

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Gabriel Cerqueira Alves Costa

**Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela
(*Amblyomma sculptum*)**

Belo Horizonte
Outubro de 2019

Gabriel Cerqueira Alves Costa

**Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela
(*Amblyomma sculptum*)**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em ciências, área de concentração: Entomologia.

Orientador: Ricardo Nascimento Araújo

Belo Horizonte
Outubro de 2019

043

Costa, Gabriel Cerqueira Alves.

Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*) [manuscrito] / Gabriel Cerqueira Alves Costa. - 2019.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Ricardo Nascimento Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Entomologia. 3. Carrapatos. 4. Imunogenicidade da Vacina. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

299/2019/13

entrada

2º/2015

2015747057

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Gabriel Cerqueira Alves Costa

Às quatorze horas do dia 30 de outubro do ano de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*)", área de concentração: Entomologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Ricardo Nascimento Araujo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Nascimento Araujo	UFMG	APROVADO
Dra. Aparecida Sadae Tanaka	UNIFESP - SP	APROVADO
Dr. Luciano Bastos Lopes	EMBRAPA - MT	APROVADO
Dr. Diego Felipe Alves Batista	UFMG	APROVADO
Dr. João Luiz Reis Cunha	UFMG	APROVADO

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADO
O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2019.

Dr. Ricardo Nascimento Araujo _____
(Orientador)

Dra. Aparecida Sadae Tanaka _____

Dr. Luciano Bastos Lopes _____

Dr. Diego Felipe Alves Batista _____

Dr. João Luiz Reis Cunha _____

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
SIAPE: 1517341

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar meu caminho e permitir a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador Professor Ricardo Nascimento Araújo por ter me dado a oportunidade de aprender mais a cada dia no laboratório e também pela grande paciência e dedicação nesses anos de orientação.

Aos professores Marcos Horácio, Maurício, Nelder, Leonardo e Grasielle, do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos pela disponibilidade, apoio e aprendizado ao longