No entanto, ainda não existem vacinas para as pessoas ou vacinas que protejam simultaneamente os humanos e os animais contra todas as formas da doença. É importante destacar que certas proteínas salivares de artrópodes hematófagos são capazes de gerar resposta imune no hospedeiro, não só contra o vetor, mas também contra certos agentes infecciosos transmitidos. Dessa forma, vacinas mais eficazes contra a febre maculosa são passíveis de serem desenvolvidas ao combinar antígenos tanto de riquetsias quanto de carrapatos transmissores. Na tentativa de prospectar antígenos vacinais tanto desses patógenos quanto de seus vetores parasitiformes, este trabalho propôs levantar, por vacinologia reversa, a atual diversidade de proteínas antigênicas a serem testadas no combate da febre maculosa das Américas (FMA). As sequências primárias de proteínas foram selecionadas e determinadas a partir de proteomas e transcriptomas, respectivamente, de agentes e carrapatos clinicamente relevantes para a doença humana no continente americano. Com o auxílio de estratégias inovadoras para montar transcritos de artrópodes em alto rendimento e para acurar a seleção de sequências alvos, foi possível evidenciar elevada quantidade de candidatos vacinais principalmente para a espécie *R. rickettsii* (48) dentre os agentes, e para a espécie *A. americanum* (17.641) dentre os vetores de FMA. Estiveram presentes de 61 a 554 alvos salivares/intestinais antigênicos e comuns entre os vetores, enquanto 21 antígenos bacterianos foram encontrados conservados entre as riquetsias analisadas. Apresentaram  $\geq 90\%$  de antigenicidade dezenas de novas sequências similares a proteínas de artrópodes e classificadas como antihe-mostáticas, de matriz extracelular, estruturais e de desenvolvimento, controladoras de crescimento microbiano e sem função definida. Foram identificados mais de 9 novos antígenos nessas riquetsias, destacando fatores de virulência, estabilizadores de estruturas proteicas e sequências com domínio de função desconhecida (DUF). Diante das limitações e desvantagens que apresentam o diagnóstico, o tratamento e os métodos preventivos existentes, combinar os diversos candidatos disponíveis e avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo* tornam-se necessários ao desenvolver vacinas mais efetivas e capazes de impedir a evolução da FMA.

Palavras-chave: febre maculosa; riquetsia; carrapato; vacina; vacinologia reversa.

## ABSTRACT

Spotted fever is a rapidly progressive infection caused by bacterias of the genus *Rickettsia*. In the Americas, up to 80% of symptomatic human cases progress to death. In animals, the disease can also evolve to severe forms, with special emphasis on dogs among domestic animals. The rickettsias that cause this disease are mostly transmitted by ticks, whose greatest diversity of transmission species belong to the genus *Amblyomma*. Recent trials have shown that there are already promising vaccine targets from these rickettsias. However, there are still no vaccines for people or vaccines that simultaneously protect humans and animals against all forms of the disease. Importantly, certain salivary antigens of hematophagous arthropods are capable of inducing host immune response, not only against the vector, but also against certain transmitted infectious agents. Thus, more effective vaccines against this disease are likely to be developed by combining antigens from both rickettsias and their transmitting arthropods. In an attempt to prospect vaccine antigens from both these pathogens and their parasitic vectors, this study proposed to survey the current diversity of antigenic proteins to be tested against Spotted Fever of the Americas (SFA) by Reverse Vaccinology. Primary protein sequences were selected and determined from transcriptomes and proteomes of clinically relevant agents and ticks for human disease in the American continent. With the help of innovative strategies for high-throughput arthropod transcript assembly and to refine screening target sequences, it was possible to show a high yield of vaccine candidates mainly for *R. rickettsii* (48) among the agents, and for *A. americanum* (17,641) among the SFA vectors. From 61 to 554 antigenic and shared salivary/intestinal targets were present among the vectors, while 21 bacterial antigens were found conserved among the analyzed rickettsias. Dozens of novel sequences similar to arthropod proteins and classified as antihemostatic, extracellular matrix, structural and developmental, microbial growth controllers and without defined function showed  $\geq 90\%$  antigenicity. More than 9 new antigens from rickettsias were identified, highlighting virulence factors, stabilizers of protein structures and sequences with domain of unknown function. Due to the limitations and disadvantages of existing diagnostic, treatment and preventive methods, combining the various candidates available and evaluating their efficacy in vitro and in vivo become necessary when developing more effective vaccines capable of preventing the evolution of SFA.

Keywords: spotted fever; rickettsia; tick; vaccine; reverse vaccinology.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>FEBRE MACULOSA DAS AMÉRICAS (FMA)</b>	<b>10</b>
2.1	VETORES PARASITIFORMES TRANSMISSORES DE FMA	12
2.1.1	<b>Distribuição geográfica dos principais transmissores parasiti- formes de RMSF</b>	<b>16</b>
2.1.2	<b>Distribuição geográfica dos principais transmissores parasiti- formes da doença do Maculatum e das febres 364D e africana</b>	<b>18</b>
2.2	CICLO SFGR-VETOR PARASITIFORME	20
2.3	CICLO SFGR-HOSPEDEIRO VERTEBRADO	21
2.4	ESTRATÉGIAS POTENCIAIS DE VACINAÇÃO CONTRA SFGR	23
2.4.1	<b>Neutralização da bactéria no hospedeiro vertebrado</b>	<b>24</b>
2.4.2	<b>Imunoindução pelos antígenos da célula inteira de SFGR</b>	<b>25</b>
2.4.3	<b>Imunoindução por subunidades peptídicas da SFGR</b>	<b>26</b>
2.4.4	<b>Vacinologia reversa aplicada às SFGRs</b>	<b>27</b>
2.4.5	<b>Ataque ao carrapato e à sua densidade populacional</b>	<b>29</b>
2.4.6	<b>A saliva na transmissão de SFGR a hospedeiros</b>	<b>31</b>
2.5	OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA PARA A VACINOLOGIA REVERSA APLICADA AOS VETORES PARASITIFORMES	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	PRINCIPAL	35
3.2	ESPECÍFICOS	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1	SELEÇÃO DE DADOS ÔMICOS	36
4.1.1	<b>Proteomas bacterianos</b>	<b>36</b>
4.1.2	<b>Transcriptomas de vetores</b>	<b>37</b>
4.1.2.1	<i>Enriquecimento de transcritos com remontagem por multi k-mer</i>	39
4.2	PREDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS	41

4.3	SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS NÃO HOMÓLOGAS AO HOSPEDEIRO E AO MODELO ANIMAL . . . . .	41
4.4	PREDIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS CELULARES . . .	41
4.5	PREDIÇÃO DA ANTIGENICIDADE . . . . .	42
4.6	EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS DO MICROBIOMA DO VETOR E DO HOSPEDEIRO REPASTADO . . . . .	42
4.7	SELEÇÃO POR HOMOLOGIA DE ANTÍGENOS PROTEICOS SALIVARES E INTESTINAIS DO <i>D. VARIABILIS</i> . . . . .	43
4.8	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS ÀQUELAS DE BACTÉRIAS BENÉFICAS AO HOSPEDEIRO E PRESENTES NO INTES- TINO HUMANO . . . . .	43
4.9	AVALIAÇÃO DA ESSENCIALIDADE PROTEICA E FATORES DE VI- RULÊNCIA . . . . .	43
4.10	AVALIAÇÃO DA ALERGENICIDADE DOS ANTÍGENOS . . . . .	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> . . . . .	<b>45</b>
5.1	RENDIMENTO DE TRANSCRITOS PARA A PROCURA DE ANTÍ- GENOS . . . . .	45
5.2	MODELO EUCARIÓTICO PROPOSTO PARA A AVALIAÇÃO DE AN- TIGENICIDADE EM SEQUÊNCIAS DE CARRAPATOS . . . . .	46
5.3	REPERTÓRIO DE ANTÍGENOS EXPOSTOS AO MEIO EXTRACE- LULAR PARA OS VETORES PARASITIFORMES . . . . .	47
5.4	REPERTÓRIO DE ANTÍGENOS EXPOSTOS AO MEIO EXTRACE- LULAR PARA OS AGENTES . . . . .	55
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> . . . . .	<b>59</b>
6.1	IMPACTO DA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E DA MONTAGEM EMPREGADA SOBRE O RENDIMENTO E FOR- MAÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS . . . . .	59
6.2	ASPECTOS PREDITIVOS DO REPERTÓRIO DE SEQUÊNCIAS PRO- TEICAS SELECIONADAS . . . . .	60
6.3	CANDIDATOS UNIVERSAIS DESTACADOS PARA ENSAIOS DE COM- BATE À FMA . . . . .	62
<b>6.3.1</b>	<b>Candidatos secretados pelas glândulas salivares de vetores pa- rasitiformes</b> . . . . .	<b>62</b>

<b>6.3.2</b>	<b>Candidatos membranares e de superfície de vetores parasitiformes expostos ao contato sanguíneo do vertebrado . . . . .</b>	<b>65</b>
<b>6.3.3</b>	<b>Candidatos dos agentes bacterianos . . . . .</b>	<b>67</b>
6.4	PERSPECTIVA DA APLICAÇÃO DE OUTRAS ESTRATÉGIAS VACINAIS COM CANDIDATOS PROTEICOS PROSPECTADOS . . . . .	70
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO . . . . .</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de vacinas faz-se necessário para reduzir a incidência de casos de febre maculosa, que acontece em decorrência do crescimento populacional e da invasão inevitável do homem aos ambientes onde são encontrados os reservatórios silvestres de riquétsias. Apesar dos avanços dos estudos sobre a etiopatogenia e o aprimoramento dos métodos preventivos e curativos contra esta enfermidade bacteriana, ainda não há disponíveis vacinas aplicáveis às pessoas.

A expansão da agropecuária em direção a áreas de preservação ambiental vem desestabilizando ecossistemas e causando a redução de predadores naturais e, para protegê-los, foram criadas diversas leis de proteção à caça e à captura, que acabam por induzir o crescimento populacional destes reservatórios. Sendo assim, o contato destes com o homem torna-se cada vez mais frequente e, conseqüentemente, devido à maior proximidade entre animais domésticos e silvestres, os vetores de riquétsias encontram novos hospedeiros amplificadores das suas linhagens.<sup>(1)</sup>

Diferentes espécies de carrapatos podem compartilhar o mesmo hospedeiro. Assim sendo, é factível a disseminação, entre os artrópodes, de riquétsias e de outras bactérias causadoras de doenças nos vertebrados. Isso é comum tanto em Centros de Controle de Zoonoses como em abrigos de animais domésticos, onde os cachorros urbanos tendem a ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da febre maculosa – já que são menos expostos a ambientes silvestres e, portanto, às infecções recorrentes.<sup>(1, 2)</sup>

Na América, existem diversas lacunas na distribuição geográfica das riquétsias causadoras de febre maculosa e dos carrapatos que possam carrear-las (Figura 3). Muitas dessas lacunas são decorrentes da falta de vigilância e evidência científica adequada, que comprove tanto a presença da doença como dos seus fatores locais de causa. Isto possui implicações clínico-epidemiológicas importantes que dificultam o controle adequado da transmissão ativa em todo o continente.<sup>(3)</sup>

Sendo assim, a vacinação ainda inexistente se faz necessária também diante das limitações apresentadas durante o diagnóstico, o tratamento e pelos demais métodos preventivos existentes, cuja demora para que a cura seja alcançada é fatal em muitas das vezes, principalmente para os indivíduos imunossuprimidos. Além disso, os agentes causadores de febre maculosa são sensíveis a pouquíssimos antibióticos e existem pessoas intolerantes a alguns deles, como à doxiciclina que é o mais eficaz contra a doença.<sup>(4)</sup>

Diante dos mecanismos envolvidos com a invasão e a colonização parasitária nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, é fundamental que a prospecção de candidatos vacinais seja baseada na elicitação de respostas imunológicas direcionadas a alvos celulares que possam participar desses processos. Haja visto, tais alvos po-

dem ser essenciais para controlar a sobrevivência e o desenvolvimento não só do agente infeccioso como também do vetor.<sup>(5)</sup> Além disso, novos achados sugerem que certas moléculas de artrópodes hematófagos – dependendo da espécie investigada – podem ser pró-inflamatórias e contribuir para a proteção do hospedeiro a patologias infecciosas, ao serem empregadas para elevar a resistência do vertebrado à infecção parasitária.<sup>(6)</sup>

O avanço na identificação de novas moléculas imunogênicas foi impulsionado, nos últimos anos, pela incorporação e pelo desenvolvimento de métodos computacionais dentro da área biológica. Considerando todo este cenário, por meio de métodos mais robustos, este trabalho propôs predizer, em larga escala, a presença de possíveis antígenos, não apenas das espécies mais relevantes de riquetsias, mas também de vetores de febre maculosa das Américas (FMA).

Com este feito, objetivou-se apontar proteínas antigênicas capazes de contribuir tanto para a infecção como para a manutenção de mecanismos envolvidos no ectoparasitismo e na transmissão do agente bacteriano ao hospedeiro humano. Diante dos alvos levantados, incluindo novas proteínas antigênicas, a análise seletiva dos mesmos tornou-se importante ao evidenciar a grandeza de antígenos com baixo risco de comprometimento da homeostase fisiológica no organismo vertebrado e de maior sucesso como imunoprotetores em futuros ensaios vacinais *in vivo*.

## 2 FEBRE MACULOSA DAS AMÉRICAS (FMA)

A febre maculosa refere-se ao termo genérico de um grupo de doenças infecciosas febris ocasionadas por mais de 30 espécies de bactérias do gênero *Rickettsia*. Esses procariotos são intracelulares gram-negativos, patogênicos ao homem e são transmitidos por certas espécies de carrapatos, ácaros, pulgas e piolhos. A febre maculosa ocorre tanto em áreas tropicais como subtropicais em todo o planeta, mas cada doença ocupa espaços geográficos específicos onde estão presentes o vetor e as atividades humanas que dão manutenção à transmissibilidade local.<sup>(7, 8)</sup>

Devido à invasão de áreas silvestres, à globalização e às mudanças climáticas, o crescente número de casos é tal que já é possível perceber o aparecimento de casos fortuitos ou menos frequentes em países distantes da provável origem. Em decorrência de todos esses fatores, novos agentes são passíveis de se instalar permanentemente a um novo ambiente.<sup>(9, 10)</sup>

No continente americano, apesar da existência de diferentes espécies de agentes etiológicos, apenas a febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain Spotted Fever* – RMSF) pôde ser observada por toda a América e não houve relato da sua presença em outros continentes até então. Por outro lado, assim como visto com outras enfermidades na Idade Moderna, certas febres do Velho Mundo também migraram para o Novo Mundo.

Contudo, as febres maculosas estrangeiras que hoje parecem ser mais preocupantes para as Américas são contraídas pelos próprios hospedeiros americanos em outros países e correm o risco de se instalar e espalhar juntamente com as doenças nativas. A exemplificar, dentre as febres maculosas encontradas na África, destaca-se a febre da picada do carrapato africano, causada pela *R. africae*. Responsável por 90% dos casos de febres maculosas contraídas pelos norte-americanos neste continente, esta doença também atinge a população caribenha.<sup>(8, 11)</sup>

Da Europa, é importante destacar a febre maculosa do Mediterrâneo causada pela *R. conorii conorii*, também frequente nos viajantes americanos, e a febre maculosa causada pela *R. massiliae*. Desta última, o primeiro caso identificado na América ocorreu em 2005 em Buenos Aires. No entanto, até o momento, apenas foram identificados vetores infectados no Arizona e na Califórnia.<sup>(8, 11, 12)</sup> Assim, o monitoramento e a prevenção são importantes para que tais enfermidades não se tornem clinicamente relevantes nos EUA e na Argentina.

A maior prevalência de casos de febres maculosas no continente americano é da América do Norte, o que levou o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em conjunto com o Centro Nacional de Doenças Infecciosas Emergentes e Zoonóticas (NCEZID) e a Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores (DVBD) a divulgarem

informações sobre tais patologias presentes nos EUA, as quais constituem bases para o estudo da FMA.<sup>(13, 14, 15)</sup>

Estão presentes naquele país a riquetsiose provocada pela *R. parkeri*, identificada desde 2004, com pouco mais de 40 casos e localizada predominantemente na costa sudeste; a febre do carrapato da costa do Pacífico causada pela *Rickettsia* 364D, detectada desde 2010, com 14 casos na Califórnia; e a RMSF decorrente da infecção por *R. rickettsii* – sendo esta predominante e a mais fatal –, com milhares de casos já reportados desde o final do século XIX e notificados pelo Governo desde 1920, incidindo entre 250 a 1200 casos por ano. A incidência dessas doenças é maior no verão e principalmente em áreas rurais e suburbanas.<sup>(13, 14, 15, 16)</sup>

Outra doença presente, porém não mais considerada como ocasionada por riquetsia do grupo de febre maculosa (SFGR), é a varicela rickettsiana, ocasionada pela *R. akari*, que acomete frequentemente a população do Nordeste do país, principalmente na cidade de Nova York. Diferente das outras três riquetsioses americanas, casos desta varicela já foram relatados em alguns países da Europa, na Rússia, na Coreia do Norte e na África do Sul.<sup>(13)</sup>

A RMSF também é a febre maculosa mais prevalente no Canadá. Porém, sua incidência advém principalmente de viajantes canadenses que a contraem no país vizinho, enquanto que o risco de contraí-la no próprio país é baixo, pois, dentre os vetores locais encontrados, predominam os não infectados. Em menor quantidade, também ocorrem casos esporádicos de febres maculosas do Velho Mundo, provenientes, por exemplo, da África (*R. africae*), Índia (*R. conorii*) e Austrália (*R. honei*).<sup>(8, 15)</sup>

O predomínio da RMSF diante das outras doenças também se estende para a América Latina e recebe outros nomes mais conhecidos.<sup>(16)</sup> Por ser uma doença estritamente americana, é chamada de febre maculosa do Novo Mundo. Assim como nos EUAs, no México e na Guatemala, também pode ser chamada de febre manchada (das Montanhas Rochosas) – em decorrência dos surtos que ocorreram por volta de 1940. A RMSF já acumula centenas de casos esporádicos, porém preocupantes devido à letalidade crescente e à mortalidade que chega a 80% durante períodos epidêmicos.<sup>(17)</sup>

Na Colômbia, por volta de 1935, 65 pessoas foram infectadas na cidade de Tobia (em Cundinamarca, região vetorial do *A. patinoi* – Figura 3) e apenas 3 sobreviveram, sendo assim chamada de febre de Tobia.<sup>(18)</sup> Mas 6 anos antes, os primeiros casos no Brasil já haviam aparecido na cidade de São Paulo – a febre (do tifo exantemático) de São Paulo –,<sup>(19)</sup> mais tarde seria diagnosticada em outras regiões do país e passaria a ser chamada de Febre Maculosa Brasileira – FMB.<sup>(20)</sup> Os primeiros casos de RMSF na Argentina de que se tem registro ocorreram mais tarde, no início de 1994, cujos sintomas acometeram 6 crianças da Província de Jujuy.<sup>(21)</sup>

Após 10 anos naquele mesmo país, entre 2004 a 2009, 9 casos de riquetsiose por

*R. parkeri* surgiram nas Províncias de Buenos Aires, Chaco e Entre Ríos.<sup>(22)</sup> Em 2009, 2 casos de varicela rickettsiana foram diagnosticados no México,<sup>(23)</sup> enquanto que esta doença já estava presente na Costa Rica, antes mesmo do seu primeiro registro em 1971.<sup>(24)</sup> Com exceção da RMSF que, se não tratada, pode levar à fatalidade em pelo menos 20% dos casos,<sup>(16)</sup> as demais febres maculosas ainda não possuem relevância clínica considerável na América Latina, mesmo podendo ocasionar quadros clínicos graves. Existem populações de vetores em muitos desses países, inclusive no Uruguai e no Brasil, carreando agentes dessas doenças, que trazem o risco a focos endêmicos.<sup>(8)</sup>

Dois anos após o aparecimento dos casos costa-riquenhos de 1971, a descoberta de uma nova linhagem bacteriana em carrapatos americanos chamada *R. amblyom-mii*, atual *R. amblyommatis*, gerou discussão quanto à possibilidade deste patógeno infectar o homem, por possuir reação cruzada com as SFGRs e ser responsável por vários casos de RMSF de sintomatologia leve. Estes casos ocorrem em locais dos EUA onde são encontrados vetores parasitiformes com a *R. amblyommatis*.<sup>(25)</sup>

No Brasil, a RMSF também é a riquetsiose presente com maior taxa de fatalidade.<sup>(2)</sup> Em grande parte do continente americano, a taxa de fatalidade por febre maculosa chega a ser maior comparada às taxas somadas por dengue e influenza.<sup>(17)</sup> Em países latinos onde não há financiamento adequado à saúde é comum faltar medicamentos e isto pode comprometer a disponibilidade hospitalar de doxiciclina, usada no tratamento convencional da FMA.<sup>(17)</sup>

Por fim, é importante citar a febre maculosa transmitida pela pulga *Ctenocephali-des felis* e causada pela *R. felis*. Presente em praticamente todos os continentes, os primeiros casos isolados americanos ocorreram entre 1994 a 2001 nos EUA, México e Brasil. Esta doença é clinicamente consistente com as outras febres desencadeadas por SFGRs. Contudo, assim como a *R. akari*, a *R. felis* não é uma SFGR, e ambas são classificadas, filogeneticamente, como riquetsias de transição. Vetores infectados com *R. felis* parasitando animais domésticos já foram encontrados no Canadá, EUA, México, Guatemala, Caribe, Costa Rica, Argentina, Brasil, Uruguai e Chile.<sup>(8, 9, 26)</sup>

## 2.1 VETORES PARASITIFORMES TRANSMISSORES DE FMA

As febres maculosas são decorrentes principalmente de infecções por SFGRs transmitidas por vetores da ordem Parasitiformes, ordem esta de artrópodes em que estão alocados os carrapatos ou carraças. Certas espécies podem transmitir mais de um agente causador de doença, como doença de Lyme, anaplasmose, babesiose, febre recorrente transmitida pelo carrapato, diversas arboviroses, além das riquetsioses. Tais espécies de maior interesse à saúde humana pertencem à subordem Ixodida, sendo a família Ixodidae, ou seja, as carraças duras, responsável pela maior

frequência de transmissão vetorial dessas doenças nas Américas e pelos casos de FMA (Figura 1).<sup>(8, 27)</sup>

Esses vetores comumente habitam locais onde costumam tráfegar seus hospedeiros, como florestas, áreas rurais ou urbanas levemente arborizadas, campos e pastagens – principalmente em áreas com cobertura vegetal mais densa –, trilhas com vegetação rasteira, grama alta, arbustos suspensos, na terra úmida, no tijolo seco ao sol e em resíduos vegetais de áreas ajardinadas, ou mesmo em móveis, colchões e paredes de recintos com animais domésticos não tratados ou de casas de pacientes. Aparecem com frequência na presença de calor e umidade – no verão, principalmente os machos e as fêmeas adultas em oviposição –, assim como no outono e na primavera – predominando, respectivamente, as larvas e as ninfas.<sup>(14, 28, 29)</sup>

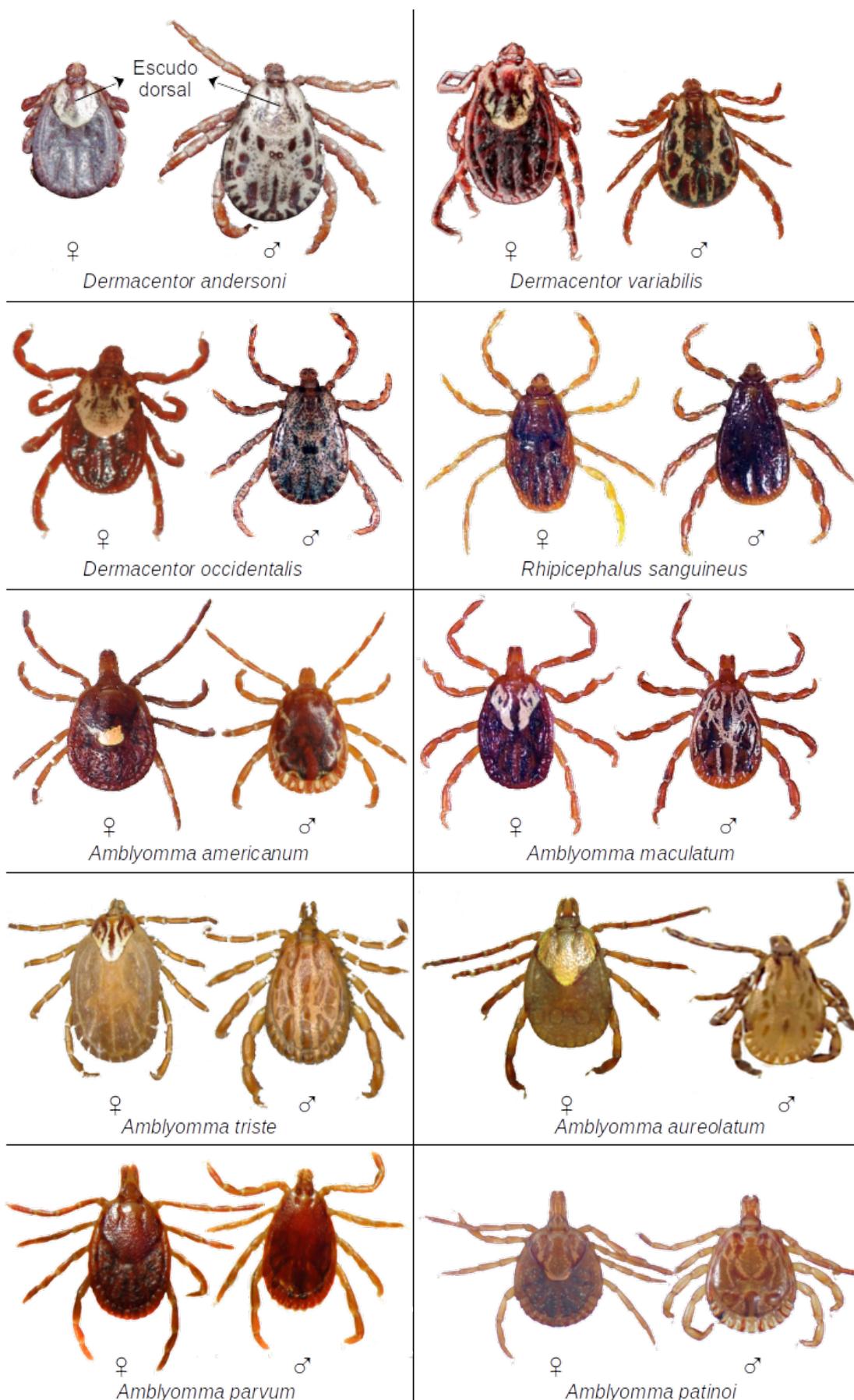
Em condições naturais, considerando cenários menos favoráveis, um carrapato pode levar até três anos para completar seu ciclo de vida, em decorrência dos intervalos invernosos e até que um novo vertebrado seja encontrado e ocupado – destacando a preferência das formas adultas por hospedeiros de médio ou de grande porte. A nutrição por hematofagia em cada fase é, portanto, necessária, para que o vetor continue com seu ciclo biológico.<sup>(17, 29, 30, 31)</sup>

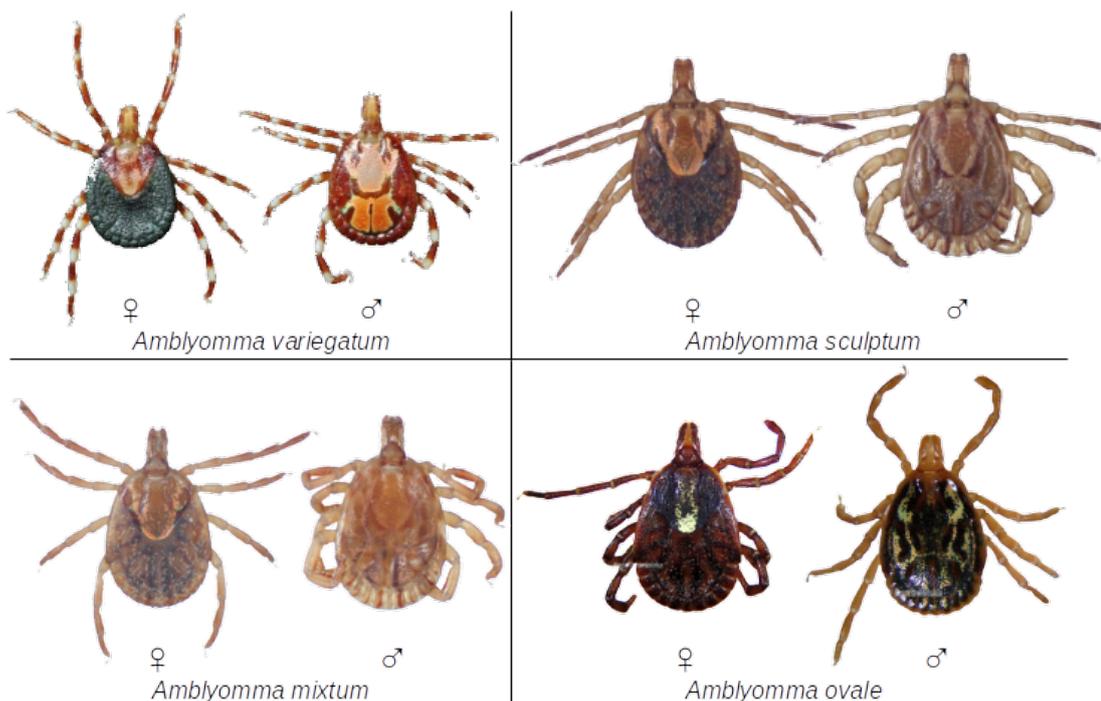
Os carrapatos são ectoparasitos não só de mamíferos, como também de aves, répteis e anfíbios.<sup>(32)</sup> Ao detectarem o vertebrado por meio da sua emissão de calor, vibração, sombra, odor, umidade e/ou concentração elevada de CO<sub>2</sub>,<sup>(33)</sup> esses invertebrados alcançam a superfície do hospedeiro e microlesionam focalmente sua pele por meio de quelíceras localizadas na extremidade anterior do hipostômio dentado, o qual servirá de canal para a deposição da saliva.<sup>(34)</sup>

Assim como as SFGRs, diversos patógenos transmissíveis aos vertebrados estão contidos na secreção salivar, produzida por um par de glândulas salivares ântero-lateralizadas, que não se intercomunicam (Figura 2). Porém, cada glândula possui um ducto excretor principal para direcionar a saliva à cavidade bucal e, assim, ao hipostômio. Também é por meio deste que o sangue é succionado e direcionado ao intestino anterior, seguido por um novo ciclo de regurgitamento salivar que se repete por várias vezes.<sup>(35)</sup>

Nos locais das picadas, é comum aparecer lesões eritematosas, erosões focais, úlceras crostosas – as escaras de inoculação –, nódulos e alopecia. Os carrapatos conseguem realizar longos períodos de hematofagia, chegando a semanas, o que pode causar inquietação, irritação, perda de peso, anemia e paralisia no hospedeiro, em decorrência da introdução de neurotoxinas salivares, capazes de causar parada cardiorrespiratória na ausência de tratamento. Acredita-se que uma única fêmea adulta de espécies que produzam tais neurotoxinas seja capaz de causar a morte de animais de pequeno e animais jovens de médio e grande portes.<sup>(32, 36, 37)</sup>

Figura 1 – Formas adultas dos principais carrapatos transmissores de FMA



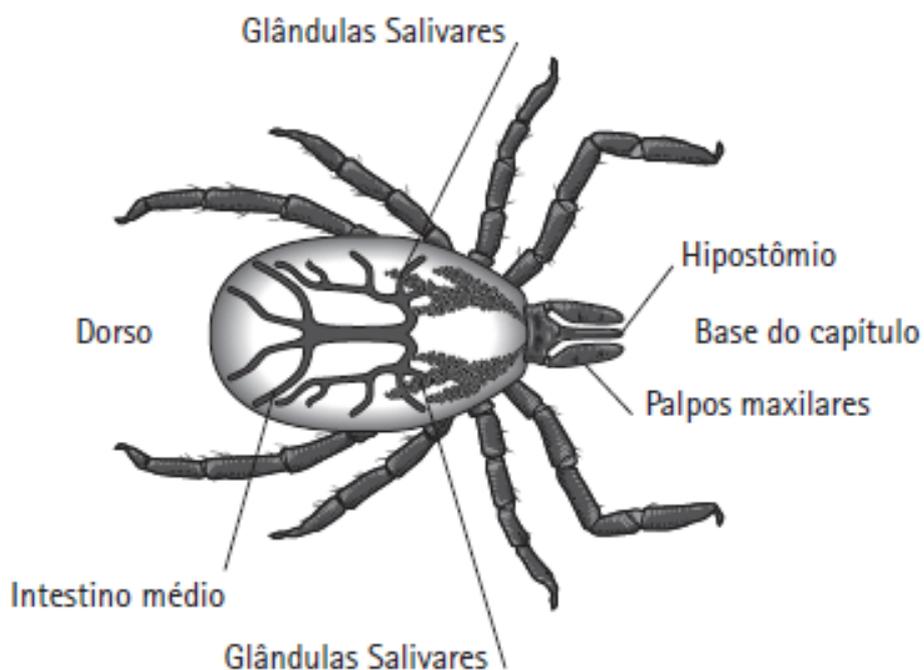


Fonte: De Daktaridudu, 2016;<sup>(38, 39)</sup> Droege, 2013;<sup>(40)</sup> Schmidt, 2013;<sup>(41)</sup> Bryant, 2007;<sup>(42)</sup> TickEncounter - The University of Rhode Island;<sup>(43)</sup> Occi, 2011;<sup>(44)</sup> TICKsafety.com;<sup>(45, 46)</sup> Guzmán-Cornejo, 2009;<sup>(47, 48)</sup> Museu do carrapato - Embrapa Gado de Corte, MS;<sup>(49, 50, 51)</sup> Mongruel *et al.*, 2018;<sup>(52)</sup> Naturdata.com;<sup>(53)</sup> Nava, 2014;<sup>(54)</sup> Ogrzewalska, 2007;<sup>(55)</sup> Ogrzewalska, 2019.<sup>(56)</sup>

Nota: *D. andersoni* (carrapato das florestas das Montanhas Rochosas), *D. variabilis* (carrapato do cachorro americano), *D. occidentalis* (carrapato da costa do Pacífico), *R. sanguineus* (carrapato marrom/vermelho do cão), *A. maculatum* (carrapato da costa do Golfo), *A. aureolatum* (carrapato amarelo do cão), *A. variegatum* (carrapato bont tropical/africano, carrapato senegalês ou carrapato macho de ouro da Antígua) e *A. sculptum* (carrapato-estrela, carrapato do cavalo, adulto rodoleiro, timicuim-amarelo/castanho, carrapato-pólvora/vermelho, formas jovens como vermelhinho ou carrapatinho).

A paralisia também pode acometer os seres humanos e as principais espécies transmissoras de FMA são capazes de ocasioná-la (Figura 1). Apesar de rara, pode ser confundida com outras desordens neurais agudas, como miastenia, botulismo, difteria, poliomielite, paralisia histérica e entre outras. Tal confusão pode levar ao comprometimento do seu diagnóstico precoce, conseqüentemente, senão o óbito, a chance maior de sequelas após o tratamento tardio. Desde 1912, os EUA e o Canadá lidam com grande parte dos casos mundiais de paralisia.

Figura 2 – Esquema básico das principais estruturas do carrapato envolvidas na hematofagia



Fonte: De Patton *et al.*, 2012.<sup>(57)</sup>

Já no carrapato, o sangue ingerido é distribuído às projeções do intestino médio ventricular, providas de numerosos divertículos, aonde passa a se concentrar. Sem haver contato direto com a camada de células epiteliais, o alimento ainda permanece contido pela membrana glicoproteica peritrófica, para que proteases, hemoglobinas e anticorpos do vertebrado, assim como muitos microrganismos e suas toxinas possam ser inativados durante o processo de digestão. Contudo, os patógenos transmitidos pelos carrapatos ainda conseguem sobreviver e permanecem na luz intestinal ou instalam-se nos tecidos do vetor, como nas células intestinais e glandulares.<sup>(58)</sup>

Em decorrência da grande ingesta sanguínea (por dias seguidos) e da presença de uma cutícula expansível mesmo sob a proteção do escudo dorsal, o peso corporal de uma carraça dura pode elevar-se até 600 vezes, a depender da espécie. Além disso, a sobrevivência em jejum pode se estender de um (larvas) a muitos meses (ninfas e adultos), cujo um dos motivos é a lenta digestão da reserva sanguínea e, na fêmea, essa digestão pode ser acelerada para a postura de milhares de ovos.<sup>(37)</sup>

### 2.1.1 Distribuição geográfica dos principais transmissores parasitiformes de RMSF

A maior parte das transmissões de RMSF aos humanos decorre de espécies dos gêneros *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus*.<sup>(8)</sup> Quanto à distribuição (Figura

3), no oeste dos EUA, predomina a transmissão pelo *D. andersoni* que também se estende para as províncias do sudoeste do Canadá; no leste e sudeste dos EUA, regiões mais afetadas pela doença, a transmissão é devida ao *D. variabilis* e, secundariamente ao *A. americanum* – por tender a transmitir erliquiose em detrimento de outras doenças, a qual, porém, possui sintomas de RMSF; ainda, não menos importante, é considerado o carrapato que mais pica o homem dentre esses outros. No entanto, dentre essas espécies, a proporção de vetores infectados com a *R. rickettsii* em relação à *R. amblyommatis* é maior em *D. variabilis*.<sup>(5, 14, 15, 59, 60, 61)</sup>

No sudoeste, mais precisamente no Arizona e ao norte do México, predomina a transmissão de RMSF pelo *R. sanguineus*, enquanto que na região centro-norte dos EUA e ao noroeste e norte da cidade de Nova York, predomina a transmissão pelo *D. variabilis*, também presente no oeste da Califórnia e nas províncias do sudeste canadense. Atualmente, o CDC informa que o *R. sanguineus* já está em praticamente 100% do território dos EUA. Tanto este como o *A. americanum* também estão nas províncias do Canadá adjacentes ao território norte-americano.<sup>(14, 15, 60, 62, 63)</sup>

Apesar da transmissão acontecer principalmente pelo *R. sanguineus* na região centro-norte do México – em áreas urbanas e periurbanas –, também é possível encontrar o *A. mixtum*,<sup>(54)</sup> uma espécie do complexo *A. cajennense* sensu lato (s. l.), infectado naturalmente com linhagens menos virulentas de *R. rickettsii*. Neste país, outros carrapatos são passíveis de picar o homem e estão infectados, de forma menos frequente, com esta espécie de bactéria. Dentre eles, o *A. parvum* possui maior predominância dentre os vetores infectados.<sup>(17)</sup>

Atualmente, a incidência de RMSF na América Central é menor do que na América do Norte, não possui notificação governamental expressiva e está concentrada em Belize, Costa Rica (região centro-leste) e Panamá (região centro-sul). Dentre os vetores considerados de relevância clínica para esses países, podemos destacar o *R. sanguineus* e o *A. mixtum*. Além disso, ambas espécies já foram encontradas infectadas com *R. amblyommatis* nesses mesmos países.<sup>(9, 64)</sup>

Na América do Sul, a RMSF está presente na região centro-noroeste da Colômbia, noroeste da Argentina (Jujuy) e em certos biomas brasileiros – Cerrado, Pantanal e em áreas degradadas de Mata Atlântica da Região Sul e Sudeste –, podendo ser transmitida por espécies do complexo *A. cajennense* s. l. – como *A. patinoi*, *A. cajennense* sensu stricto (s. s.) e *A. sculptum*.<sup>(10, 20, 54, 64)</sup> Não obstante o *R. sanguineus* esteja distribuído em grande parte do território brasileiro e o *A. cajennense* s. s. também esteja presente na Região Amazônica, a participação dos mesmos em ciclos endêmicos da FMB ainda não foi comprovada.<sup>(54, 64, 65)</sup>

A transmissão pelo *A. sculptum* – carrapato que mais entra em contato com o brasileiro em áreas endêmicas – é predominante no interior de São Paulo, enquanto que em regiões urbanas e periurbanas próximas à Mata Atlântica, como na região

metropolitana de São Paulo, há o predomínio da transmissão pelo *A. aureolatum*.<sup>(10, 20)</sup> Dentre mais de mil casos de RMSF em 12 estados brasileiros, 400 vieram a óbito, sendo as maiores taxas de letalidade decorrentes de São Paulo, as quais já chegaram a atingir em torno de 60%. Por outro lado, as maiores taxas de incidência são de Santa Catarina e do Ceará.<sup>(1, 65)</sup>

### 2.1.2 Distribuição geográfica dos principais transmissores parasitiformes da doença do Maculatum e das febres 364D e africana

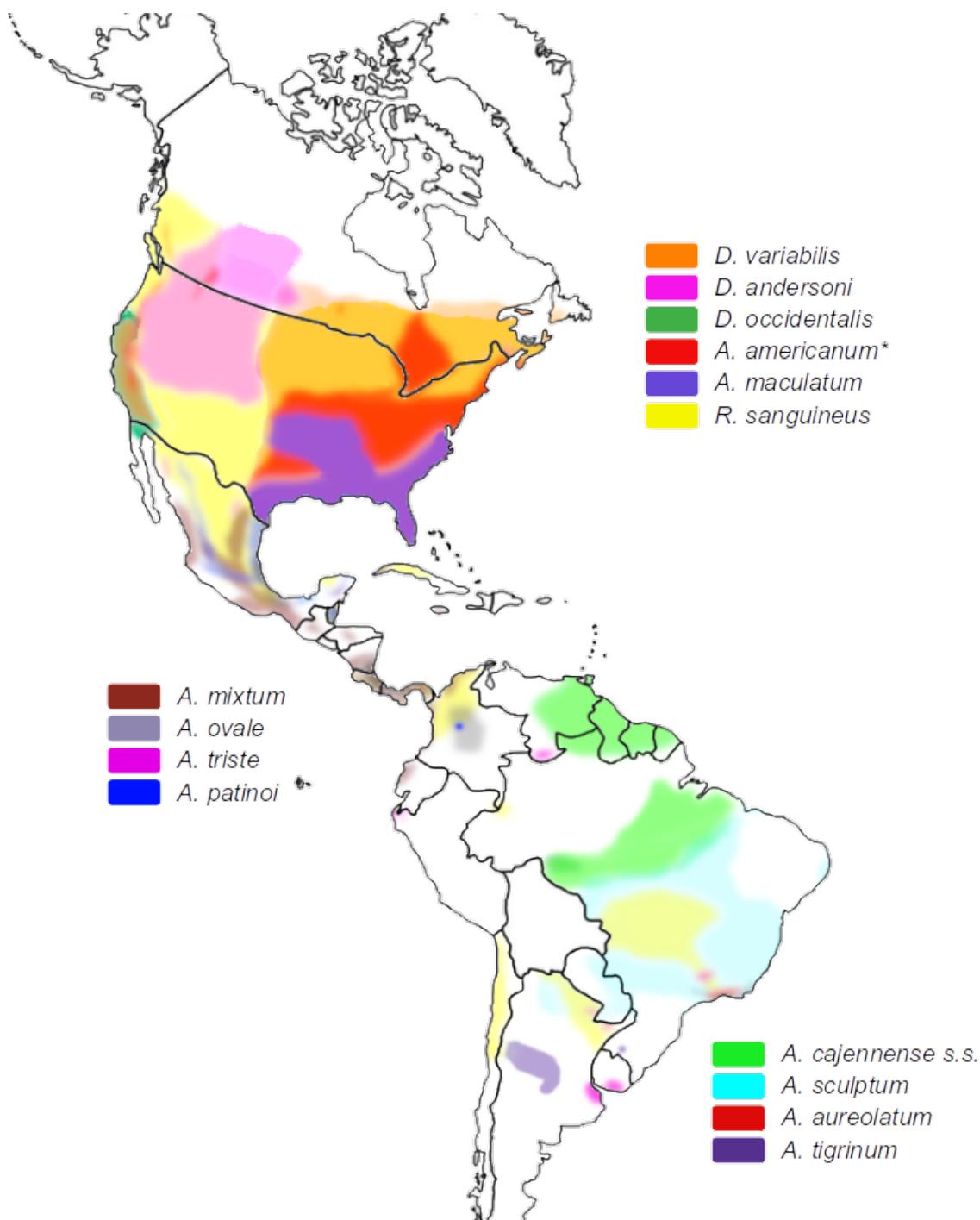
As demais febres não-RMSF são menos frequentes, tendem a serem manifestadas por sinais e sintomas mais brandos, porém são transmitidas não só por outros carrapatos, como também por determinadas espécies que podem veicular *R. rickettsii*. Nas Américas, os transmissores de três enfermidades merecem ser destacados devido à incidência maior de infecções humanas nas duas últimas décadas.<sup>(66)</sup>

De uma delas, a doença do Maculatum, que ganha esse nome justamente por ser transmitida pelo principal vetor do agente causador *R. parkeri*. O *A. maculatum* está presente na região costeira dos EUA voltada para o Oceano Atlântico. Sua distribuição vai desde o Texas até Maryland, incluindo Mississippi, Arkansas, Oklahoma, até o sul de Kansas, e toma boa parte dos territórios de todos esses estados. Por estar distribuído em quase mais da metade do Golfo do México, também é conhecido popularmente como o carrapato da costa do Golfo.<sup>(63)</sup>

Este vetor também está presente no nordeste e centro do México. Contudo, apenas ao final da última década, alguns casos de infecção humana por *R. parkeri* foram identificados neste país e, curiosamente, surgiram ao sul do Golfo do México, mais precisamente no Estado de Yucatán. A tendência é surgirem casos nos estados que contornam o Golfo, tanto em Campeche e Tabasco, pela possibilidade do encontro da *R. parkeri* em cães e porcos destes locais que são frequentemente parasitados por *A. maculatum* e, em Veracruz, pela presença de outro vetor comum desta bactéria, o *A. ovale*.<sup>(67, 68)</sup>

Ambos vetores também podem ser encontrados infectados com *R. amblyommatidis* em Belize, enquanto apenas o *A. ovale*, juntamente com o *A. mixtum*, já foram encontrados infectados na Costa Rica e na Nicarágua. No entanto, pouco se sabe a respeito da doença do Maculatum na América Central. Os últimos casos conhecidos ocorreram em Belize no início da primeira década deste século, apesar do frequente parasitismo humano por *A. maculatum* e *A. ovale* neste país.<sup>(9)</sup>

Figura 3 – Áreas geográficas de maior relevância onde estão distribuídos vetores parasitiformes passíveis de transmitir a FMA



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Baseado nos dados de Atlantic - Repellent Products;<sup>(62)</sup> Alkische & Peterson, 2022;<sup>(69)</sup> Cull, 2022;<sup>(70)</sup> Nelder *et al.*, 2019;<sup>(71)</sup> Alkische *et al.*, 2021;<sup>(72)</sup> Sánchez-Montes *et al.*, 2021;<sup>(73)</sup> Martins *et al.*, 2016;<sup>(74)</sup> Barbieri *et al.*, 2015;<sup>(75)</sup> Guglielmone *et al.*, 2013;<sup>(76)</sup> Burkman, 2009;<sup>(77)</sup> Guzman-Cornejo *et al.*, 2006;<sup>(78)</sup> Lado *et al.*, 2008;<sup>(79)</sup> Rommer *et al.*, 2014;<sup>(80)</sup> Weck *et al.*, 2016;<sup>(81)</sup> Faccini-Martínez *et al.*, 2015.<sup>(82)</sup> \*Já foi comprovado ser capaz de contribuir para os casos humanos de RMSF decorrentes de *R. rickettsii* e, assim, também pode transmitir *R. amblyommatis*.

É importante destacar que, na Costa Rica e na Nicarágua, já é possível encontrar *A. ovale* e *A. mixtum* também infectados com a *R. africae*, e não apenas o *A. variegatum* nas ilhas do leste do Mar do Caribe, vetor este passível de transmitir localmente a Febre Africana à população. Entretanto, apenas na ilha de Guadalupe foi possível evidenciar a transmissão vetorial para o homem.<sup>(64)</sup>

Já na América do Sul, outros carrapatos substituem a presença do *A. maculatum* na transmissão da *R. parkeri* e o *A. ovale* torna-se o principal responsável na Colômbia e nas áreas de Mata Atlântica do Brasil. Nestas áreas, o *A. aureolatum* contribui com a infecção humana, assim como o *A. triste* no Estado de Buenos Aires da Argentina, na região sul do Uruguai e possivelmente no interior de São Paulo, enquanto que o *A. tigrinum* é responsável por casos na região de Córdoba, Argentina.<sup>(3, 9, 64, 83)</sup>

Em 1978, Robert Philip *et al.* identificaram, em camundongos infectados, dois sorotipos de riquetsias que não possuíam o mesmo perfil de antígenos de superfície de outras espécies conhecidas. Esses sorotipos, por outro lado, corresponderiam à linhagem bacteriana encontrada em 1966 no *D. occidentalis*, denominada *Rickettsia* 364D, atualmente reclassificada como uma nova espécie, chamada *R. philipii*. Essa bactéria é capaz de causar uma forma branda de febre maculosa, raramente com erupção cutânea petequeial, que ocorre principalmente na Califórnia, EUA.<sup>(66)</sup>

Em 2008, foi constatada que a transmissão ao homem é devida a esse carrapato, mas menos de 10% dos encontrados em 15 condados deste estado, na região sudeste de Oregon e no nordeste da Baja California (México) estão infectados com o agente. Nesses mesmos locais, também é possível encontrar *R. sanguineus* infectado com *R. philipii*. Porém, em decorrência da baixa incidência dessa doença comparada à RMSF, ainda não está claro se este vetor contribui clinicamente para a infecção humana.<sup>(66)</sup>

## 2.2 CICLO SFGR-VETOR PARASITIFORME

Apesar da grande diversidade de carrapatos capazes de carrear agentes causadores de FMA, é importante ressaltar que a presença parasitária em invertebrados altera fisiologicamente os mecanismos de homeostase interna e da ectoparasitose hematofágica. Como exemplo, em um trabalho recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, foi evidenciada a modulação da expressão gênica de diversas proteínas relacionadas com a imunidade, o metabolismo, a digestão e o processamento alimentar do triatomíneo *Rhodnius neglectus* infectado pelo protozoário causador da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*.<sup>(84)</sup>

A presença do tripanosomatídeo também fez com que a expressão transcricional de moléculas inibidoras da coagulação, da atividade plaquetária e da resposta imune fosse elevada até 2 dias após a hematofagia, assim como a transcrição de vias metabólicas específicas. Por outro lado, também houve redução da transcrição de diversas

outras no intuito de tornar o intestino menos oxidado, com menor atividade proteolítica e menor atividade contra o protozoário – ao mesmo tempo em que houve aumento de fatores desfavoráveis a bactérias simbiotas.<sup>(84)</sup>

Claramente, o provável intuito do parasito com esse cenário foi justamente sustentar a sua sobrevivência e, com isto, reduzir a nutrição e processos regenerativos necessários ao vetor, enquanto mais nutrientes estavam disponíveis, portanto, para si.<sup>(84)</sup> Acredita-se que, em carrapatos infectados com SFGR, tal cenário não ocorra de forma distinta e ainda pareça se aprofundar diante dos longos períodos de repasto sanguíneo – tempo mais do que suficiente para que as linhagens bacterianas momentaneamente avirulentas possam ser reativadas,<sup>(5)</sup> consigam se desenvolver e estabelecer no artrópode e no vertebrado.

Neste vetor biológico, as bactérias ingeridas são capazes de invadir, multiplicarem-se nas células das glândulas salivares, do intestino, nos hemócitos e nos tecidos ovarianos, e passar para a prole, cujo processo é chamado de transmissão ovariana ou vertical. Ainda podem permanecer infectando o vetor por toda vida, em decorrência da transmissão transtadial e, em certas espécies, já se comprovou a possibilidade de um sexo infectar o outro durante a cópula, por meio da transmissão venérea.<sup>(5, 10, 85)</sup>

Durante todos esses processos, as SFGRs são capazes de modular a epigenômica das células hospedeiras. Podem inibir a resposta imune inata antibacteriana do invertebrado e modular positivamente a inibição da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Podem elicitar menor atividade oxidativa – ao elevar a expressão de antioxidantes, como de selenoproteínas e de superóxido dismutases (SODs) –, inibir a apoptose celular e favorecer o crescimento de outras espécies bacterianas (ex: *Mitichloria* e *R. bellii*) capazes de lhes fornecer e processar nutrientes importantes (ex: vitaminas B e D), ao mesmo tempo em que dificultam o crescimento de outros patógenos competitivos, transmitidos pelo carrapato (ex: *Anaplasma marginale*).<sup>(5)</sup>

Caso a carga parasitária recebida não seja letal – muito relevante ao tratarmos da *R. rickettsii* –, os artrópodes hematófagos são capazes de ativar mecanismos de respostas alternativos em relação aos cenários alcançados pelos parasitos e, como resultado, a homeostase final permite a simbiose adequada entre patógeno e vetor. Em algumas situações, como em certas espécies do complexo *A. cajennense* s. l., após sucessivas gerações, o equilíbrio tende a ser perdido em favor do carrapato, o qual passa a apresentar poucos parasitos.<sup>(1)</sup>

### 2.3 CICLO SFGR-HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Diversos animais, como o coelho silvestre, os marsupiais (ex: gambá) e a capivara também são capazes de manter a simbiose com o agente infeccioso e tendem a serem assintomáticos durante a bacteremia. Muitos autores consideram-nos os principais

reservatórios da FMA.<sup>(10, 20, 86, 87)</sup>

As capivaras apresentam características peculiares que as tornam um importante amplificador de FMB. Além de serem territorialistas e se acostumarem à presença do homem rural e urbano, a fêmea é altamente prolífera e a densidade populacional elevada favorecem o aparecimento de capivaras infectadas que, diante de exposições subsequentes ao carrapato, podem se tornar imunes à *R. rickettsii*.<sup>(88)</sup> No entanto, tal imunidade não é repassada à prole e a infestação vetorial é frequente, constante e populosa. Isso faz com que a atual existência de < 10% da população de *A. sculptum* apresentando-se infectada com SFGRs mantenha-se sobrevivendo no reservatório. Também é importante informar que um antigo hábitat desse vertebrado ainda conterà as formas vetoriais por até 3,5 anos após a sua partida.<sup>(89)</sup>

Em outros animais, como no cavalo, na ovelha, na cobaia e no camundongo, podem ocorrer sinais e sintomas leves e temporários, e a cura da doença também é possível de ser alcançada. Porém, na febre maculosa, o balanço da relação entre o agente infeccioso e o cão<sup>(90)</sup> ou o homem pode não ser alcançado, e o cenário torna-se dramático para o hospedeiro. Em todo caso, é importante ressaltar que qualquer vertebrado com bacteremia riquetsiana pode repassar riquetsias ao vetor.<sup>(10, 20, 87)</sup>

No local do repasto, a *R. parkeri*, a *R. philipii* e a *R. africae* podem agravar a inflamação e causar necrose profunda na pele.<sup>(66, 91)</sup> Após a SFGR ser transmitida à pessoa, seja por meio da picada, seja pelo contato do sangue do hospedeiro com os fluidos corporais ou com as fezes do carrapato infectado,<sup>(14)</sup> parte da população bacteriana que entra na circulação evade os mecanismos de defesa imunológica do homem. As riquetsias escapam da lise intracelular de fagócitos – residentes ou que iriam realizar a apresentação antigênica às células T nos linfonodos – e invadem as células endoteliais da microcirculação local.<sup>(91)</sup>

As células infectadas, com destaque para aquelas situadas na pele, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, coração, rins e cérebro – sinalizam com a produção de citocinas (ex.: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas, além de se aderirem à matriz extracelular adjacente, a fim de atrair mais e mais células inflamatórias para o sítio de combate. Dentro desse contexto, ocorre a febre alta ( $\geq 40$  °C) com calafrios, dores de cabeça, mialgia, artralgia, apatia, episódios de náuseas, vômitos e estupor (obtundo) – a partir do 2º ao 14º dia após a infecção –, além de linfadenopatia drenante quando o agente causador é a *R. parkeri* ou a *R. africae*.<sup>(8, 20, 91)</sup>

Com o passar do tempo, o acúmulo de infiltrado inflamatório formado por linfócitos e macrófagos pode gerar lesões e obliterações parciais nos vasos sanguíneos. Em decorrência do edema intersticial provocado, do 3º ao 5º dia após o aparecimento da febre alta, uma porcentagem menor dos acometidos por febre maculosa ainda apresenta erupções cutâneas máculo-papulares que evoluem para lesões petequiais, ora vesiculares, ora como pústulas, em regiões de microcirculação intensamente

infectadas.<sup>(10, 17, 20, 91)</sup> A ausência dos exantemas não necessariamente caracteriza a recuperação do paciente; pode dificultar e retardar o diagnóstico correto e, conseqüentemente, o tratamento.<sup>(2, 5, 10, 17, 92)</sup>

Esses sinais e sintomas também estão presentes em outras riquetsioses e são similares àqueles existentes em outras doenças, como na leptospirose, toxoplasmose, rubéola, sarampo, sífilis, meningite meningocócica e em certas arboviroses (ex.: dengue, zika e chikungunya). Também são passíveis de serem confundidos com reações alérgicas e a medicamentos, além de novas pesquisas indicarem sobre a possibilidade de haver sintomatologia semelhante em animais infectados com agentes infecciosos ainda a serem descobertos nos carrapatos. Mas nem todos os quadros clínicos que o homem apresenta aparecem nos animais quando são infectados com SFGRs.<sup>(2, 10, 91)</sup>

Em virtude da baixa incidência de FMA humana em relação a outras tantas infecções, podemos dizer que a manutenção vacinal a indivíduos em áreas endêmicas seria mais viável financeiramente comparada ao controle vacinal de animais, não retirando a importância de ambos os cenários para o combate ideal à febre maculosa. Como será visto, algumas moléculas envolvidas com a patogenicidade das riquetsias já foram exploradas em ensaios vacinais com animais; mas outros peptídeos, potencialmente imunogênicos, também podem existir e talvez façam parte de fatores de virulência que ainda precisam ser avaliados quanto à atividade nas SFGRs.<sup>(93)</sup>

## 2.4 ESTRATÉGIAS POTENCIAIS DE VACINAÇÃO CONTRA SFGR

Uma vacina eficaz contra febre maculosa precisa fazer com que as riquetsias sejam eliminadas do hospedeiro por mecanismos envolvidos com a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas, certamente do tipo  $T_H1$  e  $T_H17$ . Sendo respostas efetivas, ocorrerão a redução da gravidade e da duração dos sintomas, assim como a perda da capacidade do hospedeiro em transmiti-las, cuja diminuição na incidência global de casos deve ser esperada. Por meio do estímulo antigênico, o organismo consegue rapidamente promover a inflamação, ao aumentar a expressão de moléculas de adesão das células imunológicas e endoteliais.<sup>(4, 94)</sup>

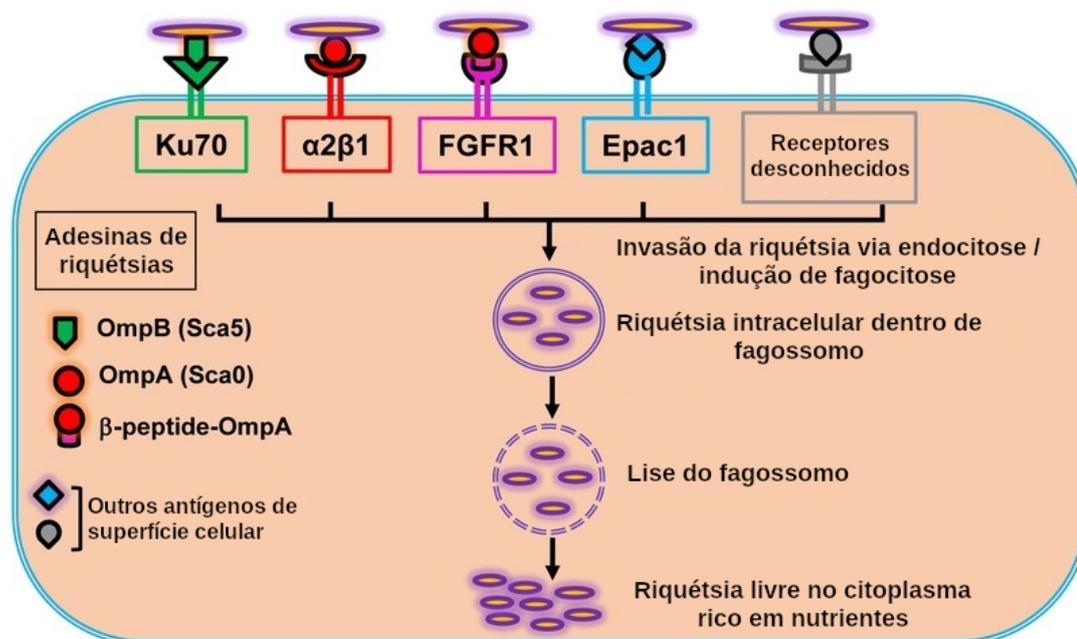
Essas respostas também elevam a atividade fagocítica dos fagócitos e intensificam a ativação e a resposta citotóxica de linfócitos T  $CD8^+$  sobre as células do hospedeiro parasitadas. A ausência de linfócitos T  $CD8^+$  funcionais ou das citocinas pró-inflamatórias  $IFN-\gamma$  e  $TNF-\alpha$  pode ser fatal para o indivíduo infectado por SFGR, conforme evidenciado em modelos murinos. Ademais, por meio dessas citocinas e da IL-17 liberadas pelos linfócitos T  $CD4^+$ , células infectadas, como as epiteliais, são sinalizadas para a produção de peptídeos antimicrobianos e óxido nítrico, assim como acontece com os macrófagos.<sup>(4, 94)</sup>

### 2.4.1 Neutralização da bactéria no hospedeiro vertebrado

Já é de conhecimento o papel de algumas moléculas envolvidas na infecção e na sobrevivência das riquetsias causadoras de febre maculosa nos animais. O escape do fagossomo pode ocorrer pela liberação de fosfolipases A2 (PLA<sub>2</sub> – Pat1 e Pat2) e D (Pld) e hemolisinas (ex: tlyA e tlyC) que lisam a parede vacuolar.<sup>(91)</sup> Em *R. parkeri*, foi observado que a fosfolipase A2 semelhante a patatina (Pat1) também é capaz de evitar a poliubiquitinação da bactéria no citoplasma e o recrutamento do receptor de autofagia p62.<sup>(95)</sup> Conforme visto para a *R. rickettsii*, a proteína com repetição de ankirina RARP2 é capaz de atuar na redução da exposição de antígenos bacterianos via MHC. O bloqueio da função de alguns desses componentes por anticorpos, a depender da espécie, mostrou comprometimento ou dificuldade na evasão do vacúolo.<sup>(93)</sup>

A endocitose também pode ser provocada pelo agente infeccioso (Figura 4), ao promover a ligação entre uma molécula de superfície, como a rOmpB, e um receptor, como o Ku70 da célula hospedeira, seguida pela internalização em vesícula envolvida por clatrina/caveolina (mecanismo "zippering").<sup>(5, 96)(96)</sup> Além disso, metiltransferases PKMT1 e PKMT2 da *R. parkeri* podem modificar ligantes de superfície como rOmpB e prevení-los de poliubiquitinação, enquanto o próprio rOmpB bloqueia a ubiquitinação de rOmpA que é capaz de interagir com FGFR1 e  $\alpha 2\beta 1$  para auxiliar na invasão celular.<sup>(93)</sup>

Figura 4 – Modelo de invasão das riquetsias na célula hospedeira



Fonte: De Sahni *et al.*, 2019.<sup>(91)</sup>

Nas células hospedeiras, os mecanismos apoptóticos podem ser inibidos para permitir a sobrevivência e a multiplicação da bactéria. Já a invasão de células adjacen-

tes, ocorre por meio das projeções e impulsionamento das riquetsias pelas pontes de actina ativadas por RickA (*R. rickettsii*) ou por manejo das tensões intercelulares e mecano-transdução (*R. parkeri* e outras SFGRs).<sup>(5)</sup>

Existem anticorpos capazes de se ligarem em alguns desses ligantes de superfície (ex: Sca0/rOmpA, Sca1, Sca2, Sca3 e Sca5/rOmpB – *Surface cell antigens* ou *Outer membrane proteins*), a fim de inibir a entrada do patógeno na célula hospedeira. Outros anticorpos opsonizam o microrganismo por meio desses ligantes, para o reconhecimento e a atuação das células citotóxicas e do sistema complemento.<sup>(4, 94)</sup>

A ação dos anticorpos contra OmpA e OmpB são tão importantes que, mesmo diante de alta carga de *R. rickettsii* e de *R. conorii*, é possível evidenciar certa proteção à doença em camundongos C3H/HeN SCID e, no caso de infecção por *R. rickettsii*, ausência de febre ou de bacteremia em cobaias. Determinadas proteínas citoplasmáticas – por. ex., da classe das chaperonas – também possuem isoformas extracelulares reconhecidas pelos anticorpos, mas o papel e a efetividade de muitas delas em respostas antibacterianas ainda precisam ser avaliados.<sup>(4, 94)</sup>

Certos antígenos compartilhados entre diferentes espécies de riquetsias e que ativam linfócitos T são considerados imunodominantes (ex: OmpA e OmpB) e contribuem tanto para o homem como para os animais adquirirem proteção cruzada parcial a uma determinada riquetsiose, quando estes são expostos a outra infecção riquetsiana. Haja visto, na linhagem C3H/HeJ, a imunização contra *R. akari* ou a exposição prévia a antígenos de *R. rickettsii* pode diferenciar linfócitos e reativá-los na presença de *R. conorii*. Da mesma forma, a imunização contra *R. conorii* protege murinos C3H/HeN da infecção por determinadas SFGRs, riquetsias de transição e do tifo.<sup>(4, 94)</sup>

#### 2.4.2 Imunoindução pelos antígenos da célula inteira de SFGR

Apesar da inexistência de vacinas humanas prontamente desenvolvidas contra a FMA, os primeiros ensaios vacinais *in vivo* usaram extratos de agentes bacterianos inativados com fenol ou formol. Essas células podem ser obtidas não só de vetores, mas também de vertebrados, ou a partir de bactérias que se desenvolveram em ovos ou, mais especificamente, em fibroblastos de embriões de galinha.<sup>(4, 94)</sup>

A par destas técnicas, curiosamente, uma vacina produzida por Weigl em 1920 foi utilizada durante a II Guerra Mundial, em soldados alemães e em guetos, contra a *R. prowazekii*, cujo gênero bacteriano havia sido descoberto pouco tempo antes, em 1916, pelo pesquisador brasileiro Henrique da Rocha Lima.<sup>(97, 98)</sup> No mesmo sentido de evitar o tifo epidêmico que acometia os soldados naquela época, os rivais militares americanos e chineses também produziram vacinas que foram capazes de amenizar a gravidade da doença.<sup>(99)</sup>

No entanto, a inativação química pode reduzir a antigenicidade da vacina. Para que isto não ocorra, é usual a substituição pela irradiação ou aquecimento (ex: 56 °C)

do extrato celular. Recentemente, cachorros vacinados com esta abordagem apresentaram sintomas de RMSF mais leves, produção de IgG e IFN- $\gamma$  e redução das lesões em vários órgãos analisados.<sup>(100)</sup>

O uso de linhagens bacterianas avirulentas ou atenuadas podem fornecer proteção por longos períodos em humanos e a introdução de mutações deletérias ou deleções de bases em genes de virulência (ex: no gene da Fosfolipase D) contribuem para aumentar a segurança vacinal ao evitar a reversão do fenótipo virulento, conforme observado em cobaias. No entanto, dependendo da técnica molecular empregada e do gene alvo a ser suprimido, tanto a *R. rickettsii* como outros agentes podem não perder a infectividade.<sup>(101)</sup>

### 2.4.3 Imunoindução por subunidades peptídicas da SFGR

Diversos antígenos recombinantes da membrana e do citoplasma de SFGRs (ex: Adr1, Adr2, TolC, OmpW, Porina 4, YbgF e dentre outros) já foram testados em alguns modelos animais, mas poucos deles promoveram a proteção do animal a doses letais do agente – também aparentemente em decorrência das técnicas de expressão proteica e de aplicação empregadas. Apesar de muitas dessas moléculas serem altamente promissoras por ainda sim desencadearem respostas imunológicas relevantes, a combinação correta de antígenos parece propiciar o quadro protetivo ideal em detrimento da aplicação aleatória de um único antígeno.<sup>(4, 94)</sup>

Outro exemplo da vantagem do uso de sequências proteicas diferentes está na vacinação do hospedeiro com células dendríticas previamente pulsadas com proteínas recombinantes fornecedoras de epítomos de ligação a MHC II, cujas células podem estimular as respostas de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Contra *R. heilongjiangensis* em camundongos C3H/HeN, essas respostas decorrentes da introdução de fragmentos de OmpB em células dendríticas ainda puderam ser alcançadas sem a produção de anticorpos.<sup>(102)</sup>

Vetores bacterianos não patogênicos também compõem outra alternativa, pois podem carrear plasmídeos com as sequências codificadoras de antígenos de outros microorganismos. Isso já foi testado contra *R. conorii* em camundongos C3H/HeN, ao introduzir-lhes a *Mycobacterium vaccae* com segmentos de OmpA, o que gerou proteção parcial diante de carga parasitária considerada letal a esses animais.<sup>(94)</sup>

É de se considerar a busca por antígenos conservados entre espécies diferentes de riquetsias. Uma vez que um deles gere imunoproteção contra a bactéria que o originou, espera-se que o mesmo ocorra contra a segunda bactéria após imunizar o indivíduo com o antígeno que esta produz. Por outro lado, existem fragmentos proteicos de diferentes SFGRs mas com alta similaridade entre si, que podem fornecer maior proteção ao hospedeiro contra uma espécie, mas não propiciar proteção contra a outra espécie bacteriana.<sup>(103)</sup>

Além disso, é provável que certos antígenos e seus fragmentos recombinantes proporcionem níveis de proteção diferentes em outros modelos animais ou mesmo nos seres humanos. Muitos antígenos e epítomos de SFGRs ligantes de MHC I, que possam estimular as células T CD8<sup>+</sup>, ainda são desconhecidos e a abordagem por vacinologia reversa pode auxiliar a desvendar demais alvos.<sup>(4, 94)</sup> Apesar dos achados promissores contra febre maculosa, estes ainda não progrediram o suficiente para que ensaios com humanos fossem realizados.

#### 2.4.4 Vacinologia reversa aplicada às SFGRs

Ao contrário da abordagem clássica, a vacinologia reversa (Figura 5) está fundamentada exclusivamente em predições *in silico*, a partir de cálculos matemáticos com variáveis que levam em consideração o comportamento de dados reais obtidos de experimentos em bancada. Por meio de algoritmos e aplicativos computacionais, é possível estimar se uma determinada sequência proteica pode ser antigênica e exibe epítomos de ligação a moléculas de MHC e a receptores de linfócitos B.<sup>(104, 105)</sup>

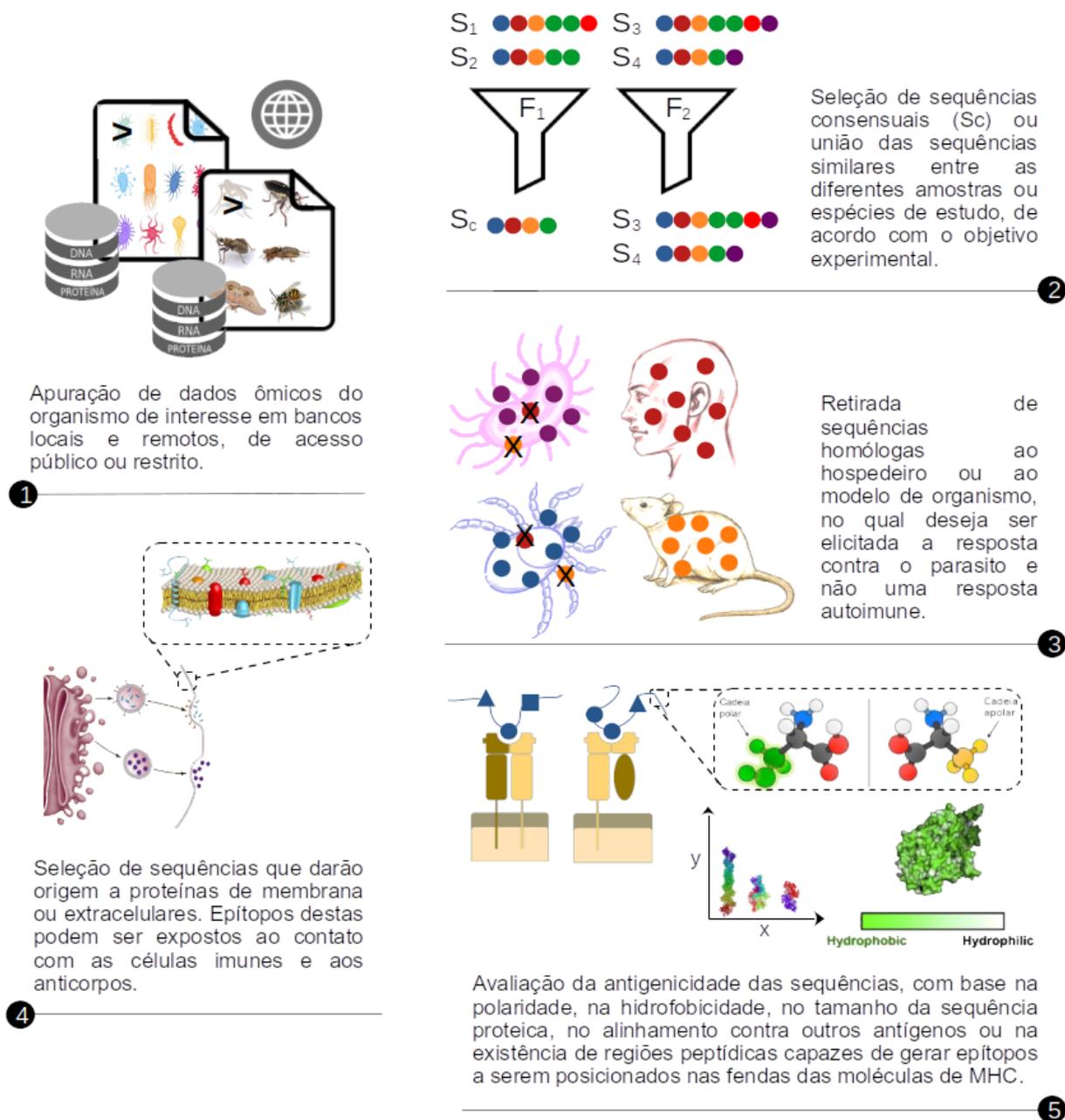
Com o passar dos anos, o enriquecimento informacional dos bancos de dados, os novos aplicativos – atualizados e incorporados à temática – e as abordagens complementares permitiram prever e descrever outras características moleculares de candidatos vacinais. A destacar, a homologia com outras sequências e a identificação de alvos similares para a atuação de drogas ou fármacos, a localização celular do alvo proteico e sua estrutura tridimensional, a simulação de respostas para a produção de citocinas específicas, a toxicidade e a alergenicidade desses antígenos e, principalmente, a leitura de regiões nucleotídicas em larga escala para a predição de novas sequências proteicas, independente do organismo a ser analisado.<sup>(106, 107)</sup>

Dessa forma, por meio da análise subtrativa dos dados ômicos, é possível encontrar antígenos comuns expressos entre as diferentes linhagens de uma mesma espécie riquetsiana. Por ventura, parte desses também podem ser consensuais entre as diferentes espécies de riquetsias. A exemplificar, em um trabalho recente publicado por integrantes de nosso grupo de pesquisa, partindo de 47 genomas bacterianos, foi apontada a existência de 7 antígenos conservados entre 21 espécies representativas dos subgrupos filogenéticos do gênero *Rickettsia*.<sup>(108)</sup>

Essa quantidade de antígenos é condizente ao encontrado por Kumar (2017), o qual fez uso de algumas ferramentas computacionais alternativas para levantar os consensuais. Foram encontrados 10 antígenos comuns entre apenas 6 espécies representativas comparadas (*R. typhi*, *R. prowazekii*, *R. felis*, *R. conorii*, *R. australis* e *R. rickettsii*).<sup>(109)</sup> Partindo de um proteoma de *A. marginale* com 949 proteínas, Palmer *et al.* (2011) encontraram 62 proteínas de superfície celular, das quais 10 foram capazes de estimular a produção de IgG2 e proteger bezerros contra a bacteremia por *A.*

*marginale*. Destas, apenas 2 foram consideradas homólogas àquelas de *R. typhi*, *R. prowazekii*, *R. felis*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. rickettsii* e *R. africae*.<sup>(110)</sup>

Figura 5 – Etapas usuais da vacinologia reversa



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A ordem assumida para as etapas não é estrita. Partes dessa figura foram elaboradas e adaptadas de: Freepik,<sup>(111)</sup> Cafarilla, 2013,<sup>(112)</sup> Dreamstime,<sup>(113)</sup> Zagrobelna, 2018,<sup>(114)</sup> Shaik, 2014,<sup>(115)</sup> Otosection,<sup>(116)</sup> Wikipedia,<sup>(117, 118, 119)</sup> Bioninja,<sup>(120)</sup> Heldt *et al.*, 2017.<sup>(121)</sup>

Peptídeos antigênicos conservados são úteis ao desenvolver uma vacina universal contra riquetsioses. Porém, a diversidade de antígenos aumenta quanto menor for o número de espécies comparadas. Partindo do reconhecimento de epítopos em

834 sequências proteicas de *R. prowazekii*, Caro-Gomez *et al.* (2014) encontraram 96 proteínas antigênicas e homólogas àquelas de *R. typhi*, *R. conorii* e *R. rickettsii*, sendo 63 possíveis estimuladoras de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e, dentre estas, 21 passíveis de serem reconhecidas também por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Destas, 12 foram selecionadas para ensaios *in vivo*, mas apenas 1 – a única proteína não exclusiva ao meio intracelular – mostrou-se relevante para proteger e levar à maior sobrevivência de camundongos C3H/HeN diante da *R. prowazekii*.<sup>(122)</sup>

Haja visto a rentabilidade final reduzida após a análise subtrativa dos dados iniciais, também é importante considerar, conforme já discutido, os demais antígenos expressos pelo agente de interesse ao desenvolver uma vacina que desencadeie e/ou complemente a imunoproteção do hospedeiro. Ademais, quanto maior a diversidade de candidatos vacinais *in silico*, maior a chance de encontrar novos antígenos capazes de tornar a proteção mais eficaz. A exemplificar, a partir de apenas 1 genoma de *R. rickettsii*, Dzul-Rosado *et al.* (2020) obtiveram 19 proteínas de localidades celulares diversas, com epítomos de ligação para MHC I humano. Dentre elas, foi possível destacar 6 proteínas hipotéticas ou ainda desconhecidas.<sup>(123)</sup>

Sendo assim, a efetividade ideal de uma vacina contra a FMA deverá ser alcançada se também levarmos em consideração as diversas proteínas dos carrapatos que auxiliam na infectividade das riquetsias. Inibir a atuação dessas proteínas pode comprometer o processo infeccioso no artrópode e no vertebrado. Porém, não há trabalhos publicados que pudessem relacionar ou complementar o desenvolvimento de vacinas, para que atuem tanto contra o agente infeccioso quanto contra o vetor, apesar disto já ser possível como será visto a seguir.

#### 2.4.5 Ataque ao carrapato e à sua densidade populacional

A ideia sobre produzir vacinas para combater artrópodes hematófagos, como os vetores parasitiformes, não é recente. A percepção científica de que o gado pode ganhar certa resistência a infestação de carrapatos decorre desde 1918.<sup>(124)</sup> Em 1939, Trager já havia percebido que cobaias podem se tornar resistentes a infestações subsequentes por larvas de *D. variabilis*.<sup>(125)</sup> Posteriormente, Alger & Cabrera (1972) e Schlein & Lewis (1976) observaram que coelhos imunizados com extratos teciduais de mosca ou mosquito também podem gerar resposta imune que compromete o desenvolvimento destes artrópodes, a ponto de levá-los a morte.<sup>(126, 127)</sup>

Assim, Allen & Humphreys (1979) verificaram que cobaias e bovinos vacinados com o extrato tecidual de intestino de *D. andersoni* também foram capazes de reduzir tanto o número de ectoparasitas como de ovos liberados pelas fêmeas.<sup>(128)</sup> Esses efeitos foram mais evidentes ao considerar a imunoproteção desencadeada contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (australis)*, por meio da imunização com extrato de tecido intestinal do artrópode. Foram observadas lesões no intestino do vetor, os adul-

tos foram mais afetados do que as larvas e as fêmeas sobreviventes, quando ingurgitadas, eram menores do que o tamanho médio que naturalmente podem alcançar.<sup>(129)</sup>

Em vista disso, em 1980, pesquisadores da Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Commonwealth da Austrália encontraram o antígeno Bm86 no intestino de carrapato como sendo capaz de desencadear os efeitos descritos anteriormente. A partir disto, em 1994, foi desenvolvida a primeira vacina direcionada à proteção de bovinos contra *R. microplus*.<sup>(130)</sup>

Antígenos ocultos, como o Bm86, estão presentes principalmente no intestino médio dos carrapatos e são alvos de investigação, porque ficam mais protegidos do microambiente estressor externo e dificilmente geram resposta imunotolerante aos constituintes imunológicos do vertebrado. Isto evita a ocorrência de alterações genéticas, epigenéticas ou pós-traducionais que possam levar à imunoevasão.<sup>(131)</sup>

A imunoproteção, nesse caso, pode ocorrer por meio da atuação dos anticorpos e do sistema complemento que atacam moléculas, principalmente de membrana e de funções essenciais como certos receptores de hormônios, e podem causar a ruptura do trato intestinal, com o extravasamento da hemolinfa à luz tubular.<sup>(132)</sup> Por outro lado, como os antígenos ocultos não estão expostos suficientemente ao reconhecimento das células imunológicas, o contato natural e frequente entre vetor e hospedeiro vertebrado não é capaz de manter a resposta adaptativa por longos períodos. Como visto em bovinos, os efeitos imunoprotetores são eficazes enquanto houver a aplicação de doses subsequentes do Bm86.<sup>(130)</sup>

A glicosilação pode ser importante para elevar a imogenicidade antigênica, como ocorre com o Bm86 disponibilizado na vacina comercial GAVAC®.<sup>(130)</sup> Na década de 90, outras proteínas intestinais e passíveis de serem encontradas nas glândulas salivares, como o antígeno oculto Bm91,<sup>(133, 134)</sup> a glicoproteína similar à mucina BMA7,<sup>(135)</sup> Vitelina e Vitelogenina<sup>(136)</sup> também foram testadas na Austrália e levaram à redução moderada do número de ovos e larvas em bovinos e ovelhas.

Contra outras espécies vetoriais, coelhos imunizados contra inibidores de serino-proteases (HLS1 e HLS2) podem levar ninfas e adultos à morte após o repasto,<sup>(137)</sup> enquanto camundongos estimulados com a proteína semelhante à troponina I p27/30 pode reduzir a quantidade de larvas fixadas sobre a epiderme desses animais e prejudicar a alimentação sanguínea das ninfas e dos adultos de *Haemaphysalis longicornis*, cujo tempo de repasto torna-se prolongado.<sup>(138)</sup> Outro antígeno oculto, o 4D8 citoplasmático, também pode prolongar o tempo de repasto, assim como reduzir a infestação e o tamanho de ovos de *Ixodes scapularis*.<sup>(139)</sup>

Entretanto, a eficácia relativa de candidatos vacinais também pode variar consideravelmente de uma espécie de hospedeiro a outra e ser insignificante. Mesmo aplicada em uma mesma espécie de vertebrado, a eficácia de vacinas com ou sem Bm86 glicosilado pode ser reduzida drasticamente em virtude de haver linhagens distintas de *R.*

*microplus* existentes em outros países, incluindo no Brasil. A exemplificar, a eficácia relativa da GAVAC® pode ser < 60%.<sup>(130)</sup>

A necessidade de descobrir mais alvos antigênicos fez com que Lew-Tabor e outros pesquisadores buscassem identificar epítomos reconhecíveis por anticorpos de bovinos resistentes a infestações de *R. microplus*.<sup>(140)</sup> A partir dos anticorpos que prejudicaram o desenvolvimento do vetor, foi possível isolar misturas de epítomos para a vacinação de bovinos, cuja imunoproteção eficaz permitiu isolar das misturas selecionadas 9 candidatos atualmente patenteados.<sup>(130)</sup>

Os resultados promissores de diversos candidatos vacinais principalmente contra espécies dos gêneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma* fizeram com que vários deles fossem patenteados.<sup>(141)</sup> Alguns homólogos, como Bm86, Subolesina, Aquaporina, Ferritina 2 e Peptídeo Ácido Ribossomal 60S P0 são testados pelo Consórcio de Vacinas Contra Carrapato de Gado financiado pela Fundação Bill & Melinda Gates, em Marrocos, na tentativa de ser desenvolvida uma vacina universal contra o *R. microplus*.<sup>(130)</sup>

#### 2.4.6 A saliva na transmissão de SFGR a hospedeiros

As glândulas salivares são uns dos maiores órgãos dos carrapatos – sendo maiores nas fêmeas – e possuem antígenos que podem ser reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro já em curtos períodos de repasto sanguíneo. A saliva é constituída por íons, moléculas proteicas e não proteicas e se altera com o passar da alimentação, de acordo com o sexo do indivíduo, conforme a quantidade de outros indivíduos adjacentes repastando e diante da contra resposta imune do vertebrado.<sup>(142)</sup>

Fazendo parte deste conteúdo, existem diversos fatores (ex: sialostatinas, proteínas Salps, inibidores de TSLP) que contribuem para a transmissão do patógeno assistida pela saliva (SAT), seja a transmissão entre vetor infectado e vertebrado não infectado, seja entre vertebrado infectado e artrópode não infectado. O fenômeno da SAT pode ser desencadeado por outros artrópodes hematófagos e é capaz de favorecer a infectividade de protozoários, de agentes virais ou bacterianos.<sup>(142)</sup>

Em macacos Rhesus infectados artificialmente com *R. parkeri*, apesar de já ter sido observado elevação da população de neutrófilos e dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-6 sorológicos, as escaras no sítio de inoculação também podem aumentar e cicatrizar de forma mais lenta durante a exposição ao *A. maculatum*. Ainda nesses animais, foi observado maior persistência bacteriana no sítio e nos linfonodos quando comparados a primatas não ectoparasitados.<sup>(143)</sup> Já em camundongos C3H/HeJ infectados com *R. conorii*, a expressão dos fatores do vertebrado associados a resposta imune desfavorável ao parasitismo no tecido infectado foi reduzida naqueles animais expostos às ninfas de *R. sanguineus* – destacando menor estímulo à produção de IL-1 $\beta$  e NF- $\kappa$ B.<sup>(144)</sup>

Ademais, já foi constatado que a transmissibilidade dessa SFGR entre formas adultas infectadas e ninfas não infectadas de *R. sanguineus* pode ser elevada a aproxima-

damente > 70% ao repastarem em cachorro soronegativo para tal bactéria.<sup>(145)</sup> Isto indica que a resposta imune desencadeada em animais previamente infectados pode dificultar a manutenção do ciclo de transmissão bacteriana entre hospedeiros. Mas a saliva parece ter papel fundamental na resistência do agente a essa resposta, possivelmente por conter biomoléculas capazes de inibir a migração, a atividade ou mesmo o desenvolvimento de APCs e a formação da resposta adaptativa do vertebrado.<sup>(146)</sup>

Durante o repasto, muitos antígenos salivares são secretados dentre os múltiplos agentes analgésicos, anti-hemostáticos, anti-cicatrizantes, anti-inflamatórios e capazes de inibir a resposta imune  $T_H1$  – importante contra a alimentação/nutrição adequada do ectoparasito sobre o vertebrado e a transmissão de endoparasitos bacterianos. Por outro lado, outros antígenos também estão entre aquelas moléculas capazes de desencadear a expressão de constituintes celulares e citocinas de perfil  $T_H2$ , que auxiliam por outros mecanismos o fluxo sanguíneo adequado ao vetor ou que podem causar neuroparalisia muscular local/regional.<sup>(37, 132, 142)</sup>

A efetividade de certos antígenos de neurotoxinas pôde ser verificada quando Ozer & Ricardo usaram soro de cães dessensibilizados à paralisia provocada pelo *Ixodes holocyclus*, para tratar outros cães que passavam por esta condição clínica.<sup>(147)</sup> Mas foi apenas com a chegada do sequenciamento de nova geração que aproximadamente 19 holociclotoxinas foram identificadas e seus aminoácidos caracterizados. A aplicação da mistura de algumas delas gerou proteção à paralisia em cães e está para ser lançada comercialmente na Austrália.<sup>(148)</sup>

Diferente dos antígenos ocultos, os antígenos salivares expostos de uma espécie usualmente podem promover imunoproteção a pelo menos dois estágios de vida do carrapato (ex: antígenos HL34 e 64TRP contra adultos e ninfas de, respectivamente, *H. longicornis* e *R. appendiculatus*). Além disso, possuem maior potencial de proteção cruzada contra outras espécies, já que tendem a possuir estruturas proteicas mais conservadas e assim, não é comum levar à resistência de resposta.<sup>(132)</sup>

Não obstante a resposta  $T_H2$  do vertebrado envolva mecanismos pouco efetivos contra carrapatos, os antígenos que direcionam a imunidade adaptativa para a formação de IgE são uma exceção. A alta concentração deste anticorpo auxilia consideravelmente na expulsão do ectoparasito, ao se ligar em receptores específicos e desencadear a degranulação de basófilos e mastócitos por meio de processo alérgico, como ocorre em bovinos e cobaias.<sup>(149)</sup> No entanto, em vista dos possíveis efeitos adversos, como o aparecimento de reações cutâneas indesejadas observadas em cobaias pós-imunizadas com proteína de ligação à histamina (HBP) e lesões cutâneas necróticas em coelhos imunizados com calreticulina recombinante de *A. americanum*, a escolha de candidatos vacinais da glândula salivar desses vetores deve ser criteriosa.<sup>(132)</sup>

Apesar da busca por antígenos que desencadeiem inibição das funções de proteínas importantes para o sucesso do ectoparasitismo, há evidência crescente de que

certos antígenos particulares a uma espécie vetorial – a exemplificar LJM11 e LJM19 analisados na saliva do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* – podem induzir resposta  $T_H1$  no hospedeiro, de forma suficiente para abrandar ou não desenvolver a infecção, como aquela decorrente da *Leishmania braziliensis*.<sup>(6, 150)</sup> Em hamsters, é comum tal resposta vir acompanhada de redução de IL-10. No entanto, também pode ser eficaz quando decorre da imunização com a saliva de *Lu. whitmani*, que leva ao aumento de IL-10 em camundongos BALB/c, ao passo que a saliva de *Lu. intermedia* não gera imunoproteção.<sup>(151)</sup>

Diante da exposição natural a um certo antígeno salivar do carrapato por si só não prevenir infestação subsequente e proteção prolongada ao hospedeiro, é necessário combinar antígenos para a produção de uma vacina eficaz. Além disso, o enfoque atual das pesquisas está em desvendar antígenos de dupla ação, que possam promover tanto proteção contra o vetor (e suas formas de vida) como o bloqueio da transmissão e da atividade de agentes infecciosos, o que não envolve apenas inibir a atividade imunomoduladora que certos compostos salivares apresentam, ao produzir resposta contra estes.<sup>(132, 142)</sup>

Considerando a avaliação de expressão por *microarray* e o sequenciamento em massa de transcritos, por volta de 2010, a vacinologia reversa começou a ser aplicada para a descoberta de alvos antigênicos em intestino, ovário e glândulas salivares de carrapatos e ensaios com RNAi foram feitos para investigar a morbidade ou a letalidade decorrente da inativação desses alvos nos vetores. O encontro de candidatos possuindo sequências altamente similares e a combinação tanto de antígenos expostos como ocultos também pôde levar à imunoproteção eficaz em bovinos.<sup>(152)</sup>

A aplicação de vacinas contra carrapatos também é importante para evitar com que novas mutações pontuais em proteínas levem à resistência vetorial a novos pesticidas, em decorrência do uso destes.<sup>(132)</sup> No entanto, como já visto, apesar de vários antígenos proteicos dos carrapatos terem sido testados em ensaios com modelos animais,<sup>(153)</sup> nenhum deles passou por análise *in silico* refinada e com aplicabilidade na proteção do homem à febre maculosa.

## 2.5 OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA PARA A VACINOLOGIA REVERSA APLICADA AOS VETORES PARASITIFORMES

As ferramentas de Bioinformática para predição antigênica são voltadas principalmente para análises que consideram a relação dos alvos com moléculas de MHC e anticorpos de humanos e camundongos. Nos últimos anos, alelos de outros animais foram incluídos em possíveis avaliações *in silico* e a disponibilidade de milhares de novas sequências proteicas de hospedeiros já depositadas nos bancos de dados permite executarmos avaliações mais precisas de detecção de antígenos de parasitos

passíveis de causar autoimunidade. Ademais, alvos similares a sequências de bactérias benéficas ao indivíduo sugerem certa cautela quanto à eventualidade do aparecimento de resposta cruzada que leve à disbiose indevida e ao comprometimento neuroimunológico, assim como os antibióticos podem provocar.<sup>(154, 155)</sup>

Muitos transcriptomas de artrópodes disponibilizados ao público científico como dados exploratórios divergem-se quanto ao conteúdo, à qualidade e à completude de sequências dos transcritos em decorrência de diversos fatores, a citar, o nível de degradação amostral e o método empregado para a extração de nucleotídeos que podem levar à perda de sequências.<sup>(156)</sup> Para se ter uma ideia, a quantidade de segmentos de transcritos previamente montados a partir dos transcriptomas de carrapatos de FMA varia entre 2 a 67 mil (Tabela 2).

Essa diferença pode refletir drasticamente no rendimento final de antígenos prospectados por vacinologia reversa. Além disso, ainda raramente é empregada a combinação de dados ômicos com diversos programas de montagem de transcriptomas – que adotem comprimentos de k-mers também distintos – para elevar o rendimento de sequências em um mesmo estudo, principalmente em se tratando de trabalhos com artrópodes.<sup>(84)</sup> Assim, esta pesquisa propôs adotar tal combinação, a fim de evidenciar o grande repertório antigênico que os vetores e os agentes causadores de FMA possuem, cujos peptídeos prospectados poderão ser usados na formação de novas vacinas mais efetivas, porém direcionadas ao uso humano.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 PRINCIPAL

Prospectar os candidatos proteicos antigênicos naturalmente expressos nas glândulas salivares e/ou no intestino dos principais vetores e nos agentes causadores de FMA, existentes na membrana ou liberados ao meio extracelular.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o rendimento dos alvos com a estratégia empregada;
- II. Indicar novas proteínas antigênicas potenciais para impactar negativamente a transmissibilidade dos agentes ou a hematofagia dos vetores de FMA;
- III. Indicar novas proteínas antigênicas potenciais para impactar negativamente a infecção ou a sobrevivência dos agentes de FMA;
- IV. Inferir a possibilidade dessas proteínas antigênicas em gerar resposta imune indevida contra bactérias que estão presentes no intestino humano e são benéficas ao homem.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A procura de candidatos vacinais se deu a partir da busca por dados disponíveis sobre transcriptomas e proteomas das espécies relacionadas na seção BioProject do sítio do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foram usadas ferramentas de Bioinformática desenvolvidas por outros autores e a combinação de *pipelines* de montagem de transcriptomas, adaptados e criados pelo nosso grupo de pesquisa em diferentes linguagens de programação (SHELL, Perl e Python), cujos detalhes envolvidos estão descritos a seguir.

### 4.1 SELEÇÃO DE DADOS ÔMICOS

Independente da completude dos dados, foram obtidas sequências proteicas preditas de todos os genomas dos agentes bacterianos e sequências nucleotídicas de todos os transcriptomas dos vetores de FMA até então disponíveis na base de dados do NCBI. Esse banco foi escolhido em decorrência de seu repertório de sequências ser maior e da redundância ou inexistência de genomas e transcriptomas de certas espécies em outras bases avaliadas, como no EBI (*European Bioinformatics Institute* – [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) e no VectorBase (*Bioinformatics Resources for Invertebrate Vector of Human Pathogens* – [vectorbase.org](http://vectorbase.org)).

#### 4.1.1 Proteomas bacterianos

Uma vez que as sequências proteicas dos genomas bacterianos já estavam disponíveis ao público no NCBI, foi possível obter os proteomas. As informações a respeito dos mesmos estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1 – Proteomas dos agentes clinicamente relevantes para FMA disponíveis publicamente no NCBI

Espécie	Disponibilidade por país de origem	Nível mínimo de montagem	Total de ORFs/Proteoma (Min-Máx)*	Total de ORFs/Proteoma NR (Mín-Máx)*
<i>R. rickettsii</i>	EUA (10) Colômbia (1) Brasil (1)	Cromossômica (1)	1343 (1308-1384)	1343 (1307-1384)
<i>R. parkeri</i>	EUA (4) Colômbia (1) Brasil (1)	Contig (3)	1479 (1310-1561)	1474 (1308-1561)
<i>R. philipii</i>	EUA (1)	Completo	1344	1343

<i>R. africanae</i>	Etiópia (1)	Completo	1041	1041
<i>R. amblyommatis</i>	EUA (2)	Contig (2)	1390 (1086-1949)	1377 (1086-1861)
	Panamá (1)			
	Brasil (1)			
	Argentina (1)			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*Representação dos valores mediano, mínimo e máximo, antes e após (NR) a retirada das sequências proteicas redundantes, representadas como ORFs (*Open Reading Frames*). Filtragem realizada com a ferramenta CD-HIT v4.7<sup>(157)</sup> (identidade > 99%).

#### 4.1.2 Transcriptomas de vetores

A Tabela 2 apresenta algumas estatísticas sobre os transcriptomas dos vetores de FMA. Foram obtidas todas as sequências nucleotídicas ESTs (*expressed sequence tags*) e proteicas a partir dos transcriptomas, previamente já depositadas (Tabelas 3, 4 e 5), além dos arquivos FASTQ para montagem e remontagem. Consideramos tal necessidade, para garantir a existência e enriquecer a diversidade de transcritos de RNAm, com a descoberta de novos transcritos salivares ou intestinais – também expressos em outros tecidos – e o melhoramento da qualidade do *assembly* anterior. Com isto, buscou-se elevar a completude de sequência dos transcritos.

Tabela 2 – Transcriptomas dos vetores clinicamente relevantes para FMA disponíveis publicamente no NCBI

Espécie	Disponibilidade por origem amostral	Tamanho médio das sequências	Total de seqs. nucl. por Transcriptoma (Mín-Max)*
<i>D. andersoni</i>	Glând. salivar (6)	524 nt (6)	210.691 sr (155.620-157.647)
	Intestino (26)	214 nt (26)	243.284 sr (188-3.251.411)
	Corpo inteiro (41)	76 nt (41)	2.928.587 pr (4.274-7.023.184)
<i>D. variabilis</i>	Intestino (1)	441 nt (1)	2.011 EST
	Corpo inteiro (66)	412 nt (2)	31.527 EST (22.854-40.200)
		75 nt (33)	32.568.890 sr (19.548.217-49.954.837)
		272 nt (6)	28.482 sr (5560-56.388)
		76 nt (24)	1.780.566 pr (1.513.053-6.972.796)
		101 nt (1)	258.114.923 pr
		Pernas (2)	100 nt (2)
	Órgão de Haller (32)	100 nt (32)	10.561.406 sr (8.992.308-14.098.195)
	Singânglio (2)	189 nt (2)	266.068 sr (62.730-469.406)
Sist. reprod. masc (1)	234 nt (1)	25.056 EST	

		418 nt (1)	222 EST
<i>R. sanguineus</i>	Glând. salivar (25)	125 nt (20)	11.977.956 sr (8.747.488-144.765.839)
		92 nt (4)	54.840.602 pr (48.835.654-58.728.234)
		1078 nt (1)	67.007 EST
	Corpo Inteiro (30)	251 nt (1)	15.566.986 sr
		76 nt (28)	1.972.657 pr (1.648.099-2.468.882)
<i>A. maculatum</i>	Glând. salivar (35)	748 nt (2)	38.568 EST (4.850-72.286)
		534 nt (1)	1.626.969 sr
		127 nt (32)	28.999.481 pr (12.884.746-59.530.329)
	Ovário (8)	124 nt (8)	30.362.420 pr (24.083.482-39.728.162)
<i>A. americanum</i>	Glând. salivar (9)	598 nt (1)	9131 EST
		584 nt (1)	3139 EST
		100 nt (4)	47.117.351 sr (25.095.072-53.124.914)
		100 nt (3)	86.616 pr (67.277-179.494)
	Intestino (3)	100 nt (3)	61.002 pr (40.713-81.897)
		100 nt (16)	795.577 pr (50.887-1.922.401)
	Corpo inteiro (76)	529 nt (2)	13.257 EST (11.557-14.958)
		101 nt (6)	35.489.796 sr (28.403.332-39.445.131)
		76 nt (52)	1.988.882 pr (1.357.386-6.205.553)
<i>A. parvum</i>	Glând. salivar (2)	828 nt (1)	2838 EST
		394 nt (1)	243.819 sr
<i>A. triste</i>	Glând. salivar (6)	913 nt (1)	8098 EST
		399 nt (5)	230.483 sr (187.972-296.996)
<i>A. variegatum</i>	Glând. salivar (1)	581 nt (1)	3992 EST
	Glând. sal./intest. (1)	508 nt (1)	745 EST
<i>A. aureolatum</i>	Glând. salivar (2)	101 nt (2)	55.161.139 sr (50.475.296-54.846.982)
	Glând. sal./intest. (1)	804 nt (1)	7999 EST
	Intestino (2)	101 nt (2)	66.172.872 pr (45.877.417-86.468.328)
<i>A. cajennense s. l.</i>	Glând. salivar (6)	446 nt (1)	1769 EST
		388 nt (4)	205.034 sr (180.857-241.190)
		795 nt (1)	5770 EST
<i>A. sculptum</i>	Glând. salivar (2)	101 nt (2)	66.266.675 sr (55.198.492-77.334.858)
	Glând. sal./intest. (1)	1346 nt (1)	4246 EST
	Intestino (6)	134 nt (6)	34.365.407 sr (3.617.442-86.829.754)
	Intest./Ovário (1)	664 nt (1)	15564 EST
	Ovário (2)	180 nt (2)	23.010.340 sr (22.726.084-23.294.597)

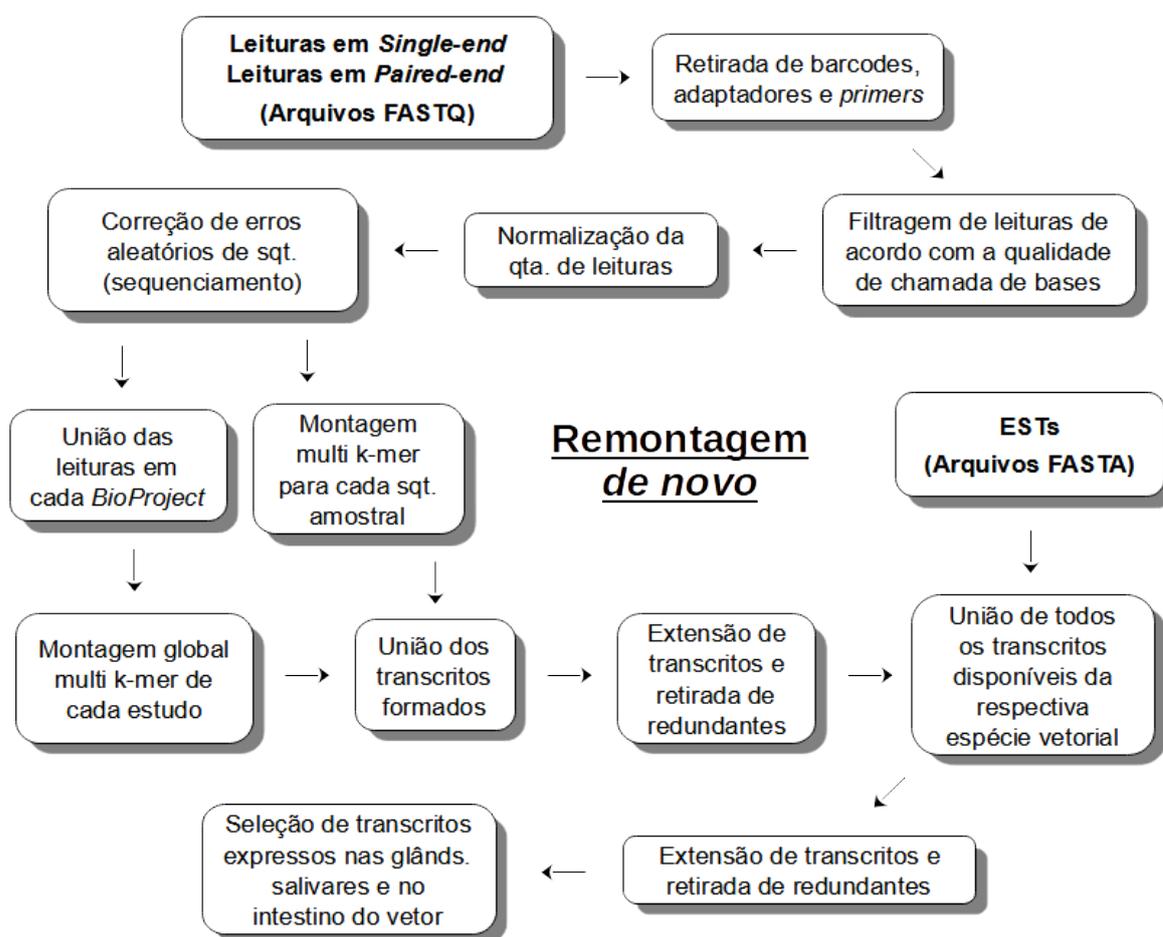
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*Representação dos valores mediano, mínimo e máximo do número total de sequências nucleotídicas por transcriptoma. nt: nucleotídeo; sr: *single-end read*; pr: *paired-end read*; EST: *Expressed Sequence Tags*. As informações correspondem-se na mesma linha. *D.*: *Dermacentor*; *R.*: *Rhipicephalus*; *A.*: *Amblyomma*. Espécie indefinida do complexo *A. cajennense s. l.*

#### 4.1.2.1 Enriquecimento de transcritos com remontagem por multi k-mer

A Figura 6 resume as etapas envolvidas com a montagem dos transcritos dos vetores. Das sequências brutas dos arquivos FASTQ de transcriptomas, foram retirados segmentos nucleotídicos de *primers*, adaptadores e barcodes – quando existentes – usando as ferramentas Trimmomatic v0.39<sup>(158)</sup> e CutAdapter v3.4<sup>(159)</sup>. Para isto, os segmentos foram identificados previamente com o programa FastQC v0.11.7<sup>(160)</sup> e ao obter as sequências referências completas das bases por meio de consulta às documentações sobre os kits usados nas metodologias de sequenciamento previamente empregadas e informadas nas respectivas seções do banco de dados do NCBI.

Figura 6 – Etapas de montagem dos transcriptomas das glândulas salivares e do intestino de vetores de FMA



Fonte: Elaborado pelo autor.

As leituras trimadas foram filtradas com o Trimmomatic, considerando o Phred score  $\geq 20$  para as bases constitutivas e foram consideradas apenas as *reads* maiores do que 25 nt para a montagem *de novo*. Leituras *paired-end* despareadas foram reunidas como *singletons* e usadas para complementar a montagem tanto de cada

amostra sequenciada como da montagem global, etapa em que as sequências de todas as amostras provenientes do mesmo *BioProject* do NCBI foram usadas conjuntamente.

As *reads* obtidas foram normalizadas entre 3-1000 com o BMap v38.87,<sup>(161)</sup> para evitar leituras aleatórias e coberturas incertas, ao mesmo tempo para que a extensão adequada dos transcritos durante a montagem fosse mantida. Após isto, foram corrigidos os erros aleatórios de sequenciamento em leituras curtas com o Rcorrector v1.0.4.<sup>(162)</sup> Sem realizar novamente as etapas anteriores, a montagem *de novo* das leituras de entrada ocorreu adotando a metodologia multi k-mer e multi *assembler* definida pelo fluxo de trabalho ORP v2.2.8 (*Oyster River Protocol*).<sup>(163)</sup>

Como não há originalmente fluxo de trabalho para montagem de leituras *single-end* por meio do ORP, reformulamos seu *script* para a montagem de transcriptomas contendo tanto apenas esse tipo de leitura, como também a mescla entre *reads paired-end* e *single-end* (ou *singletons*), a fim de evitar a perda da montagem de transcritos pouco expressos nas amostras sequenciadas. Nesses casos, para avaliar estatisticamente e também direcionar os transcritos alinhados pelas leituras *single-end* à etapa de identificação de sequências homólogas montadas, a passagem pela ferramenta TransRate v1.0.3<sup>(164)</sup> foi substituída no fluxo do ORP pelo uso da ferramenta RSEM-EVAL v1.8.<sup>(165)</sup>

As leituras de entrada das amostras sequenciadas de um determinado *BioProject* do NCBI foram reunidas, normalizadas nas mesmas condições e novamente foi realizada a montagem via ORP, agora de forma global. Após prontas as montagens amostrais e global, todos os transcritos gerados foram reunidos, pareados, estendidos conforme a existência de sequências conectivas e foram retirados, antes e após esta etapa, transcritos redundantes preferencialmente menores, por meio do *script* MegaBLAST-CAP3, que combina o uso das ferramentas CD-HIT v4.7<sup>(157)</sup> (identidade > 98%), BLAST+ v2.7.1<sup>(166)</sup> na função *megablast* e CAP3 v2015.10.02 (identidade > 95%, tamanho de banda expandida  $\geq$  23 nt e comprimento máximo de *gap* de 9 nt).<sup>(167)</sup>

Os transcritos gerados até então foram reunidos àqueles diretamente provenientes de outros *BioProjects* e aos ESTs, todos da mesma espécie de carrapato. Foram novamente processados pelo *script* MegaBLAST-CAP3 e as sequências finais obtidas foram consideradas como referência para o alinhamento de leituras dos transcriptomas. Ao alinhar, de forma não aleatória, apenas as leituras provenientes de amostras de glândula salivar e intestino dos respectivos vetores por meio de outro *script* – o qual faz uso das ferramentas Salmon v0.13.1<sup>(168)</sup> e RSEM-EVAL usando o alinhador Bowtie 2 v2.4.5 –,<sup>(169)</sup> foram selecionados os transcritos de referência expressos nesses respectivos sítios. Isto é importante para a descoberta de transcritos do trato digestório do invertebrado, que darão origem a potenciais inibidores da resposta imune do

vertebrado, a proteínas promovedoras da infecção riquetsiana e outras que talvez beneficiem o vetor quanto à alimentação sanguínea.

## 4.2 PREDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

As ESTs depositadas no NCBI e provenientes de amostras sequenciadas de glândulas salivares e intestino de vetores de FMA foram reunidas aos transcritos de referência desses mesmos tecidos e novamente as sequências redundantes preferencialmente menores foram retiradas. Nas sequências resultantes, foram preditas as possíveis fases de leitura abertas (ORFs) já traduzidas em sequências proteicas, usando a ferramenta TransDecoder v5.5.<sup>(170)</sup>

A predição foi otimizada por esta ferramenta a partir das anotações das ORFs realizadas com BLAST+ (Blastp) e HMMER v3.2.1<sup>(171)</sup>, ao compará-las às proteínas dos bancos de dados depositados no NCBI (Pfam, NR completo, KOG, COG, TIGR, PRK, CDD, SMART, SwissProt e UniProt), no Gene Ontology (GO-SeqDB) e no EBI (MEROPS e Pfam em modelo oculto de Markov), além do banco TickSialoFam.<sup>(172)</sup> Ao final, as sequências proteicas redundantes preferencialmente menores também foram retiradas com o CD-HIT (identidade > 96,5%, pois observamos que valor menor do que este pode eliminar sequências proteicas que aparentemente não são as mesmas ou isoformas com muitas posições de aminoácidos variáveis).

## 4.3 SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS NÃO HOMÓLOGAS AO HOSPEDEIRO E AO MODELO ANIMAL

A fim de evitar a seleção de antígenos proteicos passíveis de causar autoimunidade, foram retiradas as sequências proteicas homólogas (com alta similaridade) entre agente ou vetor de FMA e hospedeiro humano, usando todas as sequências proteicas humanas não redundantes depositadas no NCBI para efeito de comparação, empregando o OrthoFinder v2.2.1.<sup>(173)</sup> Além disso, como futuramente os antígenos podem ser testados em camundongos, também foram removidas, da mesma forma, as sequências homólogas entre agente ou vetor e camundongo.

## 4.4 PREDIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS CELULARES

Uma vez que antígenos extracelulares ou de membrana podem ser expostos mais facilmente às células do sistema imune do hospedeiro vertebrado, as sequências proteicas foram classificadas conforme a possibilidade de estarem ou não localizadas em um determinado compartimento celular. Esta predição foi efetuada pelo programa DeepLoc v2.0, usando o modelo ESM1b. Este programa faz uso de redes neurais, é específico para sequências eucarióticas e tende a ser mais acurado para a detec-

ção de sequências extracelulares ou de membrana comparado a outras ferramentas existentes, como YLoc+, WoLF PSORT e SignalP.<sup>(174)</sup>

Da mesma forma, foram classificadas as sequências riquetsianas, porém com a ferramenta SurfG+. Esta ferramenta é específica para proteínas procarióticas, é capaz de classificar proteínas potencialmente expostas ao meio extracelular, além das secretadas e de membrana.<sup>(175)</sup> Foram selecionadas apenas as sequências proteicas dessas localidades para a avaliação da antigenicidade.

#### 4.5 PREDIÇÃO DA ANTIGENICIDADE

As sequências proteicas dos agentes de FMA possivelmente antigênicas foram identificadas com o programa Vaxign v2.0, usando a função *dynamic* e probabilidade de adesão > 0,51. Este programa é específico para sequências procarióticas e tende a ser mais acurado que a versão anterior, em decorrência de seu método baseado em aprendizagem de máquina.<sup>(176)</sup>

Já as proteínas de carrapatos possivelmente antigênicas foram identificadas com o VaxiJen v2.0<sup>(177)</sup> e com o Vaxi-DL,<sup>(178)</sup> adotando probabilidade da sequência ser antigênica (antigenicidade) > 0,5 e modelo eucariótico que fornecesse a maior sensibilidade de detecção de sequências proteicas de carrapatos sabidamente antigênicas, já estudadas como candidatos vacinais e algumas das quais inclusive já foram patenteadas. Para a escolha do melhor modelo, as sequências antigênicas foram obtidas do banco de dados do NCBI, com base nas informações presentes nos trabalhos de Tabor (2018),<sup>(179)</sup> Lew-Tabor & Valle (2016)<sup>(141)</sup> e Nuttall *et al.* (2006),<sup>(132)</sup> e a antigenicidade das mesmas foi determinada em cada modelo (Figura 9).

#### 4.6 EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS DO MICROBIOMA DO VETOR E DO HOSPEDEIRO REPASTADO

Sequências possivelmente antigênicas mas provenientes de microrganismos, de simbiontes ou residuais que não fazem parte do transcriptoma do carrapato, como sequências de plantas e de hospedeiros que sofreram o repasto sanguíneo pelo vetor, foram identificadas com o GhostKOALA v2.2<sup>(180)</sup> e descartadas. Sequências que não puderam ser identificadas com esta ferramenta foram, de forma manual, classificadas taxonomicamente usando o realinhamento contra sequências do banco UniProt v2022.02<sup>(181)</sup> e descartadas caso fosse concluído não pertencerem ao transcriptoma do artrópode em questão.

#### 4.7 SELEÇÃO POR HOMOLOGIA DE ANTÍGENOS PROTEICOS SALIVARES E INTESTINAIS DO *D. VARIABILIS*

Conforme descrito na Tabela 2, não há transcriptomas de glândula salivar e de intestino de *D. variabilis* depositados em banco de dados público que permitam avaliar o realinhamento e a expressão dos transcritos gerados. A partir de candidatos proteicos vacinais passíveis de serem obtidos desses sítios, conforme avaliados nas demais espécies de vetores, foi possível determinar, por homologia de sequência usando o OrthoFinder, os candidatos possivelmente expressos nesses órgãos do *D. variabilis*, conforme metodologia realizada anteriormente com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa, para a detecção de sequências de *Lutzomyia longipalpis* homólogas ao *Phlebotomus papatasi*.<sup>(182)</sup>

Os candidatos homólogos foram reunidos às poucas sequências proteicas supostamente antigênicas e decorrentes da predição das ORFs dos transcritos de amostra intestinal de *D. variabilis*. Sequências redundantes preferencialmente menores foram descartadas com o CD-HIT.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS ORTÓLOGAS ÀQUELAS DE BACTÉRIAS BENÉFICAS AO HOSPEDEIRO E PRESENTES NO INTESTINO HUMANO

Algumas proteínas do agente ou vetor podem possuir alta similaridade a outras proteínas provenientes de outras bactérias importantes por beneficiar o funcionamento adequado do intestino humano e por proteger contra infecções de outros microrganismos patogênicos. Sendo assim, os candidatos antigênicos foram classificados como ortólogos ou não às proteínas dessas bactérias benéficas também com o OrthoFinder, ao usar os bancos de dados GutFloraDB v1 e v2<sup>(154, 183, 184)</sup> refeitos como um único novo banco pelo nosso grupo de pesquisa.

Nele, acrescentamos diversas outras bactérias após revisão da literatura – totalizando mais de 100 espécies – e retiramos outras, como por ex. *Photorhabdus luminescens* e *Borrelia burgdorferi*, por serem questionáveis quanto ao papel benéfico, à possibilidade evidente de dano ao intestino humano ou quanto às sequências não serem realmente pertencentes a espécie/linhagem bacteriana envolvida, mantendo apenas sequências proteicas não redundantes intraespecíficas (identidade > 95%). Pretendemos publicar a respeito deste novo banco.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA ESSENCIALIDADE PROTEICA E FATORES DE VIRULÊNCIA

Os candidatos antigênicos de riquetsias causadoras de FMA foram alinhados com BLAST+ às proteínas procarióticas provenientes dos bancos DEG v10<sup>(185)</sup> e VFDB v2022.06,<sup>(186)</sup> para a caracterização daquelas proteínas que por ventura são essen-

ciais para a sobrevivência da bactéria e/ou que podem causar dano ao hospedeiro vertebrado, considerando os parâmetros padrões sugeridos nas respectivas plataformas *online*. Já as sequências proteicas dos vetores foram comparadas apenas às proteínas essenciais de artrópodes disponíveis no DEG.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA ALERGENICIDADE DOS ANTÍGENOS

Certos antígenos, tanto de animais como de algumas bactérias conhecidas, podem provocar reações alérgicas no hospedeiro vertebrado. Sendo assim, os candidatos antigênicos dos agentes e dos vetores de FMA foram avaliados quanto à alergenidade pelo AllerTOP v2.0<sup>(187)</sup> e ao compará-los aos alérgenos do banco de dados AllerBase v2022.03.08.<sup>(188)</sup>

No entanto, foi observado que nem todas as sequências de alérgenos rotulados neste banco mas lincadas às plataformas Allergen<sup>(189)</sup> e/ou Allergome<sup>(190)</sup> estavam depositadas de fato no AllerBase. Em vista disso, as sequências proteicas homólogas foram analisadas localmente, usando o OrthoFinder. O banco completo de sequências alérgicas foi definido após explorar manualmente o portal web para obtê-las via cURL v7.63,<sup>(191)</sup> sendo que o número total de alérgenos de animais obtido foi maior do que os 1013 contabilizados na plataforma do AllerBase (<http://bioinfo.unipune.ac.in/AllerBase/HTML/Statistics.html>), mesmo após a retirada de redundantes com o CD-HIT. Vale ressaltar que alérgenos sem sequências proteicas definidas, mas cujas sequências nucleotídicas estavam presentes e completas, tiveram suas sequências de aminoácidos preditas pelo TransDecoder.

## 5 RESULTADOS

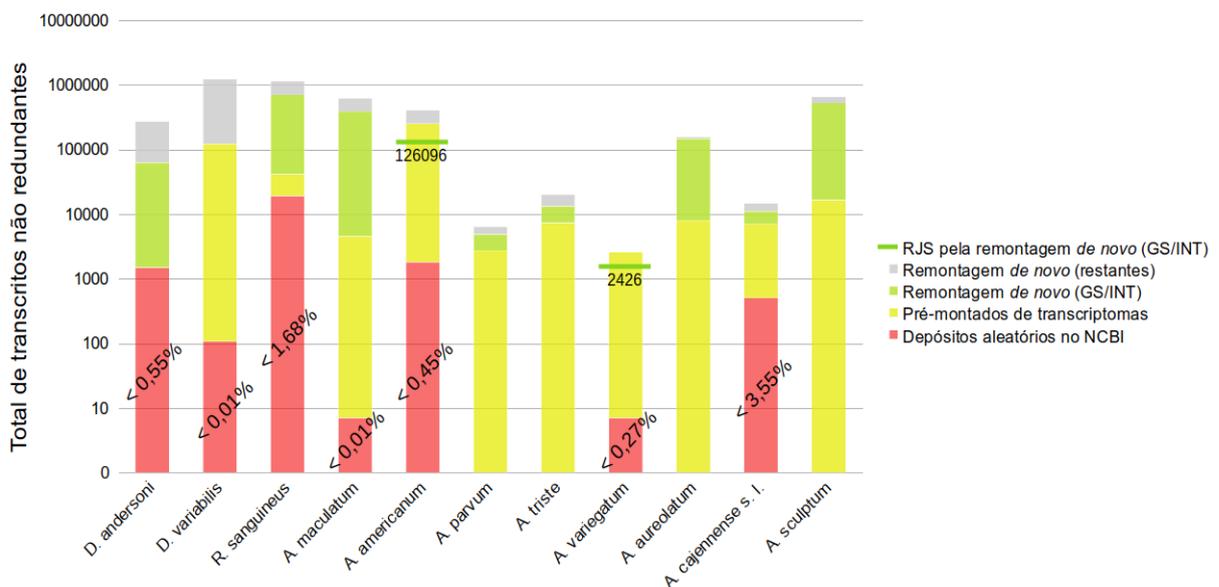
O número de antígenos preditos está intimamente ligado à disponibilidade de sequências proteicas. Uma vez preditas a partir das sequências nucleotídicas, a quantidade de antígenos descobertos também dependerá do número de transcritos montados, com qualidade adequada para as análises seguintes.

### 5.1 RENDIMENTO DE TRANSCRITOS PARA A PROCURA DE ANTÍGENOS

Após a montagem multi-kmer, foram obtidos de 6402 (referência global de *A. parvum*) a 1.220.548 (ref. global de *D. variabilis*) transcritos representativos nos vetores de FMA. Destes transcritos, foi observada a presença de 4910 (*A. parvum*) a 704.520 (*R. sanguineus*) em glândulas salivares ou intestino (Figura 7). Diante da existência de transcritos depositados no NCBI por outros pesquisadores, a maior perda de representação antigênica pode ter ocorrido para *A. cajennense s. l.* ( $\leq 3,5\%$ ).

Por outro lado, a menor representação de transcritos codificantes nas glândulas salivares ou intestino é da espécie *A. variegatum*, com 1650 (Figura 8), enquanto que a maior representação nesses sítios é também devida ao *R. sanguineus*. Sendo o total de transcritos codificantes de *D. variabilis* próximo ao número de codificantes salivares ou intestinais de *R. sanguineus* e *A. sculptum*, é possível que a perda de proteínas antigênicas homólogas não comparadas entre os vetores tenha sido discreta.

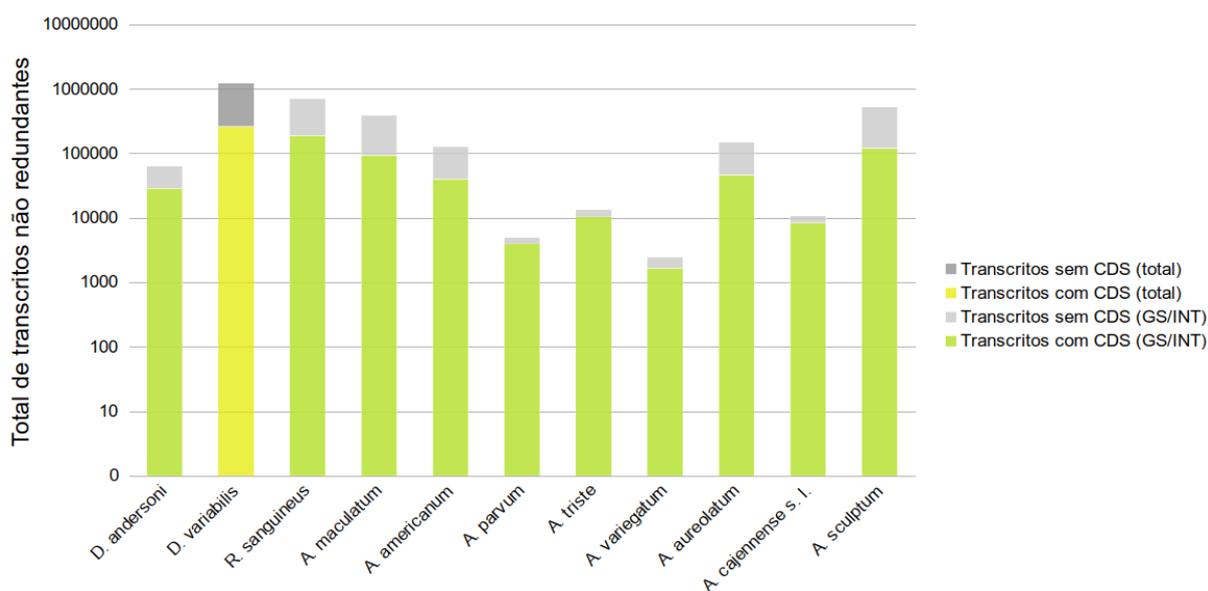
Figura 7 – Freq. absoluta de transcritos não redundantes de vetores de FMA disponíveis no NCBI e formados após a montagem *de novo*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Conforme visto na Tabela 2, alguns transcriptomas depositados no NCBI possuem, além de leituras brutas, transcritos pré-montados (barras amarelas). Dentre estes, podem haver sequências ESTs. Pela remontagem *de novo*, foi possível representar aprox. até 100 vezes mais transcritos, seja apenas nas glândulas salivares (GS) ou no intestino (INT) dos vetores (barras verdes), seja em outros sítios investigados ou considerando alguma fração de transcritos montados de forma imprecisa (barras cinzas). Além disso, é evidente como a remontagem promoveu redução de transcritos novos e pré-montados de *A. americanum* e *A. variegatum*, por junção de sequências (RJS) parciais (traçado em verde). Para efeito de comparação, muitas sequências de RNA de outros autores depositadas na seção de nucleotídeos do NCBI e que não são redundantes aos transcritos pré-montados mencionados podem ter sido representadas após a remontagem (avaliação não realizada). A perda máxima de representatividade dessas sequências não amostradas foi calculada em porcentagem (barras vermelhas).

Figura 8 – Distribuição de transcritos codificantes e não codificantes nas glândulas salivares ou intestino dos vetores de FMA



Fonte: Elaborado pelo autor.

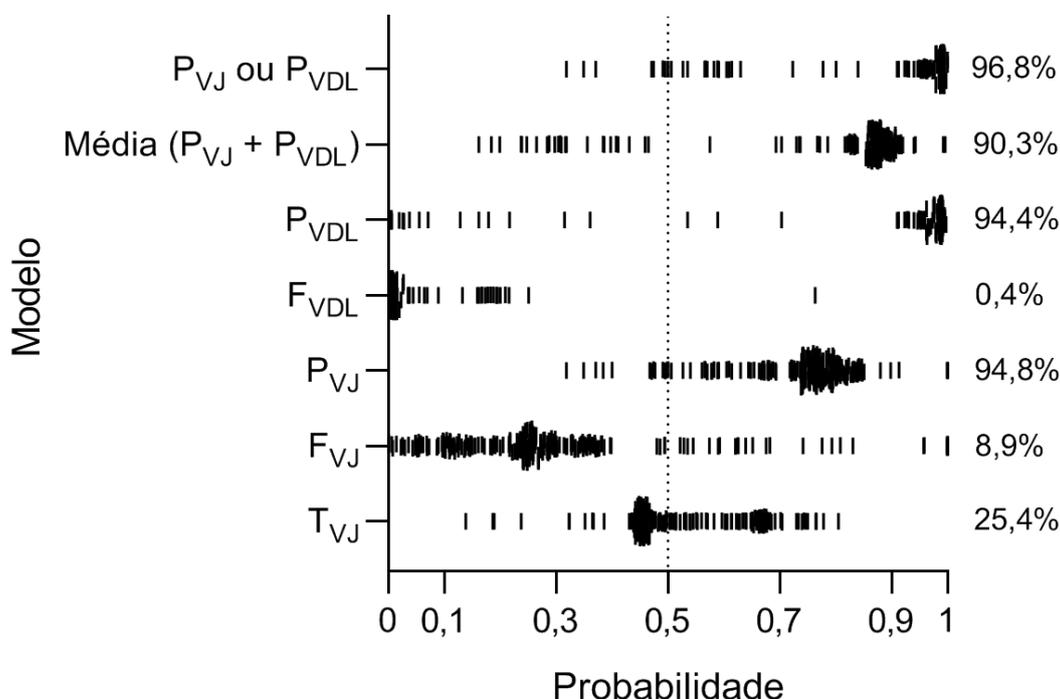
Nota: \*CDS: sequência determinante de codificação; GS: glândula salivar; INT: intestino; total: transcritos de todos os sítios disponíveis.

## 5.2 MODELO EUCARIÓTICO PROPOSTO PARA A AVALIAÇÃO DE ANTIGENICIDADE EM SEQUÊNCIAS DE CARRAPATOS

De 248 proteínas sabidamente conhecidas como antígenos de carrapatos (principalmente de *R. microplus*), 96,8% foram classificadas corretamente como antígenos pela combinação dos modelos eucarióticos de predição antigênica para parasitos (do VaxiJen) e para protozoários (do Vaxi-DL, Figura 9). Foram considerados possíveis antígenos as sequências proteicas de vetores que tiveram positividade em pelo me-

nos um desses modelos.

Figura 9 – Sensibilidade de detecção de antígenos de vetores (controle positivo) por modelos eucarióticos do VaxiJen e do Vaxi-DL



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*VJ: VaxiJen; VDL: Vaxi-DL; P: Parasitos ou Protozoários; F: Fungos; T: Tumores; Ou: Positividade em pelo menos um dos modelos, sendo considerado o maior valor de probabilidade; Média +: média aritmética simples das probabilidades entre dois modelos. À direita, os valores de sensibilidade estão representados em porcentagem. Probabilidade adotada para a sequência proteica ser antigênica: > 0,5.

### 5.3 REPERTÓRIO DE ANTÍGENOS EXPOSTOS AO MEIO EXTRACELULAR PARA OS VETORES PARASITIFORMES

Apesar da maior prevalência de transcritos codificantes salivares/intestinais ter sido de *R. sanguineus*, o maior número encontrado de sequências proteicas preditas de transcriptomas desses sítios e que estão depositadas no NCBI foi de *A. americanum* (Tabela 3), sendo em cerca de 5 vezes maior que o número de ORFs não redundantes preditas da mesma espécie após a remontagem *de novo*. Para a representação proteica das outras espécies de carrapatos, ocorre o contrário. O número de ORFs preditas foi sempre maior (Tabelas 3, 4 e 5) e não foram encontradas sequências peptídicas preditas a partir de transcriptomas de *D. andersoni* e *D. variabilis* depositados no NCBI.

Tabela 3 – Seleção das sequências proteicas salivares/intestinais de vetores de *R. rickettsii* (Américas do Norte e Central) por vacinologia reversa

<b>Etapas sequenciais</b>	<b>D. <i>andersoni</i></b>	<b>D. <i>variabilis</i></b>	<b>R. <i>sanguineus</i></b>	<b>A. <i>americanum</i></b>	<b>A. <i>parvum</i></b>
1) Sequências proteicas iniciais (ORFs + FAA-NCBI)	34.481 + 0	305.618 + 0	206.874 + 32.412	46.271 + 235.115	4125 + 2838
2) Não redundantes	26.744 (77,6%)	190.123 (62,2%)	168.926 (70,6%)	203.927 (72,5%)	4199 (60,3%)
3) Não homólogas às proteínas dos hospedeiros	19.355 (56,1%)	173.414 (56,7%)	154.576 (64,6%)	192.263 (68,3%)	1732 (24,9%)
4) Extracelulares ou na memb. plasmática	5321 (15,4%)	36.775 (12,0%)	16.344 (6,8%)	41.666 (14,8%)	861 (12,4%)
5) Antigênicas	3965 (11,5%)	28.050 (9,2%)	12.423 (5,2%)	32.063 (11,4%)	700 (10,0%)
6) Próprias do vetor	2762 (8,0%)	8716 (2,8%)	10.070 (4,2%)	17.641 (6,3%)	537 (7,7%)
7) Salivares ou intestinais (final)	<b>2762 (8,0%)</b>	<b>7536 (2,5%)</b>	<b>10.070 (4,2%)</b>	<b>17.641 (6,3%)</b>	<b>537 (7,7%)</b>
8.1) Identificadas como essenciais para o vetor	124 (0,4%)	281 (0,1%)	237 (0,1%)	181 (0,1%)	12 (0,2%)
8.2) Ortólogas às prots. das bactérias benéficas ao homem	158 (0,5%)	328 (0,1%)	254 (0,1%)	232 (0,08%)	5 (0,07%)
8.3) Alergenicidade positiva (AllerTOP)	552 (1,6%)	1392 (0,4%)	1537 (0,6%)	4310 (1,5%)	112 (1,6%)
8.4) Homólogas a alérgenos (AllerBase)	102 (0,3%)	155 (0,05%)	182 (0,08%)	110 (0,04%)	12 (0,2%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*ORFs + FAA-NCBI: número de fases de leitura abertas somado ao número de sequências proteicas preditas previamente de transcriptomas pré-montados e depositadas no NCBI, em formato FASTA.

Apesar disso, não ocorreu menor representação antigênica para essas duas espécies, cujo menor número foi da representação do *A. variegatum*. O rendimento antigênico final com o método de vacinologia reversa aplicado ficou entre 2,5 a 10,4% do total de sequências proteicas, o que representa milhares de possíveis antígenos nas glândulas salivares ou intestino dos carrapatos transmissores de FMA.

Menos de 5% destes alvos apresentaram ortologia a alguma proteína de bactéria benéfica ao trato gastrointestinal humano ou a algum alérgeno já conhecido. Já os

resultados da ferramenta AllerTOP evidenciaram que aproximadamente 15 a 25% desses alvos podem possuir algum motivo de característica alergênica e a atenção aos mesmos é necessária futuramente durante a análise dos epítomos nessas sequências.

Tabela 4 – Seleção das sequências proteicas salivares/intestinais de vetores de *R. rickettsii* (América do Sul) por vacinologia reversa.

<b>Etapas sequenciais</b>	<b>A. aureolatum</b>	<b>A. cajennense s. l.</b>	<b>A. sculptum</b>
1) Sequências proteicas iniciais (ORFs + FAA-NCBI)	51.185 +	8701 +	130.970 +
	7983	5770	4233
2) Não redundantes	40.670 (68,7%)	7822 (54,0%)	114.841 (84,9%)
3) Não homólogas às proteínas dos hospedeiros	30.903 (52,2%)	4298 (29,7%)	103.226 (76,3%)
4) Extracelulares ou na memb. plasmática	8081 (13,7%)	2409 (16,6%)	13.565 (10,0%)
5) Antigênicas	6098 (10,3%)	1706 (11,8%)	10.067 (7,4%)
6) Próprias do vetor	4700 (7,9%)	1322 (9,1%)	7481 (5,5%)
7) Salivares ou intestinais (final)	<b>4700</b> <b>(7,9%)</b>	<b>1322</b> <b>(9,1%)</b>	<b>7481</b> <b>(5,5%)</b>
8.1) Identificadas como essenciais para o vetor	173 (0,3%)	23 (0,2%)	221 (0,2%)
8.2) Ortólogas às prots. das bactérias benéficas ao homem	168 (0,3%)	14 (0,1%)	315 (0,2%)
8.3) Alergenicidade positiva (AllerTOP)	888 (1,5%)	280 (1,9%)	1485 (1,1%)
8.4) Homólogas a alérgenos (AllerBase)	121 (0,2%)	35 (0,2%)	159 (0,1%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*ORFs + FAA-NCBI: número de fases de leitura abertas somado ao número de sequências proteicas preditas previamente de transcriptomas pré-montados e depositadas no NCBI, em formato FASTA.

Tabela 5 – Seleção das sequências proteicas salivares/intestinais de vetores de *R. parkeri* por vacinologia reversa

Etapas sequenciais	<i>A. maculatum</i>	<i>A. triste</i>	<i>A. variegatum</i>
1) Sequências proteicas iniciais (ORFs + FAA-NCBI)	109.904 + 4849	11.084 + 8098	1652 + 753
2) Não redundantes	76.133 (66,3%)	10.839 (56,5%)	1661 (69,1%)
3) Não homólogas às proteínas dos hospedeiros	62.867 (54,8%)	5999 (31,3%)	674 (28,0%)
4) Extracelulares ou na memb. plasmática	15.945 (13,9%)	3320 (17,3%)	271 (11,3%)
5) Antigênicas	11.979 (10,4%)	2626 (13,7%)	233 (9,7%)
6) Próprias do vetor	8684 (7,6%)	1991 (10,4%)	175 (7,3%)
7) Salivares ou intestinais (final)	<b>8684</b> <b>(7,6%)</b>	<b>1991</b> <b>(10,4%)</b>	<b>175</b> <b>(7,3%)</b>
8.1) Identificadas como essenciais para o vetor	307 (0,3%)	31 (0,2%)	7 (0,3%)
8.2) Ortólogas às prots. das bactérias benéficas ao homem	284 (0,2%)	25 (0,1%)	0 (0%)
8.3) Alergenicidade positiva (AllerTOP)	1484 (1,3%)	372 (1,9%)	44 (1,8%)
8.4) Homólogas a alérgenos (AllerBase)	102 (0,09%)	32 (0,2%)	10 (0,4%)

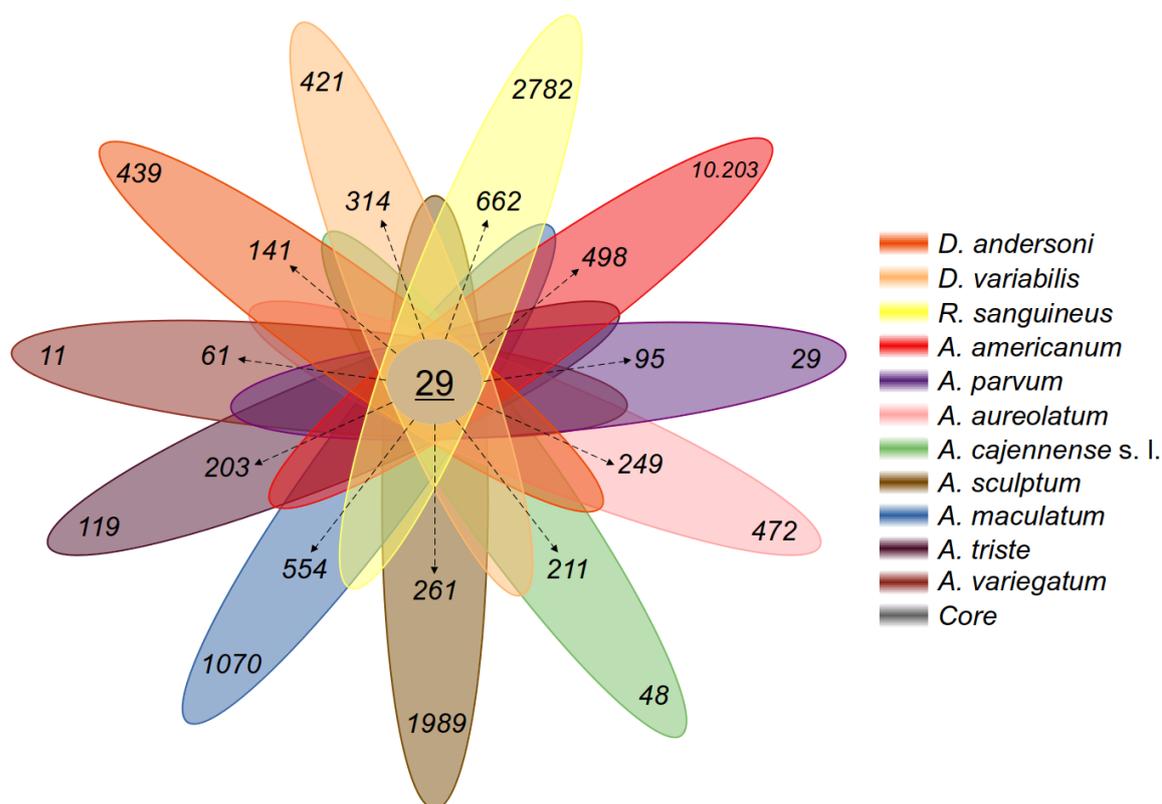
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*ORFs + FAA-NCBI: número de fases de leitura abertas somado ao número de sequências proteicas preditas previamente de transcriptomas pré-montados e depositadas no NCBI, em formato FASTA.

Diante da grande quantidade de candidatos antigênicos dos carrapatos transmissores de FMA, ainda foi possível encontrar centenas de antígenos salivares/intestinais conservados entre as espécies (Figura 10), subdivididos em 29 grupos ortólogos. Em virtude da baixa quantidade de sequências proteicas representativas do *A. variegatum*, foram encontrados apenas 61 antígenos conservados deste vetor.

Em torno de 10.000 sequências preditas como antigênicas de *A. americanum* parecem ser exclusivas desta espécie. Mais de 95% delas são sequências proteicas previamente preditas dos transcriptomas, que estão depositadas no NCBI. Apesar da grande quantidade de antígenos preditos, essa espécie não foi a que possuiu a maior quantidade de antígenos conservados. Em contrapartida, a seleção por homologia de proteínas antigênicas para a definição de candidatos salivares/intestinais do *D. variabilis* permitiu detectar 314 sequências antigênicas conservadas deste vetor, valor um pouco maior do que a quantidade média de antígenos conservados entre todas as espécies (293,5).

Figura 10 – Diagrama de Venn das sequências proteicas antigênicas de glândula salivar ou intestino dos vetores de FMA, expostas ao meio extracelular



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*Core: grupos ortólogos de sequências antigênicas comuns entre todas as espécies envolvidas. O número de grupos ortólogos está sublinhado. As setas indicam as sequências homólogas da respectiva espécie. Um único grupo ortólogo pode possuir pelo menos 1 sequência de cada espécie envolvida. Demais números designam as sequências antigênicas únicas de cada espécie. Não há antígenos de simbiontes retratados aqui.

Dentre as sequências conservadas que compõem os grupos ortólogos entre todas as espécies, as sequências de proteínas conhecidas e relacionadas a receptores de LDL, ricas em glicina ou contendo domínio de repetição de papa usualmente apre-

sentaram as maiores probabilidades antigênicas (Tabela 6). Nesta mesma classificação, também foram encontradas sequências de proteínas hipotéticas e sem função definida. Destas, algumas sequências já foram descobertas previamente e até 8 novas sequências proteicas por espécie são desconhecidas. Além disso, é interessante destacar que nenhum grupo ortólogo apresentou sequência com alta similaridade às proteínas de bactérias benéficas ao trato gastrointestinal humano.

Tabela 6 – Core de sequências salivares/intestinais dos vetores de FMA com probabilidade antigênica média entre VaxiJen e Vaxi-DL  $\geq 0,9$

Grupo de antígenos conservados	Nº de sequências por vetor	LC	SP	E	A	Bact. benéf com prot. ortóloga
Prots. relacionadas a receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL, indef.)	<b>1-12</b> 0 ( <i>D. andersoni</i> , <i>A. cajennense</i> s. l., <i>A. variegatum</i> )	Ext.	-(1)/+	-/(7)	-	-
Prots. do cimento ricas em glicina	<b>1-5</b>	Ext.	+	-	-/(2)	-
Prots. da parede celular ricas em glicina	<b>3-12</b> 0 ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. parvum</i> , <i>A. variegatum</i> )	Ext.	+	-	-/(3)	-
Prot. semelhante à ctenidina 3	<b>2</b> ( <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prots. secretadas ricas em glicina (indef.)	<b>2</b> ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>A. parvum</i> , <i>A. variegatum</i> )	Ext.	-/(1)	-	-/(1)	-
Prot. secretada 75-like rica em histidina	<b>1</b> ( <i>A. aureolatum</i> , <i>A. sculptum</i> )	Ext.	-	-	-	-
Prots. de repetição de PAPA secretadas	<b>1-8</b> ( <i>A. americanum</i> , <i>A. parvum</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>A. cajennense</i> s. l., <i>A. sculptum</i> )	Ext.	+	-	-/(1)	-
Prots. associadas a glândula salivar	<b>1-3</b> ( <i>R. sanguineus</i> , <i>A. cajennense</i> s. l., <i>A. variegatum</i> )	Ext.	+	-	-/(1)	-

Metaloprotease salivar de carrapato (indef.)	<b>1</b> ( <i>D. variabilis</i> )	Ext.	+	-	-(1)/+	-
Peptídeos secretados de glândula salivar (indef.)	<b>1-3</b> ( <i>A. parvum</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>A. cajennense</i> , <i>A. sculptum</i> , <i>A. triste</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prots. putativas secretadas (indef.)	<b>2-10</b> 0 ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>A. maculatum</i> , <i>A. variegatum</i> )	Ext.	+	-	-/(+)(3)	-
Prot. de lóbulo ótico terrivelmente reduzido	<b>1-2</b> ( <i>D. variabilis</i> , <i>A. americanum</i> , <i>A. sculptum</i> , <i>A. triste</i> )	Ext.	+	-/(+)(1)	-	-
Prots. de membrana conservadas (indef.)	<b>3-4</b> ( <i>A. americanum</i> , <i>A. cajennense</i> s. l.)	Ext.	+	-	-/(+)(3)	-
Receptor de vitelogenina	<b>1</b> ( <i>A. cajennense</i> s. l., <i>A. aureolatum</i> )	Ext.	+	-/+	-/+	-
Autotransportador (indef.)	<b>1</b> ( <i>A. parvum</i> )	Ext.	+	-	+	-
Nucleoporin 62-like	<b>1</b> ( <i>A. parvum</i> )	Ext.	+	-	+	-
Receptores de lipoforinas	<b>1-7</b> ( <i>A. sculptum</i> , <i>A. maculatum</i> , <i>A. triste</i> )	Ext./ Memb. (1)	+	-(3)/+	-	-
Mucina semelhante a 68d e 22	<b>1</b> ( <i>A. maculatum</i> )	Ext.	+	-	-	-
Inibidores de peptidase da família I8	<b>1-2</b> ( <i>A. sculptum</i> , <i>A. maculatum</i> )	Ext./ Memb. (1)	-(1)/+	-(1)/+	-	-
Inibidores de protease Kunitz-like	<b>7</b> ( <i>A. americanum</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prots. contendo domínio de peptidase M12B	<b>1-2</b> ( <i>A. americanum</i> , <i>A. aureolatum</i> )	Ext.	+	-	-/(+)(2)	-
Colágeno alfa-I do tipo III	<b>1</b> ( <i>D. andersoni</i> )	Ext.	+	-	+	-
Prots. semelhantes à elastina	<b>7</b> ( <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	+	-

Prots. associadas à queratina 19-2-like	<b>1</b> ( <i>D. andersoni</i> , <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prots. de proteoglicano de sulfato de heparan	<b>1-2</b> ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>A. sculptum</i> )	Ext.	+	-/(+)(1)	-	-
Prots. contendo domínio de ligação a quitina	<b>2</b> ( <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prot. da cutícula pulpar Edg-91-like	<b>1</b> ( <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prots. semelhantes à Pygopus	<b>1-2</b> ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> )	Ext.	+	-	-/(+)(1)	-
Prots. semelhantes à Prisiilkina 39	<b>1-2</b> ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> )	Ext.	+	-	-(1)/+	-
Prot. semelhante ao fator glandular da seda 1	<b>1</b> ( <i>A. americanum</i> )	Ext.	+	-	-	-
Subunidade do complexo de compensação de dosagem mle-like	<b>1</b> ( <i>A. aureolatum</i> )	Ext.	+	-	-	-
Prot. contendo domínio semelhante a SVWC	<b>1</b> ( <i>R. sanguineus</i> )	Ext.	+	-	+	-
Prots. anotadas não caracterizadas (indef.)	<b>1-13</b> 0 ( <i>A. parvum</i> , <i>A. triste</i> , <i>A. variegatum</i> )	Ext.	+	-	-(4)/+	-
Prots. anotadas hipotéticas (indef.)	<b>1-18</b> 0 ( <i>A. parvum</i> , <i>A. cajennense</i> s.l., <i>A. sculptum</i> , <i>A. maculatum</i> )	Ext./ Memb. (1)	-(1)/+	-	-	-
Prots. não anotadas desconhecidas (indef.)	<b>1-8</b> 0 ( <i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. variegatum</i> )	Ext.	+	-/(+)(1)	-/(+)(3)	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Prots: proteínas; LC: localização celular; Ext.: extracelular; SP: presença de peptídeo sinal; E: essencialidade; A: alergenicidade indicada pelo AllerTOP; 0 ( ): espécies que não possuem sequências nos grupos conservados com probabilidade antigênica  $\geq 0,9$ . Considerando tal ponto de corte, entre parênteses após valor numérico em negrito, estão as espécies detentoras das respectivas sequências proteicas antigênicas. Estas fazem parte dos grupos ortólogos também compostos por outras sequências (mencionadas ou não nesta tabela), das demais espécies a formar o *core* (Figura 10).

#### 5.4 REPERTÓRIO DE ANTÍGENOS EXPOSTOS AO MEIO EXTRACELULAR PARA OS AGENTES

Em relação às riquetsias de FMA, o rendimento antigênico final com o método de vacinologia reversa específico para predição em procariotos ficou apenas entre 2,6 a 3,6%, o equivalente a aproximadamente 40 antígenos (Tabela 7). Entre 14 a 27% destes corresponderam a sequências de proteínas essenciais para a bactéria, valores próximos à quantidade de sequências relacionadas a fatores de virulência e à quantidade de sequências ortólogas a proteínas de bactérias benéficas para o trato gastrointestinal humano. Nenhuma sequência antigênica possuiu homologia a alérgenos, apesar de 23 a 27% delas poderem possuir motivos alergênicos de acordo com o AllerTOP.

Tabela 7 – Seleção das sequências proteicas dos agentes de FMA por vacinologia reversa

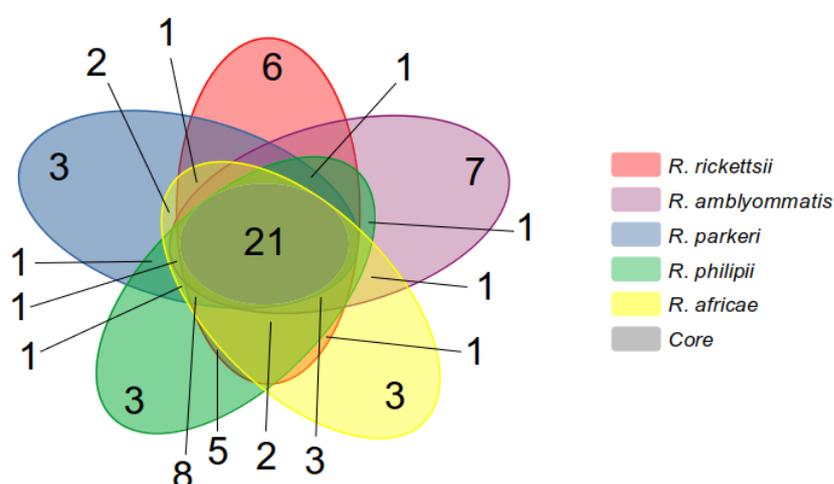
<b>Etapas sequenciais</b>	<b><i>R. rickettsii</i></b>	<b><i>R. parkeri</i></b>	<b><i>R. philipii</i></b>	<b><i>R. africae</i></b>	<b><i>R. amblyommatis</i></b>
1) Sequências proteicas não redundantes	1343	1474	1343	1041	1377
2) Sequências comuns entre linhagens da mesma espécie	1181 (87,9%)	1166 (79,1%)	1343 (100%)	1041 (100%)	970 (70,4%)
3) Não homólogas às proteínas dos hospedeiros	864 (64,3%)	846 (57,4%)	927 (69,0%)	932 (89,5%)	700 (50,8%)
4) Extracelulares ou na memb. plasmática	256 (19,1%)	254 (17,2%)	265 (19,7%)	260 (25,0%)	207 (15,0%)
5) Antigênicas	<b>48</b> <b>(3,6%)</b>	<b>42</b> <b>(2,8%)</b>	<b>47</b> <b>(3,5%)</b>	<b>44</b> <b>(4,2%)</b>	<b>36</b> <b>(2,6%)</b>
6.1) Essenciais para o agente	13 (1,0%)	10 (0,7%)	11 (0,8%)	12 (1,1%)	5 (0,4%)
6.2) Fatores de virulência	12 (0,9%)	12 (0,8%)	12 (0,9%)	10 (1,0%)	9 (0,6%)

6.3) Fatores de virulência essenciais para o agente	6 (0,5%)	1 (0,1%)	1 (0,1%)	2 (0,2%)	0 (0%)
6.4) Ortólogas às prots. das bactérias benéficas ao homem	15 (1,1%)	12 (0,8%)	13 (1,0%)	14 (1,3%)	8 (0,6%)
6.5) Alergenicidade positiva (AllerTOP)	11 (0,8%)	9 (0,6%)	12 (0,9%)	8 (0,8%)	10 (0,7%)
6.6) Homólogas a alérgenos (AllerBase)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram encontrados por volta de 50% dos candidatos vacinais de riquetsias causadoras de FMA conservados entre todas as espécies avaliadas (Figura 11). Além disso, é interessante destacar a existência de 8 sequências antigênicas conservadas entre as demais espécies, exceto na *R. amblyommatis*, enquanto foi creditada à *R. philipii* a maior quantidade de antígenos conservados expostos ao meio extracelular entre duas ou mais espécies bacterianas.

Figura 11 – Diagrama de Venn dos grupos ortólogos de sequências proteicas antigênicas dos agentes de FMA, expostas ao meio extracelular



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*Core: grupos ortólogos de sequências antigênicas comuns entre todas as espécies envolvidas. Um único grupo ortólogo pode possuir pelo menos 1 sequência de cada espécie envolvida.

Dentre o *core* antigênico formado por todas as espécies, foram destacados antígenos já conhecidos de moderada a alta probabilidade de adesão em moléculas de MHC, como OmpB, OmpW e Porina 4, além de outros menos estudados como alvos ou com relação às suas funções (Tabela 8). Dentre estes, foram encontradas uma proteína

classificada como essencial para a bactéria e que contém repetições de pentapeptídeos em domínio do tipo Yjbl e uma proteína de membrana hipotética/desconhecida, com peso molecular equivalente a 6,74 Kd.

Além disso, dois fatores de virulência conservados entre as espécies – uma proteína de superfície da Família RT0821/Lpp0805 e a proteína VirB3 do sistema de secreção do Tipo IV – também foram classificadas como antigênicas. É interessante observar que a *R. amblyommatis* não apresentou antígeno como fator de virulência essencial para o agente, enquanto pelo menos 1 fator essencial e antigênico está conservado entre as demais espécies de riquetsias (Tabela 7).

Tabela 8 – Core antigênico dos agentes de FMA

Antígenos conservados	Probab. de adesão	LC	SP	TH	E	VF	A	Bact. benéfica com proteína homóloga
ATP Sintase F0F1 (Subunidade B')	0,56-0,73	Memb.	-	1	+	-	-	<i>B. catenulatum</i>
Chaperona de cobre PCu(A)C	0,56-0,68	Ext.	+	0	-	-	+	-
Dioxigenase	0,51-0,6	Ext.	+	0	-	-	+	-
Hidrolase alfa/beta (Peptidase)	0,52-0,65	PSE	-	0-1	-	-	-	-
Domínio SH3	0,51-0,53	Memb.	+	0	+	-	-	<i>I. bartlettii</i>
OmpB (Isoforma menor)	0,93-0,94	Ext.	+	1	-	+	+	<i>A. muciniphila</i>
OmpW	0,72-0,75	Ext.	+	0	-	-	-	<i>C. youngae</i>
Porina 4	0,82-0,84	Ext.	+	0	-	-	-	-
Prot. da Família das Porinas contendo LomR I*	0,74-0,77	Ext.	+	0	-	+	+	<i>P. rustigianii</i>
Prot. da Família das Porinas contendo LomR II*	0,73-0,8	Ext.	+	0	-	+	+	<i>E. coli</i>
Prot. contendo DUF2532	0,6-0,7	Ext.	+	0	-	-	-	-
Prot. contendo DUF2673	0,55-0,67	Ext.	+	0	-	-	-	-
Prot. contendo DUF3035	0,56-0,65	PSE	-	0	-	-	-	-
Prot. contendo SPOR	0,57-0,61	PSE	-	1	-	-	-	-
Prot. contendo repetições de pentapepts. Yjbl-like	0,68-0,72	PSE	-	0	+	-	-	-
Prot. da Família RDD	0,53-0,55	Memb.	-	3	+	-	-	<i>Coprococcus sp.</i>

Prot. da Família do locus B associado à invasão	0,53-0,57	Memb.	-	1	-	-	-	-
Prot. de superfície da Família RT0821/Lpp0805	0,54-0,63	PSE	-	0	-	+	-	<i>A. hallii</i>
Prot. de membrana NfeD-like	0,52-0,58	Memb.	-	2	-	-	-	<i>A. stercorihominis</i>
Prot. hipotética de membrana 6,74 Kd	0,53-0,63	Memb.	-	0	-	-	-	-
Prot. VirB3 do sistema de secreção do Tipo IV	0,52-0,55	Memb.	-	2	-	+	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: \*I/II: numeração arbitrária para proteínas de isoformas diferentes com domínio LomR. LC: localização celular; Ext.: extracelular; PSE: proteína potencialmente exposta à superfície celular; SP: presença de peptídeo sinal; TH: número de hélices transmembranas presentes; E: essencialidade; VF: presença de fator de virulência; A: alergenicidade indicada pelo AllerTOP. Gêneros bacterianos indicados: *Bifidobacterium*, *Intestinibacter*, *Akkermansia*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Escherichia*, *Anaerobutyricum*, *Anaerofustis*.

## 6 DISCUSSÃO

A abundância de candidatos antigênicos – conservados ou exclusivos – de espécies de carrapatos e de agentes de FMA foi ampliada significativamente em relação ao que já se sabe pela literatura. Por outro lado, a análise da estatística complementar sobre os transcriptomas depositados publicamente no NCBI indicou que certos vetores ainda carecem de dados mais fidedignos ou completos à respeito da expressão transcricional em sítios específicos e isto acabou por impactar na obtenção de maior número de proteínas antigênicas. Em virtude da indisponibilidade de transcriptomas de *D. occidentalis*, *A. mixtum* e *A. ovale* até então no NCBI, antígenos dessas espécies não puderam ser representados. Outros detalhes seguem nas seções seguintes.

### 6.1 IMPACTO DA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E DA MONTAGEM EMPREGADA SOBRE O RENDIMENTO E FORMAÇÃO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro trabalho que envolve a predição de sequências proteicas a partir da junção de várias dezenas de montagens de transcriptomas de uma determinada espécie de artrópode. Apesar da maior quantidade disponível (Tabela 2) ser decorrente de *D. variabilis* (104), seguindo por *A. americanum* (88), *D. andersoni* (73) e *R. sanguineus* (55), é interessante observar que com apenas 12 transcriptomas (*A. sculptum*) já seria possível obter quantidades equivalentes ou semelhantes de transcritos (Figura 7).

Isto pode ser justificado pelas técnicas de sequenciamento de nova geração usadas e que geram tamanhos e rendimentos de leituras diferentes.<sup>(192)</sup> As *reads* dos transcriptomas de *A. cajennense* s. l., *A. parvum*, *A. triste*, de 1 transcriptoma de *A. maculatum*, 6 de *D. andersoni* e 8 transcriptomas de *D. variabilis* foram lidas por pirosequenciamento na plataforma 454 GS FLX, enquanto que as leituras de 26 transcriptomas de *D. andersoni* foram sequenciadas com a tecnologia Ion Torrent®. Apesar do maior tamanho, o rendimento médio de todas essas *reads*, no entanto, foi menor do que a quantidade de leituras das demais amostras e espécies sequenciadas nas plataformas Illumina® HiSeq ou NextSeq.

Além disso, não importa alcançar o número mínimo necessário de transcriptomas que represente a quantidade global de RNAs codificantes de determinado sítio corporal, se estes transcriptomas apresentarem grande proporção de leituras sequenciadas com qualidade insatisfatória ou alguma etapa prévia ao sequenciamento tenha sido comprometida, a ponto de terem ocorrido perdas na captura de grande parte das sequências nucleotídicas. Ou seja, isto acarreta em menor diversidade de sequências

ou transcritos montados a partir de uma mesma amostra. Neste trabalho, com exceção das sequências brutas de *A. cajennense* s. l., de *A. parvum* e de *A. triste*, entre 20 (*A. sculptum*) - 100% (*A. aureolatum*) dos transcriptomas em FASTQ das outras espécies de vetores apresentaram sequências brutas com grandes regiões com qualidade de chamada de base regular ou ruim, a ponto de 20% ou mais *reads* serem filtradas (retiradas) na remontagem *de novo*.

Sendo assim, apesar de haver poucos transcriptomas de *A. parvum*, *A. triste* e *A. cajennense* s. l. para representar quantidade aparentemente suficiente de proteínas salivares/intestinais desses vetores, é possível concluir que estes tiveram a maior frequência relativa de sequências brutas aproveitadas na remontagem. Por fim, devemos destacar o rendimento considerável de novas sequências formadas para todas as espécies ao ser aplicada, novamente pelo nosso grupo de pesquisa,<sup>(84)</sup> pela segunda vez, a metodologia multi-kmer na montagem de transcriptomas de artrópodes. Assim como no trabalho anterior, foi possível gerar aproximadamente 2-100 vezes mais transcritos (remapeados não aleatoriamente) do que as quantidades de ESTs de outros autores, disponibilizadas no NCBI.

Também é possível perceber que, com o método multi-kmer, até 40% das sequências ESTs puderam ser reduzidas para formar transcritos maiores ou completos (Figura 7). Em todo caso, muitos dos transcritos formados são decorrentes de RNAs de microrganismos que perfazem a microbiota das glândulas salivares e do intestino (Figura 8), haja visto foram filtradas as sequências codificantes desses organismos, nas quais estão contidas aproximadamente entre 22-69% das sequências antigênicas extracelulares e de membrana encontradas nesses sítios (Tabelas 3, 4 e 5).

## 6.2 ASPECTOS PREDITIVOS DO REPERTÓRIO DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS SELECIONADAS

Ao avaliar as sequências proteicas de antígenos de carrapatos sabidamente conhecidas e citadas na literatura por meio dos modelos eucarióticos de predição antigênica em parasitos ou protozoários, tais modelos apresentaram as maiores taxas de sensibilidade, sendo a maior aquela decorrente da positividade obtida em qualquer um dos modelos (Figura 9). Até então, tal análise não havia sido descrita na literatura e muitos trabalhos não costumam relatar nem o modelo empregado.<sup>(193)</sup>

Sabe-se que o VaxiJen já foi usado para a predição de alvos em *R. microplus*, ao ser aplicado o modelo eucariótico voltado para protozoários com probabilidade preditiva  $> 0,7$ .<sup>(153)</sup> Adotando este valor, foi possível predizer apenas 566 antígenos de diferentes localidades teciduais e celulares desta espécie de carrapato, contendo possivelmente antígenos homólogos ao hospedeiro analisado. Para *Rhipicephalus bursa*, foi possível filtrar 267 antígenos salivares, não homólogos ao hospedeiro e de origem

membranar ou extracelular.<sup>(194)</sup> Contudo, de acordo com a Figura 9, verificamos que diversos alvos conhecidos também podem ser encontrados com menor valor de probabilidade, independente do modelo empregado. Além disso, quando os modelos em questão são combinados, os valores de probabilidade das sequências sabidamente antigênicas são maiores.

Apesar do número crescente de antígenos de carrapatos descritos literariamente, nossos resultados evidenciaram que ainda podem existir centenas ou milhares de antígenos extracelulares ou de membrana das espécies transmissoras de FMA a serem estudados com relação à estrutura e aos efeitos na imunologia do hospedeiro vertebrado. É possível que, entre eles, também existam sequências de isoformas diferentes, cuja variação faz com que a diferença de identidade entre elas ultrapasse em torno de 5%. Outra contribuição do nosso trabalho foi a predição de proteoma para *D. variabilis*, ainda ausente na base de dados do NCBI (Tabela 3).

Em contrapartida à enorme quantidade de antígenos extracelulares ou de membrana, no mínimo 75% destas proteínas de cada espécie podem ser aplicadas diretamente no hospedeiro, cujo risco de inoculação de alérgenos é muito baixo. Além disso, para se ter uma ideia, verificamos que 31% das sequências sabidamente antigênicas (Figura 9) possuíam alergenicidade positiva indicada pelo AllerTOP e mesmo assim essas talvez não causem alergias.

Por outro lado, sequências com risco ainda maior de serem alergênicas parecem ser aquelas ortólogas aos alérgenos do AllerBase. Felizmente, estão presentes em somente até 5% do total de sequências antigênicas de cada espécie. Em todo caso, ainda seria possível identificar e testar epítomos dessas sequências e desvinculá-los de regiões que possam desencadear reações alérgicas significativas ao indivíduo.<sup>(187)</sup> A união de alguns desses epítomos pode ser realizada em vacinas multiepítomos, que também já mostraram efetividade imunoprotetora em bovinos contra carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e resultados *in silico* promissores considerando outros alvos.<sup>(193)</sup>

Interessante observar que apenas 2,4% dos antígenos sabidamente conhecidos de carrapatos tiveram homologia com proteínas classificadas como essenciais a artrópodes. Valores próximos dessa porcentagem (1,6-4,8%) também se enquadram para as sequências antigênicas preditas dos transmissores de FMA avaliados. Aparentemente, muitas proteínas dos carrapatos ainda precisam ser inseridas ao banco de proteínas de artrópodes do DEG e necessitam ser investigadas quanto à possibilidade da presença das mesmas ser crucial para a sobrevivência destes invertebrados.<sup>(195)</sup>

Já em relação aos agentes causadores de FMA, as proteínas essenciais antigênicas possuem maior frequência relativa em relação ao total de antígenos extracelulares ou de membrana (Tabela 7). No entanto, a frequência relativa média de proteínas antigênicas previstas caiu pela metade comparada à frequência de sequências antigênicas dos vetores de FMA. Esta drástica redução pode ser devida à menor quantidade

de peptídeos expostos ao meio extracelular por um único tipo celular procariótico do que por muitos tipos de células eucarióticas presentes nos órgãos investigados dos vetores.

Comparado aos antígenos preditos dos carrapatos, essas riquetsias mostraram praticamente a mesma frequência relativa de sequências com características aparentemente alergênicas. Porém, o risco de aparecimento de alergias parece ser muito baixo, uma vez que não houve nenhuma homologia a sequências de alérgenos sabidamente conhecidas. Esse risco não deve ser confundido com a existência, em média, de 25% das sequências antigênicas que corresponderam a fatores de virulência e alguns destes alvos serão discutidos mais adiante.

### 6.3 CANDIDATOS UNIVERSAIS DESTACADOS PARA ENSAIOS DE COMBATE À FMA

Conforme visto, diversos candidatos vacinais foram levantados para cada espécie de vetor e de agente causador de FMA, e podem ser efetivos para complementar as respostas imunológicas que conhecemos contra esses seres. Entretanto, em decorrência do encontro de muitos alvos conservados entre as espécies envolvidas (Figuras 10 e 11), foram destacados aqueles com maior antigenicidade nesta discussão (Tabelas 6 e 8). Além disso, para melhor compreensão do texto, tais alvos foram reunidos e discutidos em seções comuns, de acordo com a localização dos mesmos.

#### 6.3.1 Candidatos secretados pelas glândulas salivares de vetores parasitiformes

Durante o repasto sobre o hospedeiro, o fluxo sanguíneo em direção ao invertebrado hematófago não extravasa e é mantido em decorrência do cimento formado na região da picada, o qual é constituído por proteínas ricas em glicina.<sup>(142)</sup> Com pelo menos 90% de antigenicidade, até 5 dessas proteínas puderam ser expressas nos vetores de FMA.

Uma delas foi expressada transcricionalmente pelo *D. andersoni* e *R. sanguineus*, com características de sequência semelhante à proteína do cone do cimento RIM36 de *R. appendiculatus*. Conforme observado em cabras, a aplicação da RIM36 é capaz de induzir resposta humoral que leva aproximadamente 20% das fêmeas adultas à morte.<sup>(196)</sup>

Das proteínas do cimento, a 64P é encontrada conservada no gênero *Ixodes* e em outras espécies e é capaz de simular uma proteína própria da pele dos mamíferos, para evitar a rejeição do contato do carrapato com o hospedeiro. Tal é importante a sua presença que outros estágios de desenvolvimento do vetor também podem expressá-la.<sup>(197)</sup> No entanto, dentre aquelas 5 sequências proteicas citadas, de antigenicidade

alta, apenas o *A. variegatum* apresentou expressão de uma proteína do cimento semelhante à 64P.

No geral, assim como com a inoculação de antígenos salivares expostos em modelo animal,<sup>(132)</sup> imunizar hamster, cobaia e coelho com certas sequências recombinantes de 64P pode fazer (ou favorecer) com que o carrapato seja desafixado da superfície do hospedeiro, ao proporcionar a ocorrência de reação cutânea de hipersensibilidade tardia nesses animais em um próximo contato com o vetor.<sup>(197)</sup> Dessa forma, proteínas do cimento podem contribuir indiretamente para reduzir a prevalência de infectados, pois quanto menor a exposição – o contato entre parasito e hospedeiro – menor a chance de transmissão de agentes infecciosos entre eles.

Em camundongos imunizados com 64P recombinante, ainda foi possível ser bloqueada a infecção do vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (TBEV) ao animal, diante do enfraquecimento do efeito da imunossupressão na região da picada. A morte dos invertebrados também é certa e chega a 80% da população infestante com a 64P e de 40-56% da população de larvas e ninfas com outra proteína do cimento, a p29, que também é capaz de promover a redução do peso dos adultos alimentados.<sup>(132, 198)</sup>

De 3 a 12 proteínas ricas em glicina, mas provenientes de estruturas rígidas como de paredes celulares, também se mostraram muito antigênicas e, na literatura, não observamos estudos que explorassem o papel das mesmas na resposta imune do hospedeiro. Apesar de indicarmos essas proteínas como alvos a serem investigados em decorrência da alta antigenicidade que apresentaram, por outro lado existem pessoas que podem desenvolver desordens autoimunes e alergias diante desta classe de proteínas obtidas por meio da alimentação.<sup>(199)</sup>

No caso das proteínas dos carrapatos, de parede celular e ricas em glicina, foi verificado que apenas 3 talvez sejam alergênicas a depender da espécie, apesar de não haver alérgeno homólogo conhecido. Percebe-se que, dentre as proteínas ricas em glicina (Tabela 6) – seja do cimento, seja de parede celular ou mesmo as duas secretáveis não pertencentes aos grupos anteriores –, a maioria foi anotada a *matches* da mesma família, ainda pouco estudados ou desconhecidos. Certas proteínas de carrapato ricas em glicina possuem semelhança com domínio de queratina e foi encontrada uma sequência similar à Queratina 19 de célula epitelial passível de ser estudada.<sup>(200)</sup>

Certos peptídeos ricos em glicina, como as ctenidinas, ou ricos em histidina são considerados antimicrobianos e ajudam a controlar não só a população bacteriana como a fúngica nos artrópodes.<sup>(201, 202)</sup> No *R. sanguineus*, foram encontradas duas sequências proteicas semelhantes à ctenidina 3 de aranha ou similares à proteína de *D. silvarium* que é semelhante a esta ctenidina. Já nos *A. aureolatum* e *A. sculptum*, foi encontrada uma sequência com alta antigenicidade semelhante à proteína secretada 75 de *A. triste* rica em histidina.

Apesar de observadas em poucos vetores de FMA, essas sequências proteicas estão contidas em grupos de ortólogos também formados por outras das demais espécies. Contudo, estas outras podem ter anotações distintas mas ainda pertencerem à mesma classe proteica, ou podem ter valores de probabilidades antigênicas que se diferem, a tal ponto que determinadas sequências não chegaram a alcançar pelo menos 0,9.

Conforme visto em relação ao equilíbrio parasito-hospedeiro, a inibição de respostas antimicrobianas pode ser prejudicial ao ectoparasito. No entanto, não se sabe se tal inibição pode favorecer o desenvolvimento do agente bacteriano causador de FMA ou o crescimento de outras bactérias competitivas às riquetsias. Além disso, certas glicoproteínas ricas em histidina podem inibir determinados componentes da resposta imune inata do vertebrado.<sup>(203)</sup> Sendo assim, a imunomodulação sobre peptídeos semelhantes a glicoproteínas ou a proteínas antimicrobianas ricas em glicina/histidina deve ser explorada, para desvendar os efeitos decorrentes na transmissão de riquetsioses.

Participando possivelmente também no controle bacteriano, as mucinas secretadas nas glândulas salivares revestem e protegem as estruturas intrabucais, ao interagir com a matriz extracelular adjacente e são expressadas principalmente durante a hematofagia.<sup>(204, 205)</sup> Destacamos uma sequência não alergênica, altamente anti-gênica e semelhante às mucinas 68d e 22 no *A. maculatum*, cuja resposta imune desencadeada talvez desestabilizaria a homeostase local e permitiria a atuação de outras moléculas imunológicas do vertebrado sobre a matriz do carrapato.

Contribuindo para a atividade anti-hemostática, uma metaloprotease salivar desconhecida com alta antigenicidade foi expressada em *D. variabilis* e faz parte de grupo ortólogo juntamente com proteínas das demais espécies transmissoras de FMA. Sabe-se que essa família proteolítica é capaz de atuar contra a agregação plaquetária e a favor da fibrinólise, cuja inibição de sua atividade pode chegar a impedir o repasto no vertebrado.<sup>(206)</sup>

Além disso, a imunização com certos inibidores de protease com domínio Kunitz pode reativar ou facilitar a atuação das vias do complemento do hospedeiro sobre as células do vetor e possivelmente causar a morte de pelo menos 70% das ninfas sobre camundongos, conforme observado contra *A. sculptum*.<sup>(207)</sup> Aqui, encontramos 7 sequências altamente antigênicas com este domínio no *A. americanum*.

Também impreterível para a sobrevivência, a proteína de lóbulo óptico terrivelmente reduzido possui diversas funções descritas para *Drosophila melanogaster*. Na embriogênese deste inseto, auxilia o desenvolvimento epitelial e da matrix extracelular. E na fase adulta, continua a contribuir para a manutenção e a replicação das células tronco hematopoiéticas. Sua expressão já foi evidenciada nos testículos e ovários, assim como na cabeça e no corpo gorduroso adjacente a glândula salivar desta espécie.<sup>(208)</sup>

Essa proteína também atua em via Wnt de desenvolvimento do inseto, assim como a proteína Pygopus.<sup>(209)</sup> Apesar de supostamente agirem da mesma forma nos demais artrópodes, não foram encontrados estudos que relataram as funções dessas proteínas em carrapatos. Entretanto, em nosso trabalho, foi possível evidenciar até duas sequências similares a cada proteína. Estas sequências altamente antigênicas foram expressadas na glândula salivar ou no intestino e uma delas similar à de lóbulo terriavelmente reduzido é passível de ser essencial para a sobrevivência do vetor.

Entre os alvos mais evidentes de serem expressados nas glândulas salivares, ainda foram encontradas outras sequências proteicas, mas com funções desconhecidas. Dentre elas, até 3 sequências de peptídeos anotados como secretados das glândulas salivares, até 3 sequências anotadas como associadas a essas glândulas, além de até 8 peptídeos ditos como contendo repetições de PAPA podem ser expressos, mas cujas sequências de carrapatos não apresentam evidentemente as repetições de prolina/alanina encontradas em proteínas contendo PAPA box.

Podendo ser expressadas tanto nas glândulas salivares como no intestino, ainda existem até 13 sequências não caracterizadas, até 17 anotadas como hipotéticas e até 8 desconhecidas, sendo destas uma classificada como essencial para o vetor. Uma sequência semelhante ao fator de transcrição glandular da seda 1 não permite dizer qual seria sua função de fato e também merece ser investigada.

### **6.3.2 Candidatos membranares e de superfície de vetores parasitiformes expostos ao contato sanguíneo do vertebrado**

Dentre as prováveis proteínas de membrana, destaca-se uma sequência com peptídeo sinal, mas anotada como receptor de vitelogenina e com essencialidade positiva a depender do vetor. Nos carrapatos, tal receptor converte a vitelogenina em vitelina e direciona este produto proteico aos oócitos. Este produto é fonte de nutrição à prole, pois dá suporte ao desenvolvimento, sobrevivência e fecundação.<sup>(210)</sup> Com isso, é importante ser explorado se hospedeiros imunizados contra o receptor podem ser impedidos de formar adequadamente novos indivíduos e, dessa forma, talvez sejam incapazes de transmitir verticalmente agentes de FMA.

Além do receptor de vitelogenina, outras proteínas de membrana nos carrapatos possuem domínios similares aos de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Dentre elas, foram identificadas até 12 sequências sem função conhecida, porém até 7 destas apresentaram essencialidade positiva e alergenicidade negativa. Dessa forma, são alvos válidos que ainda não foram testados em modelos animais.

Outras proteínas que também possuem domínios LDL são os receptores de lipoforinas, os quais são capazes de se ligar e direcionar moléculas lipídicas para serem distribuídas aos diversos tecidos dos artrópodes. A exemplificar, ensaios com anticorpos conseguiram demonstrar o bloqueio do transporte dos lipídios do trato intesti-

nal, que seriam levados ao corpo gorduroso e aos ovários em *D. melanogaster*.<sup>(211)</sup> Em carrapatos, também não foram divulgados estudos vacinais com esses receptores, mas indicamos até 7 sequências altamente antigênicas e promissoras, sendo até 3 consideradas essenciais para o vetor.

Dentre outros alvos possivelmente membranares, foram encontradas sequências com alta antigenicidade anotadas a proteínas relacionadas a cutícula ou quitina,<sup>(212)</sup> a fibras e matriz extracelular, contendo domínios de elastina, de colágeno ou de proteoglicano de sulfato de heparan, importantes para serem investigados quanto à possibilidade de indução de resposta imune que desestruture e cause a ruptura da barreira local. Além de permitir a entrada de TBEV e de outros vírus na célula hospedeira, molécula específica desta última família pode ser ancorada por uma serpina que tenha funções anticoagulante, anti-hemostática e anti-inflamatória e pode ser que tais atividades sejam reduzidas na ausência deste tipo de proteoglicano.<sup>(213)</sup>

A família de proteínas de domínio C do fator único de von Willebrand (SVWC) também podem atuar na defesa contra bactérias e vírus nos artrópodes. Atuam possivelmente como receptores de ligação aos agentes, para que ocorra a fagocitose dos hemócitos.<sup>(214)</sup> Com alta antigenicidade, foi encontrada uma sequência contendo domínio semelhante desta família, cuja imunomodulação talvez acarrete em efeitos semelhantes à inibição da atuação dos antimicrobianos, conforme mencionado.

Outras prováveis sequências proteicas de membrana também foram apontadas, mas suas prováveis funções não puderam ser inferidas. Foram destacadas uma sequência similar a um autotransportador desconhecido, uma sequência semelhante à nucleoporina 62 de poro nuclear, até 4 sequências conservadas indefinidas e 1 sequência anotada como hipotética.

No hospedeiro, a diferença de antigenicidade encontrada entre alvos conservados entre espécies de carrapatos pode explicar por que determinada proteína de uma espécie causa efeito imunoprotetor considerável contra este mesmo artrópode, enquanto a proteína equivalente de outro carrapato não causa tamanho efeito contra este respectivo vetor. Essa diferença depende das estruturas primária e secundária, assim como das modificações nucleotídicas e pós-traducionais quando existentes que alteram certas propriedades da proteína. Essas alterações podem impactar na ligação de anticorpos, na ativação de células imunológicas efectoras e de memória.<sup>(215, 216)</sup>

Predominantemente importantes para conceder imunoproteção ou bloquear a transmissão parasitária em bovinos, os determinantes de carboidratos e os epítomos glicosilados estão presentes em diversas proteínas do intestino de *R. microplus*, incluindo possivelmente naquelas ainda desconhecidas.<sup>(217, 218, 219, 220)</sup> Podem também existir nas proteínas intestinais analisadas dos vetores de FMA, em vista da alta antigenicidade que apresentaram. A exemplificar, o glicótopo conservado MG96 em *D. variabilis* e em *Ixodes sp.* pode ser detectado por um anticorpo monoclonal anticarboidrato e

bloqueador da transmissão do *Plasmodium falciparum*.<sup>(132)</sup>

Conforme mencionado, existem fatores imunomodulatórios que participam da SAT. Porém, estes variam em diversidade e quantidade, a depender das espécies de patógeno e de vetor envolvidas. Apesar de serem menos frequentes os fatores universais dentre os alvos vacinais,<sup>(132)</sup> nossos resultados sugerem que sequências homólogas podem também desempenhar imunoproteção a ser investigada no hospedeiro vertebrado. Algumas delas ainda podem fazer parte do conjunto de antígenos ocultos presentes no intestino ou em outros órgãos dos carrapatos, caso também sejam expressadas nestes.

Assim como visto em *A. americanum*, determinados anticorpos ingeridos podem atravessar ou serem transferidos da barreira intestinal para a hemocele,<sup>(221, 222, 223)</sup> interagir com antígenos de órgãos internos e causar dano local.<sup>(224, 225)</sup> Entretanto, tal tipo de resposta não é tão eficiente devido ao sistema de excreção de imunoglobulinas que os carrapatos apresentam, o qual é capaz de controlar e excretar os anticorpos já diretamente na saliva.<sup>(226)</sup> Por outro lado, proteínas desse sistema também podem ser alvos vacinais importantes de desativação e para aumentar a efetividade do alcance da resposta imune do hospedeiro vertebrado no invertebrado.<sup>(132)</sup>

### 6.3.3 Candidatos dos agentes bacterianos

Dentre os antígenos conservados das riquetsias, foram encontradas 9 sequências secretáveis ou extracelulares, 5 supostamente secretáveis e 7 de membrana celular. Sendo assim, é interessante destacar que a proporção de sequências de membrana em relação às secretáveis ou de superfície extracelular é maior nos agentes do que nos vetores de FMA. Isto talvez possa ser justificado pela quantidade de moduladores imunológicos que o carrapato apresenta e dos quais o agente bacteriano faz aproveitamento funcional, a fim de produzir menor diversidade de fatores secretáveis necessários para o processo infeccioso.

Alguns deles altamente antigênicos, já conhecidos e considerados promissores, como o OmpB, OmpW e duas sequências de porinas, alertam para a possibilidade de causarem imunorreação a certos gêneros bacterianos benéficos à flora intestinal humana, em decorrência da homologia de sequência identificada. No entanto, o risco deve ser baixo, visto que não ocorreu predomínio de um gênero específico e resultados complementares indicaram baixa identidade de sequência entre as proteínas homólogas encontradas (dados quantitativos não mostrados).

A subunidade beta (B') do complexo F1 de ATPase transmembranar também mostrou estar conservada entre os agentes de FMA. Apresentou antigenicidade e essencialidade positivas para o microrganismo. Alguns antibióticos, como as oligomicinas, são inibidores desta ATP sintase e podem interagir direta ou indiretamente com esta subunidade. Das oligomicinas, os macrolídeos já se mostraram efetivos contra al-

gumas riquetsias, o que indica que esta subunidade ainda não estudada como alvo vacinal nessas bactérias pode gerar resposta imune efetiva para ajudar a evitar ou a controlar a infecção no hospedeiro. <sup>(227)</sup>

Em carpas, apesar de ser pouco efetiva contra *Flavobacterium columnare* ao considerar seu efeito por si só e a sequência de aminoácidos primária desta espécie, por outro lado contribuiu para a formação de resposta T<sub>H</sub>1. <sup>(228)</sup> O *knockout* da região produtora de todas as subunidades de F0 e F1 tornou os indivíduos bacterianos subsequentes menos virulentos e capazes de serem usados na imunização de camundongos, que apresentaram proteção completa à *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. <sup>(229)</sup>

Chaperonas desintoxicadoras de cobre podem estar localizadas no espaço periplasmático bacteriano e são exploradas nas células eucarióticas como alvos de inibição para o combate quimioterápico de tumores. <sup>(230, 231)</sup> Durante infecções bacterianas, a concentração deste metal no soro do hospedeiro é elevada, para que o cobre possa atuar na geração de reativos de oxigênio e agregados proteicos nas bactérias, além de complementar a atividade fagolítica dos macrófagos. <sup>(232)</sup> Também ainda não explorada contra patógenos bacterianos, a chaperona PCu(A)C conservada entre os agentes de FMA pode ser um alvo importante neste processo e a resposta imune decorrente de sua exposição talvez desequilibre o balanço dos íons de cobre dentro destes procaríotos.

Dentro do contexto de sensibilização bacteriana a altas concentrações danosas de químicos específicos, também foi possível evidenciar uma sequência antigênica de dioxigenase, família esta responsável por degradar compostos aromáticos e fenólicos do meio adjacente. <sup>(233)</sup> No caso das riquetsias, raramente é sabido a respeito de suas dioxigenases produzidas. A saber, é possível destacar a dioxigenase fitanoil-Coa que é capaz de sintetizar antibiótico, <sup>(234)</sup> possivelmente contra demais bactérias competitivas. Sendo assim, a resposta contra a dioxigenase encontrada talvez dificulte a sobrevivência dos agentes de FMA diante de antimicrobianos aromáticos ou outras drogas de tratamento complementar, ou diante de outros microrganismos também presentes no vetor.

Diversas enzimas bacterianas são hidrolases que degradam ou catalizam moléculas produzidas e estruturas nas células eucarióticas, com o objetivo de promover a invasão e a nutrição parasitária. <sup>(235)</sup> Nas riquetsias, são estudadas principalmente as hidrolases metabolizadoras de nucleotídeos, e de lipídeos para a formação do envoltório membranar bacteriano durante a entrada ou quando já estão estabelecidas nas células hospedeiras. <sup>(236, 237)</sup> No entanto, apenas uma sequência de hidrolase alfa/beta indeterminada foi encontrada conservada entre os agentes de FMA, passível de ser secretada no meio extracelular.

Foram considerados antígenos conservados outras proteínas não especificadas,

mas com família proteica definida. Dentre elas, foram identificadas três sequências com domínios de função desconhecida (DUF), possivelmente secretáveis, não alergênicas e não homólogas a outras de espécies benéficas intestinais. Apesar de aparentemente não serem essenciais para as riquetsias, essas sequências proteicas também talvez contribuam para aumentar a efetividade da resposta imune contra esses agentes.

Até então, essas sequências – e outras discutidas a seguir – não haviam sido identificadas pelo nosso grupo de pesquisa, dentre os alvos comuns entre as várias espécies de riquetsias patogênicas ao homem.<sup>(108)</sup> Usando a ferramenta String v11.5,<sup>(238)</sup> duas destas sequências com domínio DUF estavam envolvidas em vias enzimáticas de catabolismo, enquanto a remanescente, relacionada a via de fatores nucleares (dados não mostrados).

Ainda com o String, a sequência essencial contendo domínio Yjbl comunicou-se ou esteve contida na mesma via aonde se encontrou a chaperona SurA, que dá suporte à montagem de Omps. Em *Bacillus subtilis*, a atividade peroxidativa da proteína Yjbl protege a bactéria do estresse oxidativo local e proteínas contendo tal domínio podem ser expressadas a partir da mesma região gênica aonde são expressas as proteínas do sistema de secreção do Tipo IV.<sup>(239, 240)</sup> Sendo assim, destacamos a combinação imunoprotetora entre as sequências de chaperona de cobre PCu(A)C e de domínios de repetição Yjbl a ser explorada quanto à possibilidade de comprometer as estruturas das proteínas intracelulares do agente de FMA de forma generalizada, por oxidação e por montagem inadequada.

Já a sequência proteica de membrana possuidora de domínio RDD (arginina – aspartato – aspartato) também apresentou antigenicidade e essencialidade positivas, e mostrou estar em comunicação tanto com fatores nucleares, como também com proteínas do sistema de secreção do Tipo IV. Por outro lado, uma proteína de *Halobacillus andaensis* com domínio RDD mostrou atividade antiporte de  $\text{Na}^+(\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ ,<sup>(241)</sup> o que podemos suspeitar que a sequência RDD conservada entre os agentes de FMA talvez participe do transporte de íons ou de moléculas intracelulares específicas para o meio externo.

A proteína membrana do locus B associado à invasão também pode ser considerada um antígeno promissor. Essa proteína possivelmente auxilia nos mecanismos de invasão celular juntamente com o sistema de secreção, assim como observado na infecção por bactérias do gênero *Bartonella*.<sup>(242)</sup> Por meio desse sistema – formado por subunidades proteicas – proteínas simples ou complexadas a outras (ex: toxinas) ou a nucleotídeos (nucleoproteínas) são liberadas às células hospedeiras ou a outras bactérias, com a finalidade de causar dano ou disponibilizar genes de resistência a antibióticos. No hospedeiro invertebrado, a invasão celular pela riquetsia, assim como a aquisição sanguínea pelo carrapato podem fazer com que a expressão de genes de

proteínas formadoras desse sistema seja elevada.<sup>(93)</sup>

Dentre as subunidades, a VirB3 dos agentes de FMA mostrou-se conservada e antigênica. Pode ser um alvo promissor para dificultar a transferência de material genético a outras bactérias e a liberação de fatores de virulência, uma vez que participa da estabilização intramembranar desse complexo de subunidades.<sup>(243)</sup>

O sistema de secreção também pode se apresentar em balsas lipídicas. Essas balsas contém estomatinas, proibitinas, flotilinas, além de outras proteínas de sequência similar como aquelas da família NfeD – Eficiência de Formação de Nodulação D – que possivelmente estabilizam o complexo estrutural proteico; porém também são pouco conhecidas funcionalmente. Uma proteína desta família esteve conservada, apresentou antigenicidade positiva e a indução de resposta por este alvo talvez contribua para desestabilizar a membrana bacteriana em pontos importantes não só onde estão presentes sistemas de secreção, mas também outras moléculas permissivas de tráfego de íons e de macromoléculas.<sup>(244)</sup>

Outra provável proteína classificada como um fator de virulência apresentou identidade considerável ao precursor de antígeno de superfície RT0821 da *R. typhi* e à proteína Lpp0805 da *Legionella pneumophila*, ambos com aproximadamente 17 KDa. Apesar de tais proteínas ainda não possuem funções definidas, aquela conservada entre os agentes de FMA possuiu envolvimento com a via de transglicosilase secretável e pôde ser anotada como um antígeno de superfície de riquetsia no String. Caso seja importante para a formação da parede celular bacteriana promovida por transglicosilase, a resposta imune contra este fator poderia contribuir para facilitar a entrada e a ação de antibióticos.<sup>(245)</sup>

Também não exploradas em estudos anteriores, foram encontradas uma sequência extracelular contendo domínio de repetição relacionado à esporulação (SPOR) – ou seja, cuja proteína relacionada pode ter função moduladora sobre o biparticionamento que ocorre durante a divisão celular –,<sup>(246)</sup> uma sequência membranar essencial com domínio de homologia Src 3, que interage com motivos ricos em prolina, possivelmente pertencendo a um receptor indeterminado,<sup>(247)</sup> além de uma proteína membranar hipotética, cuja função ainda não foi explorada ou definida, mesmo ao tentar inferi-la por predição *in silico*.

#### 6.4 PERSPECTIVA DA APLICAÇÃO DE OUTRAS ESTRATÉGIAS VACINAIS COM CANDIDATOS PROTEICOS PROSPECTADOS

Certas técnicas de imunização baseiam-se na entrega necessária do antígeno ao citoplasma das células apresentadoras de antígenos (APCs). Dentre elas, podemos destacar a captura do DNA recombinante pelas células musculares e monócitos, capazes de realizar a expressão transcricional do alvo e a expressão de epítomos por MHC

I. Esse mecanismo já foi explorado para a expressão de certos segmentos de OmpA e de OmpB de *R. conorii*,<sup>(94)</sup> e também pode ser útil para a expressão de epítomos fora das regiões de aminoácidos alergênicas.

Com vacinas a base de RNAm, é possível evitar a incorporação permanente do DNA do agente ou do vetor ao genoma do hospedeiro e a produção de imunoglobulinas anti-DNA que possam causar resposta autoimune no vertebrado. Além disso, o RNAm pode ser complexado a adjuvantes proteicos e gerar respostas, via TLRs 3 e 7, diretamente contra o respectivo transcrito expresso pelas bactérias. No entanto, essa abordagem interessante ainda necessita ser testada contra as riquetsias.<sup>(94)</sup>

Também não testadas contra riquetsias são as vacinas a base de vetores adenovirais incapazes de replicar, mas que podem introduzir o material genético dentro das células hospedeiras para a produção antigênica. Sabemos que certas vacinas contra SARS-Cov2 mostraram-se eficazes, sendo promissor a aplicabilidade de vetores humanos com epítomos bacterianos. Ou, a fim de evitar anticorpos pré-existentes do hospedeiro contra esses tipos vetoriais que geralmente já se encontram na microbiota do organismo, é possível usar vetores adenovirais de primatas.<sup>(94)</sup>

Conforme visto, respostas decorrentes de linfócitos CD4+ e linfócitos B também são necessárias para controlar a FMA e qualquer combinação de abordagens de vacinação parece ser positiva para induzir imunoproteção subsequente cada vez mais eficaz.<sup>(94)</sup> A combinação também pode ser decorrente do uso de múltiplos epítomos diferentes e os novos alvos aqui apresentados podem fornecer novas opções úteis para aperfeiçoar a imunidade do hospedeiro.

Um próximo passo importante para a seleção adequada de candidatos dos vetores será avaliar seus níveis de expressão gênica diante da presença parasitária no carrapato. Ao avaliarmos aqueles que são expressos, poderemos selecioná-los e prospectar ou testar a resposta imunológica desencadeada no vertebrado. Uma vez identificados os respondedores, seus epítomos poderão ser destacados e combinados com epítomos de respondedores do respectivo agente de FMA transmitido. Nesse sentido, estruturas multiepítomos entre bactéria-vetor poderão ser geradas.

Aparentemente, essa abordagem não tem sido explorada nos estudos entre artrópodes e patógenos, mas percebe-se o seu potencial em gerar imunoproteção aprimorada contra a FMA. Haja visto, a imunoindução por certos antígenos vetoriais como a Subolesina de *R. microplus*, por si só, pode interromper a transmissão de *A. marginale* e *Babesia bigemia* do carrapato ao vertebrado, enquanto outros são investigados pelo mesmo potencial diante de outros agentes etiológicos, como as metaloproteases Metis 1 e 2 de *I. ricinus* contra *B. burgdorferi*, as cistatinas HISC-1, HLcyst-2 e HLcyst-3 de *H. longicornis*, além de om-cystatin 1 e om-cystatin 2 de *Ornithodoros moubata* contra *B. burgdorferi* e *Babesia gibsoni*; e a voxarina rAhEF de *Amblyomma hebraeum* contra a transmissão geral de patógenos via transovariana.<sup>(248)</sup>

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que existem dezenas ou centenas de segmentos antigênicos conservados, e milhares de outros segmentos proteicos não conservados entre as espécies de carrapatos ou de riquétsias causadoras de FMA e, a princípio, possuem baixo risco de gerar resposta imune indevida contra bactérias presentes no intestino humano e benéficas ao mesmo. Com base na quantidade de transcritos gerados, inferimos que a metodologia de alto rendimento empregada pôde ter contribuído com até centenas de vezes mais alvos do que se supõe encontrar na literatura – principalmente para as espécies *A. americanum* e *D. andersoni*. A existência de tais antígenos poderá ser validada por técnicas de Biologia Molecular, como PCR e Western Blot.

Dentre os alvos salivares ou intestinais potencialmente envolvidos na hematofagia dos vetores de FMA, foram destacados segmentos proteicos conservados e capazes de compor estruturas do organismo, como o hipostômio e a cavidade bucal, e o cemento. Além disso, esses segmentos também foram relacionados a moléculas protetoras passíveis de revestir internamente essas estruturas, a receptores que participam indiretamente da absorção de nutrientes lipídicos no intestino, a moléculas antihemostáticas e antimicrobianas que também talvez favoreçam a instalação e a transmissão dos agentes infecciosos resistentes, respectivamente, nos vetores e no homem.

Outras proteínas conservadas, ao mesmo tempo altamente antigênicas e potenciais para a transmissão de SFGRs não foram identificadas. Mas os antígenos de superfície OmpB e OmpW mostraram-se conservados e são alvos importantes a serem testados para interromper mecanismos de invasão celular em todos os agentes de FMA investigados, em conjunto com a proteína membrana do locus B e a VirB3, ambas relacionadas ao sistema de secreção do Tipo IV. Dentre os antígenos potenciais para a sobrevivência dessas bactérias, certas porinas, proteínas de estabilização de estruturas proteicas e da membrana plasmática, proteínas desintoxicadoras, e tanto a subunidade beta do complexo F1 da ATPase, como uma hidrolase alfa/beta estiveram conservados e são merecedores de investigação, na eventualidade de poderem gerar resposta que lese a bactéria por desequilíbrios osmótico, iônico e estrutural.

Considerando explorar dados ômicos complementares de certos carrapatos e agentes de FMA, ainda podem existir antígenos locais intraespecíficos a serem desvendados. Dessas proteínas, assim como encontrado aqui, muitas podem ter sido estudadas apenas em outros organismos ou suas funções podem ser desconhecidas. Mesmo diante de regiões alergênicas, pretendemos selecionar epítomos em regiões adjacentes, para gerar estruturas proteicas mescladas por peptídeos do agente e vetor correspondente. Como vacinas multiepítomos, poderão ser testadas em ensaios de bancada.

## REFERÊNCIAS

- 1 SZABÓ, M.; PINTER, A.; LABRUNA, M. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, 2013. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00027>>. Acesso em: 11-05-2022.
- 2 GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis: Brazilian spotted fever. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 14, p. 3–18, 2008. ISSN 1678-9199. Publisher: Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP). Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/jvatiid/a/h39Knv7GBn67k78cQxCn9ym/?lang=en>>. Acesso em: 21-04-2022.
- 3 MOO-LLANES, D. A. et al. Inferring the Potential Distribution of an Emerging Rickettsiosis in America: The Case of *Rickettsia parkeri*: Inferring the Potential Distribution of an Emerging Rickettsiosis in America. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 592, maio 2021. ISSN 2076-0817. Number: 5 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/5/592>>. Acesso em: 14-05-2022.
- 4 OSTERLOH, A. The neglected challenge: Vaccination against rickettsiae: The neglected challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, p. e0008704, out. 2020. ISSN 1935-2735. Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008704>>. Acesso em: 18-05-2022.
- 5 KARIM, S.; KUMAR, D.; BUDACHETRI, K. Recent advances in understanding tick and rickettsiae interactions. *Parasite Immunology*, v. 43, n. 5, p. e12830, 2021. ISSN 1365-3024.
- 6 CUNHA, J. M. et al. Immunization with LJM11 salivary protein protects against infection with *Leishmania braziliensis* in the presence of *Lutzomyia longipalpis* saliva. *Acta tropica*, v. 177, p. 164–170, jan. 2018. ISSN 0001-706X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348886/>>. Acesso em: 22-12-2022.
- 7 CLARK, L.; TAUBMAN, S.; STAHLMAN, S. Historical Review: Rickettsial Diseases and Their Impact on U.S. Military Forces. *Health.mil - The official website of the Military Health System*, Falls Church, VA, EUA, p. 18, jan. 2019. Disponível em: <<https://health.mil/News/Articles/2019/08/01/Rickettsial-Diseases-and-Their-Impact>>. Acesso em: 27-07-2021.
- 8 WOOD, H.; ARTSOB, H. Spotted Fever Group Rickettsiae: A Brief Review and a Canadian Perspective: Spotted Fever Group Rickettsiae. *Zoonoses and Public Health*, v. 59, n. s2, p. 65–79, 2012. ISSN 1863-2378. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1863-2378.2012.01472.x>>. Acesso em: 27-07-2021.
- 9 C, S. E. B.; TROYO, A. A review of the genus *Rickettsia* in Central America. *Research and Reports in Tropical Medicine*, v. 9, p. 103–112,

- jun. 2018. Publisher: Dove Press. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/a-review-of-the-genus-rickettsia-in-central-america-peer-reviewed-fulltext-article-RRTM>>. Acesso em: 28-04-2022.
- 10 MORAES-FILHO, J. Febre maculosa brasileira. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 15, n. 1, p. 38–45, jan. 2017. ISSN 2596-1306. Disponível em: <<https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/36765>>. Acesso em: 01-05-2022.
- 11 CDC (EUA). Other Spotted Fever Group Rickettsioses: Imported Spotted Fevers. *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People*, U.S. Department of Health & Human Services, Atlanta, Geórgia, EUA, p. 2, jan. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/other spotted fever/imported/index.html>>. Acesso em: 28-07-2021.
- 12 GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. A Patient from Argentina Infected with *Rickettsia massiliae*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 691–692, abr. 2010. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2844561/>>. Acesso em: 01-08-2021.
- 13 CDC (EUA). Other Spotted Fever Group Rickettsioses: For Health Care Providers. *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People*, U.S. Department of Health & Human Services, Atlanta, Geórgia, EUA, p. 5, mar. 2021. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/other spotted fever/healthcare-providers/index.html#\\_ftn1](https://www.cdc.gov/other spotted fever/healthcare-providers/index.html#_ftn1)>. Acesso em: 28-07-2021.
- 14 EUA. Controle Internacional de Doença Vetorial. Rocky Mountain Spotted Fever: Education, Public Health, Tick Management. *Vector Disease Control International*, Little Rock, Arkansas, EUA, p. 5. Disponível em: <<https://www.vdci.net/vector-borne-diseases/rocky-mountain-spotted-fever-education-and-tick-management-to-protect-public-health/>>. Acesso em: 28-09-2021.
- 15 CDC (EUA). Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF): Epidemiology and Statistics. *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People*, U.S. Department of Health & Human Services, Atlanta, Geórgia, EUA, p. 5, abr. 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/rmsf/stats/index.html>>. Acesso em: 28-07-2021.
- 16 CANADÁ. Agência de Saúde Pública. Infectious Substances – *Rickettsia rickettsii*. *Pathogen Safety Data Sheets*, Ottawa, Ontário, Canadá, p. 10, fev. 2011. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/rickettsia-rickettsii.html>>. Acesso em: 02-08-2021.
- 17 HERNÁNDEZ, G. Álvarez et al. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future: Rocky Mountain spotted fever in Mexico. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 6, p. e189–e196, jun. 2017. ISSN 14733099. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917301731>>. Acesso em: 15-11-2021.

- 18 VALBUENA, G. Fiebres que no deberían matar. *Biomédica*, v. 27, n. 3, p. 321–324, set. 2007. ISSN 0120-4157. Publisher: Instituto Nacional de Salud. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-41572007000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-41572007000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=es)>. Acesso em: 23-08-2021.
- 19 MONTEIRO, J. L. Estudos sobre o typho exanтемático de São Paulo. In: *Memórias do Instituto Butantan*. São Paulo, SP, Brasil: Instituto Butantan, 1932, (Tomo VI). p. 136. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.butantan.gov.br/arquivos/82/PDF/1.pdf>>. Acesso em: 23-08-2021.
- 20 BRASIL. Ministério da Saúde. Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses. In: *Guia de Vigilância em Saúde*. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília, DF, Brasil: [s.n.], 2016. v. 1, p. 425–435. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/31/GVS-Febre-Maculosa.pdf>>. Acesso em: 23-08-2021.
- 21 RIPOLL, C. M. et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 61, n. 2, p. 350–354, ago. 1999. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/61/2/article-p350.xml>>. Acesso em: 24-08-2021.
- 22 ROMER, Y. et al. Rickettsia parkeri Rickettsiosis, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 7, p. 1169–1173, jul. 2011. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381406/>>. Acesso em: 25-08-2021.
- 23 ZAVALA-CASTRO, J. E. et al. Human Rickettsialpox, Southeastern Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 10, p. 1665–1667, out. 2009. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866381/>>. Acesso em: 27-08-2021.
- 24 PEACOCK, M. G.; ORMSBEE, R. A.; JOHNSON, K. M. Rickettsioses of Central America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 20, n. 6, p. 941–949, nov. 1971. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/20/6/article-p941.xml>>. Acesso em: 27-08-2021.
- 25 KARPATY, S. E. et al. Rickettsia amblyommatis sp. nov., a spotted fever group Rickettsia associated with multiple species of Amblyomma ticks in North, Central and South America. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5236–5243, dez. 2016. ISSN 1466-5026. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893998/>>. Acesso em: 27-08-2021.
- 26 REIF, K. E.; MACALUSO, K. R. Ecology of Rickettsia felis: A Review. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n. 4, p. 723–736, jul. 2009. ISSN 0022-2585, 1938-2928. Publisher: Entomological Society of America. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/journal-of-medical-entomology/volume-46/issue-4/033.046.0402/Ecology-of-Rickettsia-felis-A-Review/10.1603/033.046.0402.full>>. Acesso em: 25-09-2021.
- 27 DORN, P. L. et al. 15 - Genetics of Major Insect Vectors. In: TIBAYRENC, M. (Ed.). *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. 2. ed. London: Elsevier, 2017. p. 341–382. ISBN 978-0-12-799942-5. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127999425000159>>. Acesso em: 26-09-2021.

- 28 EUA. Controle Internacional de Doença Vetorial. *Integrated Tick Management: Nuisance Tick Control, Disease Prevention: Integrated Tick Management*. Disponível em: <<https://www.vdci.net/tick-control-and-management-services-for-vector-disease-prevention/>>. Acesso em: 10-04-2022.
- 29 TickSafety.com. *Rocky Mountain Wood Tick (Dermacentor andersoni)*. 2016. Disponível em: <<https://ticksafety.com/tick-identification/wood-tick/>>. Acesso em: 11-04-2022.
- 30 Insetisan. *Biologia - Pulgas e Carrapatos*. 2008. Disponível em: <<https://www.insetisan.com.br/index.php/project/biologia-pulgas/>>. Acesso em: 11-04-2022.
- 31 Medical Care Development International. *Three-host Ixodidae: Life Cycle*. 2010. Disponível em: <[https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/S-Z/Ticks/body\\_Ticks\\_three\\_host\\_cycle](https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/Frames/S-Z/Ticks/body_Ticks_three_host_cycle)>. Acesso em: 11-04-2022.
- 32 BASU, A. K.; BASU, M.; ADESIYUN, A. A. A review on ticks (Acari: Ixodoidea: Ixodidae, Argasidae), associated pathogens and diseases of Trinidad and Tobago. *Acarologia*, v. 52, n. 1, p. 39–50, mar. 2012. ISSN 0044-586X. Number: 1 Publisher: Les Amis d'Acarologia. Disponível em: <<https://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/acarologia/article.php?id=2034>>. Acesso em: 29-09-2021.
- 33 CDC (EUA). How ticks spread disease. *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People*, U.S. Department of Health & Human Services, Atlanta, Geórgia, EUA, set. 2020. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/ticks/life\\_cycle\\_and\\_hosts.html](https://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html)>. Acesso em: 07-02-2023.
- 34 MSD Saude Animal. *Compreendendo a Transmissão de Patógenos por Carrapatos Vetores - Vet Smart Bulário*. 2015. Disponível em: <<https://www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13160/compreendendo-a-transmissao-de-patogenos-por-carrapatos-vetores>>. Acesso em: 07-02-2023.
- 35 FURQUIM, K. C. S. *Estudo das glândulas salivares de fêmeas e de machos de carrapatos Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae)*. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2007. Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100528/furquim\\_kcs\\_dr\\_rcla.pdf?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100528/furquim_kcs_dr_rcla.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 07-02-2023.
- 36 EUA. Fundação Americana da Doença de Lyme. Tick Paralysis. New Haven, Connecticut, EUA, p. 2. Disponível em: <<https://www.aldf.com/tick-paralysis/>>. Acesso em: 30-09-2021.
- 37 GHIMIRE, T. R. A Review on Neurophysiologic and Immunobiochemical Aspects of Tick Paralysis. *Nepal Journal of Neuroscience*, v. 6, n. 2, p. 42–48, 2009. ISSN 1813-1948. Disponível em: <<https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=1778805>>. Acesso em: 30-09-2021.
- 38 Doktoridudu. *Dermacentor andersoni ixodid ticks, female and male, dorsal*. 2016. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermacentor-andersoni-female-male.jpg>>. Acesso em: 26-10-2021.

- 39 Daktaridudu. *Amblyomma variegatum ixodid ticks, female and male, dorsal*. 2016. Disponível em: <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amblyomma-variegatum-female-male-dorsal.jpg>>. Acesso em: 25-04-2022.
- 40 DROEGE, S. *The Dog Tick, Dermacentor variabilis, in its splendor of beet overtones and resistance to vilification*. 2013. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermacentor\\_variabilis,\\_U,\\_Back,\\_MD,\\_Beltsville\\_2013-07-08-19.15.11\\_ZS\\_PMax.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dermacentor_variabilis,_U,_Back,_MD,_Beltsville_2013-07-08-19.15.11_ZS_PMax.jpg)>. Acesso em: 26-10-2021.
- 41 SCHMIDT, H. *American Dog Tick - Dermacentor variabilis - Male*. 2016. Disponível em: <<https://bugguide.net/node/view/1253245/bgpage>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 42 BRYANT, P. J. *Pacific Coast Tick - Dermacentor occidentalis*. 2007. Disponível em: <<http://nathistoc.bio.uci.edu/Other%20Arachnids/Dermacentor%20occidentalis%20female.htm>>.
- 43 The University of Rhode Island. *Pacific Coast Tick*. 2021. Disponível em: <<https://web.uri.edu/tickencounter/species/pacific-coast-tick/>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 44 OCCI, J. *Ixodid tick (Amblyomma tigrinum)*. 2011. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1308012>>. Acesso em: 01-07-2023.
- 45 Center for Wilderness Safety Inc. *Gulf Coast Tick - Amblyomma maculatum*. Disponível em: <<https://ticksafety.com/tick-identification/gulf-coast-tick/>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 46 Center for Wilderness Safety Inc. *Brown Dog Tick - Rhipicephalus sanguineus*. Disponível em: <<https://ticksafety.com/tick-identification/brown-dog-tick/>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 47 GUZMÁN-CORNEJO, C. *Amblyomma triste (macho)*. 2009. Disponível em: <<http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/5617?proyecto=Irekani>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 48 GUZMÁN-CORNEJO, C. *Amblyomma triste (hembra)*. 2009. Disponível em: <<http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/5639?proyecto=Irekani>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 49 Museu do carrapato. *Amblyomma aureolatum: Fêmea dorsal*. 2017. Disponível em: <<https://cloud.cnpgc.embrapa.br/controlado-carrapato-ms/files/2018/02/Amblyomma-aureolatum-F1.jpg>>. Acesso em: 22-04-2022.
- 50 Museu do carrapato. *Amblyomma parvum: Macho dorsal*. 2017. Disponível em: <<https://cloud.cnpgc.embrapa.br/controlado-carrapato-ms/files/2018/02/Amblyomma-parvum-F1.jpg>>. Acesso em: 23-04-2022.
- 51 Museu do carrapato. *Amblyomma parvum: Fêmea dorsal*. 2017. Disponível em: <<https://cloud.cnpgc.embrapa.br/controlado-carrapato-ms/files/2018/02/Amblyomma-parvum-F3.jpg>>. Acesso em: 23-04-2022.

- 52 MONGRUEL, A. C. B. et al. Infestações por carrapatos em seres humanos e habitações humanas em três cidades do Estado do Paraná. In: *Anais do 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Centro de Convenções de Pernambuco, Olinda, Brasil: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2018. p. 1916. Disponível em: <<http://www.adaltech.com.br/anais/medtrop2018/resumos/PDF-eposter-trab-aceito-1916-1.pdf>>. Acesso em: 22-04-2022.
- 53 Naturdata - Biodiversidade Online. *Morfologia de Rhipicephalus sanguineus*. Disponível em: <<https://naturdata.com/especie/Rhipicephalus-sanguineus/13627/0/>>. Acesso em: 26-10-2021.
- 54 NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 3, p. 252–276, abr. 2014. ISSN 1877-959X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X14000065>>. Acesso em: 25-04-2022.
- 55 OGRZEWALSKA, M. *Tick Amblyomma ovale Koch 1844 (Acari: Ixodidae), female*. 2007. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/22824835@N07/40700504843/>>. Acesso em: 30-04-2022.
- 56 OGRZEWALSKA, M. *Tick Amblyomma ovale Koch 1844 (Acari: Ixodidae), male*. 2019. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/22824835@N07/47614153912/>>. Acesso em: 30-04-2022.
- 57 PATTON, T. G. et al. Saliva, Salivary Gland, and Hemolymph Collection from *Ixodes scapularis* Ticks. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n. 60, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3912584/>>. Acesso em: 07-02-2023.
- 58 KITSOU, C. et al. Tick gut barriers impacting tick-microbe interactions and pathogen persistence. *Molecular microbiology*, v. 116, n. 5, p. 1241–1248, nov. 2021. ISSN 0950-382X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8599643/>>. Acesso em: 08-02-2023.
- 59 BURROW, H. M. et al. Towards a new phenotype for tick resistance in beef and dairy cattle: a review. *Animal Production Science*, v. 59, n. 8, p. 1401–1427, jul. 2019. ISSN 1836-5787, 1836-5787. Publisher: CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <<https://www.publish.csiro.au/an/AN18487>>. Acesso em: 28-09-2021.
- 60 ZELLNER, B.; HUNTLEY, J. F. Ticks and Tularemia: Do We Know What We Don't Know?: Ticks and Tularemia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, p. 146, 2019. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00146>>. Acesso em: 28-09-2021.
- 61 BREITSCHWERDT, E. B. et al. *Rickettsia rickettsii* Transmission by a Lone Star Tick, North Carolina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 873–875, maio 2011. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321779/>>. Acesso em: 12-07-2023.

- 62 Atlantick: Repellent Products. Mapa Político, *Canadian Tick Map*. Mahone Bay, Nova Scotia: [s.n.]. Disponível em: <<https://lisalearning.wixsite.com/website-4/map>>. Acesso em: 04-11-2021.
- 63 CDC (EUA). Geographic distribution of ticks that bite humans. *Centers for Disease Control and Prevention - CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People*, U.S. Department of Health & Human Services, Atlanta, Geórgia, EUA, p. 7, maio 2021. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/ticks/geographic\\_distribution.html](https://www.cdc.gov/ticks/geographic_distribution.html)>. Acesso em: 04-05-2022.
- 64 LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, maio 2011. ISSN 0122-0268. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-02682011000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-02682011000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 01-05-2022.
- 65 OLIVEIRA, S. V. d. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 22, set. 2016. ISSN 1678-9199. Publisher: Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP). Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/jvatitd/a/t8B5KLgnZ5M4j3Jq5gcH8pp/?lang=en>>. Acesso em: 05-05-2022.
- 66 PADGETT, K. A. et al. The Eco-epidemiology of Pacific Coast Tick Fever in California. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, p. e0005020, out. 2016. ISSN 1935-2735. Publisher: Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005020>>. Acesso em: 07-05-2022.
- 67 TORRES-CASTRO, M. et al. Molecular confirmation of *Rickettsia parkeri* in humans from Southern Mexico. *Zoonoses and Public Health*, v. 69, n. 4, p. 382–386, 2022. ISSN 1863-2378. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/zph.12927>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12927>>. Acesso em: 12-05-2022.
- 68 PENICHE-LARA, G.; LARA-PERERA, V. Rickettsiosis Caused by *Rickettsia parkeri*, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, v. 28, n. 2, p. 478–479, fev. 2022. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8798671/>>. Acesso em: 14-05-2022.
- 69 ALKISHE, A.; PETERSON, A. T. Climate change influences on the geographic distributional potential of the spotted fever vectors *Amblyomma maculatum* and *Dermacentor andersoni*. *PeerJ*, v. 10, p. e13279, maio 2022. ISSN 2167-8359. PeerJ Inc. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/13279>>. Acesso em: 17-05-2022.
- 70 CULL, B. Monitoring Trends in Distribution and Seasonality of Medically Important Ticks in North America Using Online Crowdsourced Records from iNaturalist. *Insects*, v. 13, n. 5, p. 404, abr. 2022. ISSN 2075-4450. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-4450/13/5/404>>. Acesso em: 17-05-2022.
- 71 NELDER, M. P. et al. Occurrence and distribution of *Amblyomma americanum* as determined by passive surveillance in Ontario, Canada (1999–2016). *Ticks and*

*Tick-borne Diseases*, v. 10, n. 1, p. 146–155, jan. 2019. ISSN 1877-959X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X1830298X>>. Acesso em: 17-05-2022.

72 ALKISHE, A.; RAGHAVAN, R. K.; PETERSON, A. T. Likely Geographic Distributional Shifts among Medically Important Tick Species and Tick-Associated Diseases under Climate Change in North America: A Review. *Insects*, v. 12, n. 3, p. 225, mar. 2021. ISSN 2075-4450. Number: 3 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-4450/12/3/225>>. Acesso em: 17-05-2022.

73 SÁNCHEZ-MONTES, S. et al. Rhipicephalus sanguineus Complex in the Americas: Systematic, Genetic Diversity, and Geographic Insights: Rhipicephalus sanguineus Complex in the Americas. *Pathogens*, v. 10, n. 9, p. 1118, set. 2021. ISSN 2076-0817. Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/9/1118>>. Acesso em: 17-05-2022.

74 MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of Amblyomma cajennense (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of A. cajennense (sensu stricto). *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 186, mar. 2016. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>>. Acesso em: 17-05-2022.

75 BARBIERI, J. M. et al. Altitudinal Assessment of Amblyomma aureolatum and Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae), Vectors of Spotted Fever Group Rickettsiosis in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 5, p. 1170–1174, set. 2015. ISSN 0022-2585, 1938-2928. Entomological Society of America. Disponível em: <<https://bioone.org/journals/journal-of-medical-entomology/volume-52/issue-5/tjv073/Altitudinal-Assessment-of-Amblyomma-aureolatum-and-Amblyomma-ovale-Acari/10.1093/jme/tjv073.full>>. Acesso em: 18-05-2022.

76 GUGLIELMONE, A. A. et al. Distribution and genetic variation of Amblyomma triste (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 4, n. 5, p. 386–390, set. 2013. ISSN 1877-959X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X13000381>>. Acesso em: 18-05-2022.

77 BURKMAN, E. J. *Genetic Structure of Amblyomma Cajennense (Acari: Ixodidae) Populations Based on Mitochondrial Gene Sequences*. Tese (Doutorado) — Georgia Southern University, Statesboro, Georgia, 2009. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/229164307.pdf>>.

78 GUZMAN-CORNEJO, C. et al. Confirmation of the presence of Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Systematic and Applied Acarology*, p. 47–50, mar. 2006. ISSN 2056-6069. Disponível em: <<https://www.biotaxa.org/saa/article/view/saa.11.1.5>>. Acesso em: 18-05-2022.

79 LADO, P. et al. The Amblyomma maculatum Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: phenotypic plasticity or incipient speciation? *Parasites & Vectors*, v. 11, p. 610, nov. 2018. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267817/>>. Acesso em: 18-05-2022.

- 80 ROMER, Y. et al. Rickettsia parkeri Rickettsiosis in Different Ecological Regions of Argentina and Its Association with Amblyomma tigrinum as a Potential Vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 6, p. 1156, dez. 2014. Publisher: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4257639/>>. Acesso em: 12-07-2023.
- 81 WECK, B. et al. Spotted Fever Group Rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 11, p. 2014–2016, nov. 2016. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088030/>>. Acesso em: 12-07-2023.
- 82 FACCINI-MARTÍNEZ, A. et al. Rickettsia rickettsii in Amblyomma patinoi Ticks, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 3, p. 537–539, 2015. ISSN 1080-6040. Acesso em: 24-07-2023.
- 83 SILVEIRA, I. et al. Rickettsia parkeri in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 7, p. 1111–1113, jul. 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878225/>>. Acesso em: 27-08-2021.
- 84 CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Salivary and Intestinal Transcriptomes Reveal Differential Gene Expression in Starving, Fed and Trypanosoma cruzi-Infected Rhodnius neglectus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2021.773357>>. Acesso em: 27-04-2022.
- 85 SOCOLOVSCHI, C. et al. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 34, 2009. ISSN 0928-4249. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695030/>>. Acesso em: 28-04-2022.
- 86 EREMEEVA, M. E. et al. Detection and characterization of a novel spotted fever group Rickettsia genotype in Haemaphysalis leporispalustris from California, USA. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 4, p. 814–818, maio 2018. ISSN 1877-959X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X17301747>>. Acesso em: 01-05-2022.
- 87 SAMMONS, L. S. et al. Susceptibility of laboratory animals to infection by spotted fever group rickettsiae. *Laboratory Animal Science*, v. 27, n. 2, p. 229–234, abr. 1977. ISSN 0023-6764.
- 88 RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Clinical and serological evaluation of capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) successively exposed to an Amblyomma sculptum-derived strain of Rickettsia rickettsii. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 924, jan. 2020. ISSN 2045-2322. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-57607-5>>. Acesso em: 24-07-2023.
- 89 NUNES, F. B. P. et al. Reproductive control of capybaras through sterilization in areas at risk of transmission of Brazilian spotted fever. *Ciência Rural*, v. 50, p. e20200053, jul. 2020. ISSN 0103-8478, 1678-4596. Publisher: Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/wqXQLtjJQxFg8FfbBVgSLK/?lang=en>>. Acesso em: 24-07-2023.

- 90 Veterinary Hospital Guilford-Jamestown. *Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs*. Disponível em: <<https://www.guilfordjamestownvet.com/site/blog-greensboro-vet/2020/12/18/rocky-mountain-spotted-fever-dogs>>. Acesso em: 01-05-2022.
- 91 SAHNI, A. et al. Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection: Pathogenesis of Rickettsial Diseases. *Annual review of pathology*, v. 14, p. 127–152, jan. 2019. ISSN 1553-4014. Disponível em: <<https://europepmc.org/articles/PMC6505701>>. Acesso em: 19-04-2022.
- 92 PATEL, S. et al. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF): Background, Etiology and Pathophysiology, *Epidemiology: Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF)*. *Medscape - eMedicine*, out. 2021. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/228042-overview?reg=1>>. Acesso em: 19-04-2022.
- 93 HELMINIAK, L.; MISHRA, S.; KIM, H. K. Pathogenicity and virulence of *Rickettsia*. *Virulence*, v. 13, n. 1, p. 1752–1771, dez. 2022. ISSN 2150-5594. Publisher: Taylor & Francis \_eprint: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2132047>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2132047>>. Acesso em: 14-02-2023.
- 94 OSTERLOH, A. Vaccine Design and Vaccination Strategies against *Rickettsiae*. *Vaccines*, v. 9, n. 8, p. 896, ago. 2021. ISSN 2076-393X. Number: 8 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/8/896>>. Acesso em: 10-06-2022.
- 95 BORGIO, G. M. et al. A patatin-like phospholipase mediates *Rickettsia parkeri* escape from host membranes. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 3656, jun. 2022. ISSN 2041-1723. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-022-31351-y>>. Acesso em: 09-02-2023.
- 96 CHAN, Y. G.-Y.; RILEY, S. P.; MARTINEZ, J. J. Adherence to and Invasion of Host Cells by Spotted Fever Group *Rickettsia* Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 1, p. 139, dez. 2010. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109342/>>. Acesso em: 09-02-2023.
- 97 REBOUÇAS, M. M.; BASSO, L. S. A Saga de Henrique da Rocha Lima: *Rickettsia prowazeki* Rocha Lima 1916. 20 anos de percalços. *Revista Páginas do Instituto Biológico*, v. 3, n. 2, p. 15, 2007. ISSN 1809-3353. Disponível em: <[http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v3\\_2/reboucas.htm](http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v3_2/reboucas.htm)>. Acesso em: 28-07-2021.
- 98 WEIGL, R. Immunization against typhus fever in Poland during World War II. *Texas Reports on Biology and Medicine*, v. 5, n. 2, p. 177–179, 1947. ISSN 0040-4675.
- 99 WALKER, D. H. The realities of biodefense vaccines against *Rickettsia*. *Vaccine*, v. 27, p. D52–D55, nov. 2009. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0901055X>>. Acesso em: 25-05-2022.
- 100 ALHASSAN, A. et al. *Rickettsia rickettsii* Whole-Cell Antigens Offer Protection against Rocky Mountain Spotted Fever in the Canine Host. *Infection and Immunity*, v. 87, n. 2, p. e00628–18, fev. 2019. ISSN 1098-5522.

- 101 NORIEA, N. F.; CLARK, T. R.; HACKSTADT, T. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. *mBio*, v. 6, n. 2, p. e00323–15, mar. 2015. ISSN 2150-7511.
- 102 MENG, Y. et al. Protective immunity against *Rickettsia heilongjiangensis* in a C3H/HeN mouse model mediated by outer membrane protein B-pulsed dendritic cells. *Science China. Life Sciences*, v. 58, n. 3, p. 287–296, mar. 2015. ISSN 1869-1889.
- 103 RILEY, S. P. et al. Failure of a heterologous recombinant Sca5/OmpB protein-based vaccine to elicit effective protective immunity against *Rickettsia rickettsii* infections in C3H/HeN mice. *Pathogens and Disease*, v. 73, n. 9, p. ftv101, dez. 2015. ISSN 2049-632X.
- 104 Andrei Giacchetto Felice et al. Vacinologia reversa e identificação de alvos vacinais por Bioinformática. In: *O estado da arte nas pesquisas em Vacinologia*. Belém, PA: Editora Creative Eventos e Cursos, 2022. p. 77–101. ISBN 978-65-995536-3-9. Disponível em: <<https://creativeeventos.com.br/editoracreative-vac1-vac1cap05/>>. Acesso em: 10-06-2022.
- 105 Marcela Rezende Lemes et al. Abordagem em Imunoinformática para caracterização e identificação de epítomos em busca de vacinas. In: *O estado da arte nas pesquisas em Vacinologia*. Belém, PA: Editora Creative Eventos e Cursos, 2022. p. 17–40. ISBN 978-65-995536-3-9. Disponível em: <<https://creativeeventos.com.br/editoracreative-vac1-vac1cap02/>>. Acesso em: 10-06-2022.
- 106 Andrei Giacchetto Felice et al. Vacinologia reversa aplicada a bactérias patogênicas de interesse humano e veterinário. In: *O estado da arte nas pesquisas em Vacinologia*. Belém, PA: Editora Creative Eventos e Cursos, 2022. p. 121–136. ISBN 978-65-995536-3-9. Disponível em: <<https://creativeeventos.com.br/editoracreative-vac1-vac1cap08/>>. Acesso em: 12-06-2022.
- 107 Juliana Costa-Madeira et al. Vacinologia Reversa: Uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas contra a Leishmaniose Visceral. In: *O estado da arte nas pesquisas em Vacinologia*. Belém, PA: Editora Creative Eventos e Cursos, 2022. p. 175–191. ISBN 978-65-995536-3-9. Disponível em: <<https://creativeeventos.com.br/editoracreative-vac1-vac1cap10/>>. Acesso em: 12-06-2022.
- 108 FELICE, A. G. et al. Pan-genomic analyses of 47 complete genomes of the *Rickettsia* genus and prediction of new vaccine targets and virulence factors of the species. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, p. 1–15, mar. 2021. ISSN 1538-0254.
- 109 KUMAR, A. Identification of Potential Vaccine Candidates from *Rickettsia* Species: A Reverse Vaccinology Approach. *Medicine Biology*, 2017. Corpus ID: 212557410. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-of-Potential-Vaccine-Candidates-from-Kumar/2aa7dd9879683dadacd7959e55ac72561d252769>>. Acesso em: 13-06-2022.
- 110 PALMER, G. H. et al. Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development. *Fems Immunology and Medical*

*Microbiology*, v. 64, n. 1, p. 115–119, fev. 2012. ISSN 0928-8244. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288579/>>. Acesso em: 20-06-2022.

111 Elizaveta Poliashenko. *Bactérias, germes e microorganismos*. Disponível em: <<https://img.freepik.com/vetores-gratis/bacteria-e-germes-icone-de-microorganismos-ilustracao-de-bacterias-e-microorganismos-alerge136982-2093.jpg?w=740>>. Acesso em: 15-06-2022.

112 Nicholas Caffarilla. *Collage showing the diversity of insect species*. 2013. Disponível em: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/74/Insect\\_collage.png/924px-Insect\\_collage.png?20130203162905](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/74/Insect_collage.png/924px-Insect_collage.png?20130203162905)>. Acesso em: 15-06-2022.

113 Muuraa. *Sketch of the dangerous tick on white background, isolated*. Disponível em: <<https://thumbs.dreamstime.com/z/sketch-tick-dangerous-white-background-isolated-39534844.jpg>>. Acesso em: 15-06-2022.

114 Monika Zagrobelna. *How to draw a mouse*. 2013. Disponível em: <[https://cms-assets.tutsplus.com/cdn-cgi/image/width=630/uploads/users/108/posts/31281/final\\_image/how-to-draw-mouse-4-13.png](https://cms-assets.tutsplus.com/cdn-cgi/image/width=630/uploads/users/108/posts/31281/final_image/how-to-draw-mouse-4-13.png)>. Acesso em: 15-06-2022.

115 Nabeel Majeed Shaik. *Parts of the Head: The three-quarter view*. 2014. Disponível em: <<https://artlearnings.files.wordpress.com/2016/03/figure-drawing-for-dummies-mantesh-80-1.jpg>>. Acesso em: 15-06-2022.

116 Otosection. *Membrana plasmática: Modelo mosaico fluido*. 2021. Disponível em: <<https://static.biologianet.com/2020/02/membrana-plasmatica.jpg>>. Acesso em: 15-06-2022.

117 Atropos235. *Representação esquemática da molécula MHC classe 2*. 2007. Page Version ID: 62831964. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Complexo\\_principal\\_de\\_histocompatibilidade&oldid=62831964](https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Complexo_principal_de_histocompatibilidade&oldid=62831964)>. Acesso em: 15-06-2022.

118 Atropos235. *Schematic representation of MHC class I molecule*. 2007. Disponível em: <[https://upload.wikimedia-org.translate.google.com/wikipedia/commons/thumb/e/ee/MHC\\_Class\\_1.svg/300px-MHC\\_Class\\_1.svg.png?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=pt&\\_x\\_tr\\_hl=pt-BR](https://upload.wikimedia-org.translate.google.com/wikipedia/commons/thumb/e/ee/MHC_Class_1.svg/300px-MHC_Class_1.svg.png?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt-BR)>. Acesso em: 15-06-2022.

119 Axel Griewel. *Examples of protein structures and complexes of different sizes as available from the PDB an EMDB*. 2011. Disponível em: <[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Protein\\_structure\\_examples.png/729px-Protein\\_structure\\_examples.png?20140419164311](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Protein_structure_examples.png/729px-Protein_structure_examples.png?20140419164311)>. Acesso em: 15-06-2022.

120 Bioninja. *Polar versus non-polar aminoacids*. Disponível em: <[https://ib.bioninja.com.au/\\_Media/polar-vs-non-polar-amino\\_med.jpeg](https://ib.bioninja.com.au/_Media/polar-vs-non-polar-amino_med.jpeg)>. Acesso em: 15-06-2022.

121 HELDT, C. L. et al. Experimental and computational surface hydrophobicity analysis of a non-enveloped virus and proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 153, p. 77–84, maio 2017. ISSN 0927-7765. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776517300838>>. Acesso em: 15-06-2022.

122 CARO-GOMEZ, E. et al. Discovery of novel cross-protective *Rickettsia prowazekii* T-cell antigens using a combined reverse vaccinology and in vivo screening approach. *Vaccine*, v. 32, n. 39, p. 4968–4976, set. 2014. ISSN 1873-2518.

123 DZUL-ROSADO, K. et al. Application of reverse vaccinology for the identification of epitope candidates from *Rickettsia rickettsii*. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v. 57, n. 5, p. 643–647, out. 2020. ISSN 0975-0959 (Online); 0301-1208 (Print). NISCAIR-CSIR, India. Disponível em: <<http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/55357>>. Acesso em: 19-06-2022.

124 JOHNSTON, T. H.; BANCROFT, M. J. A tick-resistance condition in cattle. *Proceedings of The Royal Society of Queensland*, n. 32, p. 219–317, 1918.

125 TRAGER, W. Acquired Immunity to Ticks. *The Journal of Parasitology*, v. 25, n. 1, p. 57–81, 1939. ISSN 0022-3395. The American Society of Parasitologists, Allen Press. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3272160>>. Acesso em: 24-06-2022.

126 ALGER, N. E.; CABRERA, E. J. An Increase in Death Rate of *Anopheles stephensi* Fed on Rabbits Immunized with Mosquito Antigen12. *Journal of Economic Entomology*, v. 65, n. 1, p. 165–168, fev. 1972. ISSN 0022-0493. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/65.1.165>>. Acesso em: 24-06-2022.

127 SCHLEIN, Y.; LEWIS, C. T. Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiological Entomology*, v. 1, n. 1, p. 55–59, 1976. ISSN 1365-3032. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3032.1976.tb00885.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3032.1976.tb00885.x>>. Acesso em: 24-06-2022.

128 ALLEN, J. R.; HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, v. 280, n. 5722, p. 491–493, ago. 1979. ISSN 0028-0836.

129 JOHNSTON, L. A. Y.; KEMP, D. H.; PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations: Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks. *International Journal for Parasitology*, v. 16, n. 1, p. 27–34, fev. 1986. ISSN 0020-7519. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751986900615>>. Acesso em: 25-06-2022.

130 TABOR, A. E. A Review of Australian Tick Vaccine Research. *Vaccines*, v. 9, n. 9, p. 1030, set. 2021. ISSN 2076-393X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8473225/>>. Acesso em: 24-06-2022.

131 KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system: Vaccination against *Boophilus microplus*. *Experimental & Applied Acarology*, v. 7, n. 1, p. 43–58, jun. 1989. ISSN 0168-8162.

- 132 NUTTALL, P. A. et al. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 4, p. 155–163, abr. 2006. ISSN 0141-9838.
- 133 RIDING, G. A. et al. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *The Journal of Immunology*, v. 153, n. 11, p. 5158–5166, dez. 1994. ISSN 0022-1767, 1550-6606. Publisher: American Association of Immunologists. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/153/11/5158>>. Acesso em: 31-07-2022.
- 134 WILLADSEN, P. et al. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, v. 18, n. 5, p. 241–246, 1996. ISSN 1365-3024. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-90.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-90.x>>. Acesso em: 31-07-2022.
- 135 MCKENNA, R. V. et al. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 7, p. 325–336, 1998. ISSN 1365-3024. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3024.1998.00149.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.1998.00149.x>>. Acesso em: 31-07-2022.
- 136 TELLAM, R. L. et al. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, v. 103, n. 1, p. 141–156, jan. 2002. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005738>>. Acesso em: 31-07-2022.
- 137 IMAMURA, S. et al. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, n. 10, p. 1301–1311, jan. 2005. ISSN 0264-410X.
- 138 YOU, M.-J. Immunization of mice with recombinant P27/30 protein confers protection against hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) infestation: Immunization of mice with recombinant P27/30 protein confers protection against hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari. *Journal of Veterinary Science*, v. 6, n. 1, p. 47–51, mar. 2005. ISSN 1229-845X.
- 139 ALMAZÁN, C. et al. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*, v. 23, n. 46-47, p. 5294–5298, nov. 2005. ISSN 0264-410X.
- 140 PIPER, E. K. et al. Peripheral cellular and humoral responses to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in Santa Gertrudis cattle. *Parasite Immunology*, v. 39, n. 1, jan. 2017. ISSN 1365-3024.
- 141 LEW-TABOR, A. E.; VALLE, M. R. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 7, n. 4, p. 573–585, jun. 2016. ISSN 1877-9603.

- 142 NUTTALL, P. A. Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener klinische Wochenschrift*, maio 2019. ISSN 1613-7671. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y>>. Acesso em: 08-09-2022.
- 143 BANAJEE, K. H. et al. Amblyomma maculatum Feeding Augments Rickettsia parkeri Infection in a Rhesus Macaque Model: A Pilot Study: Amblyomma maculatum Feeding Augments Rickettsia parkeri Infection in a Rhesus Macaque Model. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0135175, 2015. ISSN 1932-6203.
- 144 MILHANO, N. et al. The role of Rhipicephalus sanguineus sensu lato saliva in the dissemination of Rickettsia conorii in C3H/HeJ mice. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 29, n. 3, p. 225–229, set. 2015. ISSN 1365-2915.
- 145 ZEMTSOVA, G. et al. Co-feeding as a route for transmission of Rickettsia conorii israelensis between Rhipicephalus sanguineus ticks. *Experimental & Applied Acarology*, v. 52, n. 4, p. 383–392, dez. 2010. ISSN 1572-9702.
- 146 SÁ-NUNES, A.; OLIVEIRA, C. J. F. Dendritic Cells as a Disputed Fortress on the Tick-Host Battlefield. *Trends in Parasitology*, v. 37, n. 4, p. 340–354, abr. 2021. ISSN 1471-5007.
- 147 OXER, D. T.; RICARDO, C. L. Notes on the Biology, Toxicity and Breeding of Ixodes Holocyclus (neumann). *Australian Veterinary Journal*, v. 18, n. 5, p. 194–199, 1942. ISSN 1751-0813. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1751-0813.1942.tb06360.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1942.tb06360.x>>. Acesso em: 01-08-2022.
- 148 RODRIGUEZ-VALLE, M. et al. Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, Ixodes holocyclus. *International Journal for Parasitology*, v. 48, n. 1, p. 71–82, jan. 2018. ISSN 1879-0135.
- 149 Sá-NUNES, A.; OLIVEIRA, C. J. F.; RIBEIRO, J. M. Mast Cells and Basophils: From Malevolent Design to Coevolutionary Arms Race: Mast Cells and Basophils. *Trends in Parasitology*, v. 36, n. 8, p. 655–659, ago. 2020. ISSN 1471-4922. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492220301318>>. Acesso em: 14-01-2023.
- 150 TAVARES, N. M. et al. Lutzomyia longipalpis Saliva or Salivary Protein LJM19 Protects against Leishmania braziliensis and the Saliva of Its Vector, Lutzomyia intermedia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 5, p. e1169, maio 2011. ISSN 1935-2735. Publisher: Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001169>>. Acesso em: 11-01-2023.
- 151 GOMES, R. et al. Immunity to Lutzomyia whitmani Saliva Protects against Experimental Leishmania braziliensis Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, p. e0005078, nov. 2016. ISSN 1935-2735. Publisher: Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005078>>. Acesso em: 11-01-2023.
- 152 GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; LEÓN, A. A. PÉrez de. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?: Cattle tick

- vaccines. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 5, p. 421–427, maio 2012. ISSN 0020-7519. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751912000835>>. Acesso em: 01-09-2022.
- 153 MARITZ-OLIVIER, C.; ZYL, W. van; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 3, n. 3, p. 179–187, jun. 2012. ISSN 1877-9603.
- 154 RAMAN, K.; YETURU, K.; CHANDRA, N. targetTB: A target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis: targetTB. *BMC Systems Biology*, v. 2, p. 109, dez. 2008. ISSN 1752-0509. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2651862/>>. Acesso em: 13-07-2022.
- 155 RODRIGUES, T. C. V. et al. Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: a causative agent of pneumonia: Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*. *Royal Society Open Science*, v. 6, n. 7, p. 190907, jul. 2019. Publisher: Royal Society. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.190907>>. Acesso em: 14-01-2023.
- 156 DELEO, D. M. et al. RNA profile diversity across arthropoda: guidelines, methodological artifacts, and expected outcomes: RNA profile diversity across arthropoda. *Biology Methods & Protocols*, v. 3, n. 1, p. bpy012, dez. 2018. ISSN 2396-8923. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6994094/>>. Acesso em: 16-02-2023.
- 157 FU, L. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data: CD-HIT. *Bioinformatics*, v. 28, n. 23, p. 3150–3152, dez. 2012. ISSN 1367-4803. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>>. Acesso em: 12-05-2022.
- 158 BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data: Trimmomatic. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, ago. 2014. ISSN 1367-4803. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>>. Acesso em: 08-07-2022.
- 159 MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, v. 17, n. 1, p. 10–12, maio 2011. ISSN 2226-6089. Number: 1. Disponível em: <<https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>>. Acesso em: 08-07-2022.
- 160 WINGETT, S. W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control: FastQ Screen. *F1000Research*, v. 7, p. 1338, set. 2018. ISSN 2046-1402. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124377/>>. Acesso em: 08-07-2022.
- 161 BUSHNELL, B. BMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. *Lawrence Berkeley National Laboratory*, mar. 2014. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/1h3515gn>>. Acesso em: 09-07-2022.

- 162 SONG, L.; FLOREA, L. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads: Rcorrector. *GigaScience*, v. 4, n. 1, p. 48, out. 2015. ISSN 2047-217X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13742-015-0089-y>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 163 MACMANES, M. D. The Oyster River Protocol: a multi-assembler and kmer approach for de novo transcriptome assembly: The Oyster River Protocol. *PeerJ*, v. 6, p. e5428, ago. 2018. ISSN 2167-8359. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078068/>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 164 SMITH-UNNA, R. et al. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies: TransRate. *Genome Research*, v. 26, n. 8, p. 1134–1144, ago. 2016. ISSN 1088-9051. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971766/>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 165 LI, B. et al. Evaluation of de novo transcriptome assemblies from RNA-Seq data. *Genome Biology*, v. 15, n. 12, p. 553, dez. 2014. ISSN 1474-760X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0553-5>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 166 CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications: BLAST+. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 421, dez. 2009. ISSN 1471-2105. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 167 HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program: CAP3. *Genome Research*, v. 9, n. 9, p. 868–877, set. 1999. ISSN 1088-9051.
- 168 PATRO, R. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, v. 14, n. 4, p. 417–419, abr. 2017. ISSN 1548-7105. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.4197>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 169 LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012. ISSN 1548-7105. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1923>>. Acesso em: 09-07-2022.
- 170 HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, v. 8, n. 8, p. 1494–1512, ago. 2013. ISSN 1750-2799. Number: 8 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2013.084>>. Acesso em: 10-07-2022.
- 171 MISTRY, J. et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions: Challenges in homology search. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 12, p. e121, jul. 2013. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkt263>>. Acesso em: 10-07-2022.
- 172 RIBEIRO, J. M. C.; MANS, B. J. TickSialoFam (TSFam): A Database That Helps to Classify Tick Salivary Proteins, a Review on Tick Salivary Protein Function and Evolution, With Considerations on the Tick Sialome Switching Phenomenon: TickSialoFam (TSFam). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00374>>. Acesso em: 10-07-2022.

- 173 EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy: OrthoFinder. *Genome Biology*, v. 16, n. 1, p. 157, ago. 2015. ISSN 1474-760X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0721-2>>. Acesso em: 10-07-2022.
- 174 THUMULURI, V. et al. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models: DeepLoc 2.0. *Nucleic Acids Research*, p. gkac278, abr. 2022. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>>. Acesso em: 05-06-2022.
- 175 BARINOV, A. et al. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *PROTEOMICS*, v. 9, n. 1, p. 61–73, 2009. ISSN 1615-9861. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pmic.200800195>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.200800195>>. Acesso em: 11-07-2022.
- 176 ONG, E. et al. Vaxign2: the second generation of the first Web-based vaccine design program using reverse vaccinology and machine learning: Vaxign2. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. W1, p. W671–W678, jul. 2021. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkab279>>. Acesso em: 12-07-2022.
- 177 DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. *The Open Vaccine Journal*, v. 1, n. 1, p. 22–26, set. 2008. ISSN 18750354. Disponível em: <<http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOVACJ-1-22>>. Acesso em: 12-07-2022.
- 178 RAWAL, K. et al. Vaxi-DL: A web-based deep learning server to identify potential vaccine candidates: Vaxi-DL. *Computers in Biology and Medicine*, v. 145, p. 105401, jun. 2022. ISSN 1879-0534.
- 179 TABOR, A. E. The Enigma of Identifying New Cattle Tick Vaccine Antigens. In: *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. Londres, Inglaterra: IntechOpen, 2018. v. 1. ISBN 978-1-78985-766-5. Publication Title: Ticks and Tick-Borne Pathogens. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/undefined/state.item.id>>. Acesso em: 12-07-2022.
- 180 KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences: BlastKOALA and GhostKOALA. *Journal of Molecular Biology*, v. 428, n. 4, p. 726–731, fev. 2016. ISSN 1089-8638.
- 181 The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021: UniProt. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D480–D489, jan. 2021. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>>. Acesso em: 12-07-2022.
- 182 Juliana Cristina Costa Madeira. *Identificação in silico de candidatos vacinais contra Leishmaniose Visceral Humana e Canina através de Genômica Comparativa e Vacinologia Reversa*. Tese (Mestrado) — Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Brasil, 2021.

- 183 SHANMUGHAM, B.; PAN, A. Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*: a novel hierarchical in silico approach: Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e59126, 2013. ISSN 1932-6203.
- 184 Ankush Jadhav et al. Unraveling novel broad-spectrum antibacterial targets in food and waterborne pathogens using comparative genomics and protein interaction network analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 27, p. 300–308, out. 2014. ISSN 1567-1348. Publisher: Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134814002949>>. Acesso em: 13-07-2022.
- 185 LUO, H. et al. DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. Database issue, p. D574–580, jan. 2014. ISSN 1362-4962.
- 186 CHEN, L. et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors: VFDB. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. Database Issue, p. D325–D328, jan. 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC539962/>>. Acesso em: 13-07-2022.
- 187 I, D. et al. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of molecular modeling*, v. 20, n. 6, jun. 2014. ISSN 0948-5023. Publisher: J Mol Model. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24878803/>>. Acesso em: 15-09-2022.
- 188 KADAM, K. et al. AllerBase: a comprehensive allergen knowledgebase: AllerBase. *Database*, v. 2017, p. bax066, jan. 2017. ISSN 1758-0463. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/database/bax066>>. Acesso em: 27-07-2022.
- 189 RADAUER, C. et al. Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, v. 69, n. 4, p. 413–419, 2014. ISSN 1398-9995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/all.12348>>. Acesso em: 27-07-2022.
- 190 MARI, A. et al. Allergen databases: current status and perspectives: Allergen databases. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 9, n. 5, p. 376–383, set. 2009. ISSN 1534-6315.
- 191 M. Hostetter et al. Curl: A Gentle Slope Language for the Web. *World Wide Web Journal*, v. 2, n. 2, p. 121–134, jul. 1997. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20081224002953/http://www.cag.lcs.mit.edu/curl/wwwpaper.html>>. Acesso em: 27-07-2022.
- 192 LIU, L. et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 251364, 2012. ISSN 1110-7243. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398667/>>. Acesso em: 09-09-2022.
- 193 Abhijit Nandi et al. Designing of Multi-Epitope Vaccine Construct Employing Immuno-Informatics Approach to Combat Multi-Tick Species Infestations. *Ticks*

and Tick-Borne Diseases, p. 23, mar. 2022. TTBDIS-D-22-00010. Disponível em: <[https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=4046359](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4046359)>.

194 COUTO, J. et al. Probing the Rhipicephalus bursa Sialomes in Potential Anti-Tick Vaccine Candidates: A Reverse Vaccinology Approach: Probing the Rhipicephalus bursa Sialomes in Potential Anti-Tick Vaccine Candidates. *Biomedicines*, v. 9, n. 4, p. 363, abr. 2021. ISSN 2227-9059. Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9059/9/4/363>>. Acesso em: 20-02-2023.

195 PÉREZ-SÁNCHEZ, R. et al. In silico selection of functionally important proteins from the mialome of Ornithodoros erraticus ticks and assessment of their protective efficacy as vaccine targets. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 1, p. 508, out. 2019. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3768-1>>. Acesso em: 17-09-2022.

196 IMAMURA, S. et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, v. 56, n. 2, p. 85–98, ago. 2008. ISSN 0047-1917.

197 TRIMNELL, A. R. et al. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, n. 34, p. 4329–4341, jul. 2005. ISSN 0264-410X.

198 MULENGA, A. et al. Molecular characterization of a Haemaphysalis longicornis tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 4, p. 1652–1658, abr. 1999. ISSN 0019-9567.

199 LUNARDI, C. et al. Glycine-rich cell wall proteins act as specific antigen targets in autoimmune and food allergic disorders. *International Immunology*, v. 12, n. 5, p. 647–657, maio 2000. ISSN 0953-8178.

200 MARUYAMA, S. R. et al. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastrongylid ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Rhipicephalus sanguineus and Amblyomma cajennense. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 363, jun. 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-363>>. Acesso em: 25-09-2022.

201 BAUMANN, T. et al. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider Cupiennius salei: Ctenidins. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 67, n. 16, p. 2787–2798, ago. 2010. ISSN 1420-9071.

202 LAI, R. et al. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, Amblyomma hebraeum. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 18, n. 12, p. 1447–1449, set. 2004. ISSN 1530-6860.

203 ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of Dipetalogaster maxima. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 2, p. 669–679, fev. 2011. ISSN 1535-3893. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035102/>>. Acesso em: 22-09-2022.

- 204 PÉREZ-SÁNCHEZ, R. et al. A proteomics informed by transcriptomics insight into the proteome of *Ornithodoros erraticus* adult tick saliva. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 1, p. 1, jan. 2022. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-021-05118-1>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 205 GARCIA, G. R. et al. A transcriptome and proteome of the tick *Rhipicephalus microplus* shaped by the genetic composition of its hosts and developmental stage. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 12857, jul. 2020. ISSN 2045-2322. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-69793-3>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 206 PERNER, J. et al. The Central Role of Salivary Metalloproteases in Host Acquired Resistance to Tick Feeding. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 563349, 2020. ISSN 2235-2988.
- 207 COSTA, G. C. A. et al. *Amblyomma sculptum* Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 611104, fev. 2021. ISSN 1664-3224. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.611104/full>>. Acesso em: 30-11-2022.
- 208 Thomas Brody. *Terribly reduced optic lobes*: Biological overview, regulation, developmental biology, effects of mutation, evolutionary homologs, references. 2021. Disponível em: <<https://www.sdbonline.org/sites/fly/hjmuller/trol1.htm>>. Acesso em: 22-09-2022.
- 209 PARKER, D. S.; JEMISON, J.; CADIGAN, K. M. Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, v. 129, n. 11, p. 2565–2576, jun. 2002. ISSN 0950-1991.
- 210 MITCHELL, R. D.; SONENSHINE, D. E.; LEÓN, A. A. Pérez de. Vitellogenin Receptor as a Target for Tick Control: A Mini-Review: Vitellogenin Receptor as a Target for Tick Control. *Frontiers in Physiology*, v. 10, 2019. ISSN 1664-042X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00618>>. Acesso em: 22-09-2022.
- 211 RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M. et al. *Drosophila* Lipophorin Receptors Recruit the Lipoprotein LTP to the Plasma Membrane to Mediate Lipid Uptake. *PLOS Genetics*, v. 11, n. 6, p. e1005356, jun. 2015. ISSN 1553-7404. Publisher: Public Library of Science. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005356>>. Acesso em: 24-09-2022.
- 212 NICOLIS, V. F.; BURGER, N. F. V.; BOTHA, A.-M. Whole-body transcriptome mining for candidate effectors from *Diuraphis noxia*. *BMC Genomics*, v. 23, n. 1, p. 493, jul. 2022. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-022-08712-4>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 213 RADULOVIC, Z. M.; MULENGA, A. Heparan sulfate/heparin glycosaminoglycan binding alters inhibitory profile and enhances anticoagulant function of conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serpin 19. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 80, p. 1–10, jan. 2017. ISSN 1879-0240.

- 214 QIN, N. et al. A single von Willebrand factor C-domain protein acts as an extracellular pattern-recognition receptor in the river prawn *Macrobrachium nipponense*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 30, p. 10468–10477, jul. 2020. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7383388/>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 215 KIM, D.-W.; PARK, H.-S. Flower DR: Bioinformatics for vaccinology: Flower DR. *Virology Journal*, v. 6, n. 1, p. 85, jun. 2009. ISSN 1743-422X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-85>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 216 ZEPP, F. Principles of vaccine design—Lessons from nature. *Vaccine*, v. 28, p. C14–C24, ago. 2010. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10010030>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 217 LEE, R.; JACKSON, L.; OPDEBEECK, J. Immune responses of cattle to biochemically modified antigens from the midgut of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Parasite Immunology*, v. 13, n. 6, p. 661–672, 1991. ISSN 1365-3024. [\\_eprint: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00561.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00561.x). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00561.x>>. Acesso em: 25-10-2022.
- 218 WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality?: Vaccination with 'concealed' antigens. *Parasite Immunology*, v. 13, n. 6, p. 605–616, nov. 1991. ISSN 0141-9838.
- 219 GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Effect of particulation on the immunogenic and protective properties of the recombinant Bm86 antigen expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*, v. 16, n. 4, p. 374–380, fev. 1998. ISSN 0264-410X.
- 220 GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*, v. 16, n. 9-10, p. 1053–1055, jun. 1998. ISSN 0264-410X.
- 221 WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v. 109 ( Pt 4), p. 525–530, nov. 1994. ISSN 0031-1820.
- 222 KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response: Tick attachment and feeding. *Physiology of ticks / editors, F.D. Obenchain, R. Galun*, 1982. Publisher: Oxford : Pergamon Press, 1982. Disponível em: <[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Tick+attachment+and+feeding%3A+role+of+the+mouthparts%2C+feeding+apparatus%2C+salivary+gland+secretions+and+the+host+response&author=Kemp%2C+D.H.&publication\\_year=1982](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Tick+attachment+and+feeding%3A+role+of+the+mouthparts%2C+feeding+apparatus%2C+salivary+gland+secretions+and+the+host+response&author=Kemp%2C+D.H.&publication_year=1982)>. Acesso em: 25-10-2022.
- 223 JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. Amblyomma americanum: Specific Uptake of Immunoglobulins into Tick Hemolymph during Feeding: *Amblyomma americanum*. *Experimental Parasitology*, v. 96, n. 4, p. 213–221, dez. 2000. ISSN 0014-4894. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489400945673>>. Acesso em: 25-10-2022.

- 224 ACKERMAN, S. et al. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *The Journal of Parasitology*, v. 67, n. 5, p. 737–740, out. 1981. ISSN 0022-3395.
- 225 FUJISAKI, K.; KAMIO, T.; KITAOKA, S. Passage of host serum components, including antibodies specific for *Theileria sergenti*, across the digestive tract of argasid and ixodid ticks. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology (UK)*, 1984. Disponível em: <[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Passage+of+host+serum+components%2C+including+antibodies+specific+for+Theileria+sergenti%2C+across+the+digestive+tract+of+argasid+and+ixodid+ticks&author=Fujisaki%2C+K.&publication\\_year=1984](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Passage+of+host+serum+components%2C+including+antibodies+specific+for+Theileria+sergenti%2C+across+the+digestive+tract+of+argasid+and+ixodid+ticks&author=Fujisaki%2C+K.&publication_year=1984)>. Acesso em: 25-10-2022.
- 226 WANG, H.; NUTTALL, P. A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite: Immunoglobulin-binding proteins in ticks. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 56, n. 3-4, p. 286–295, out. 1999. ISSN 1420-682X.
- 227 AHMAD, Z.; LAUGHLIN, T. F. Medicinal Chemistry of ATP Synthase: A Potential Drug Target of Dietary Polyphenols and Amphibian Antimicrobial Peptides: Medicinal Chemistry of ATP Synthase. *Current medicinal chemistry*, v. 17, n. 25, p. 2822–2836, 2010. ISSN 0929-8673. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734657/>>. Acesso em: 04-11-2022.
- 228 LUO, Z. et al. Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture and Fisheries*, v. 1, p. 1–8, dez. 2016. ISSN 2468-550X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468550X16300302>>. Acesso em: 07-11-2022.
- 229 NORTHEN, H. et al. Salmonella enterica serovar Typhimurium mutants completely lacking the F0F1 ATPase are novel live attenuated vaccine strains. *Vaccine*, v. 28, n. 4, p. 940–949, jan. 2010. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X09017290>>. Acesso em: 07-11-2022.
- 230 THOMPSON, A. K. et al. The roles of *Rhodobacter sphaeroides* copper chaperones PCu(A)C and Sco (PrrC) in the assembly of the copper centers of the aa(3)-type and the cbb(3)-type cytochrome c oxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1817, n. 6, p. 955–964, jun. 2012. ISSN 0006-3002.
- 231 DING, F. et al. Restoration of the Immunogenicity of Tumor Cells for Enhanced Cancer Therapy via Nanoparticle-Mediated Copper Chaperone Inhibition. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 61, n. 31, p. e202203546, 2022. ISSN 1521-3773. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/anie.202203546>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202203546>>. Acesso em: 07-11-2022.
- 232 PORCHERON, G. et al. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence: Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria.

*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, 2013. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00090>>. Acesso em: 08-11-2022.

233 TIAN, M. et al. Phenol degradation and genotypic analysis of dioxygenase genes in bacteria isolated from sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 305–313, abr. 2017. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216313016>>. Acesso em: 08-11-2022.

234 GILLESPIE, J. J. et al. A Rickettsia Genome Overrun by Mobile Genetic Elements Provides Insight into the Acquisition of Genes Characteristic of an Obligate Intracellular Lifestyle. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 2, p. 376–394, jan. 2012. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256634/>>. Acesso em: 08-11-2022.

235 FLORES-DÍAZ, M. et al. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, v. 80, n. 3, p. 597–628, jun. 2016. ISSN 1092-2172. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981679/>>. Acesso em: 08-11-2022.

236 DRISCOLL, T. P. et al. Wholly Rickettsia! Reconstructed Metabolic Profile of the Quintessential Bacterial Parasite of Eukaryotic Cells. *mBio*, v. 8, n. 5, p. e00859–17, set. 2017. Publisher: American Society for Microbiology. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00859-17>>. Acesso em: 08-11-2022.

237 GAYWEE, J. et al. The Rickettsia prowazekii Invasion Gene Homolog (invA) Encodes a Nudix Hydrolase Active on Adenosine (5)-pentaphospho-(5)-adenosine. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 1, n. 3, p. 179–185, mar. 2002. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Publisher: Elsevier. Disponível em: <[https://www.mcponline.org/article/S1535-9476\(20\)34321-8/abstract](https://www.mcponline.org/article/S1535-9476(20)34321-8/abstract)>. Acesso em: 08-11-2022.

238 SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets: STRING v11. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D607–D613, jan. 2019. ISSN 1362-4962.

239 IMAI, T. et al. Group II truncated haemoglobin Yjbl prevents reactive oxygen species-induced protein aggregation in Bacillus subtilis. *eLife*, v. 11, p. e70467, set. 2022. ISSN 2050-084X. Publisher: eLife Sciences Publications, Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.70467>>. Acesso em: 11-11-2022.

240 JABLONSKA, J. et al. Systematic classification of the His-Me finger superfamily. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. 20, p. 11479–11494, nov. 2017. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkx924>>. Acesso em: 11-11-2022.

241 SHAO, L. et al. Characterization of a Functionally Unknown Arginine–Aspartate–Aspartate Family Protein From Halobacillus andaensis and Functional Analysis of Its Conserved Arginine/Aspartate Residues. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 807, abr. 2018. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996927/>>. Acesso em: 11-11-2022.

- 242 EICHER, S. C.; DEHIO, C. Bartonella entry mechanisms into mammalian host cells. *Cellular Microbiology*, v. 14, n. 8, p. 1166–1173, 2012. ISSN 1462-5822. \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1462-5822.2012.01806.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-5822.2012.01806.x>>. Acesso em: 12-11-2022.
- 243 SGRO, G. G. et al. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01078>>. Acesso em: 20-11-2022.
- 244 YOKOYAMA, H.; MATSUI, I. The lipid raft markers stomatin, prohibitin, flotillin, and HflK/C (SPFH)-domain proteins form an operon with NfeD proteins and function with apolar polyisoprenoid lipids. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 38–48, jan. 2020. ISSN 1040-841X. Publisher: Taylor & Francis \_eprint: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1716682>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1716682>>. Acesso em: 21-11-2022.
- 245 CHEN, X.; WONG, C.-H.; MA, C. Targeting the Bacterial Transglycosylase: Antibiotic Development from a Structural Perspective: Targeting the Bacterial Transglycosylase. *ACS Infectious Diseases*, v. 5, n. 9, p. 1493–1504, set. 2019. Publisher: American Chemical Society. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00118>>. Acesso em: 21-11-2022.
- 246 YAHASHIRI, A.; JORGENSON, M. A.; WEISS, D. S. The SPOR Domain, a Widely Conserved Peptidoglycan Binding Domain That Targets Proteins to the Site of Cell Division. *Journal of Bacteriology*, v. 199, n. 14, p. e00118–17, jun. 2017. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5494741/>>. Acesso em: 11-11-2022.
- 247 STEVENS, J. M.; GALYOV, E. E.; STEVENS, M. P. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 91–101, fev. 2006. ISSN 1740-1534. Number: 2 Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro1320>>. Acesso em: 11-11-2022.
- 248 KASAIJA, P. D. et al. Inspiring Anti-Tick Vaccine Research, Development and Deployment in Tropical Africa for the Control of Cattle Ticks: Review and Insights: Inspiring Anti-Tick Vaccine Research, Development and Deployment in Tropical Africa for the Control of Cattle Ticks. *Vaccines*, v. 11, n. 1, p. 99, dez. 2022. ISSN 2076-393X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9866923/>>. Acesso em: 22-02-2023.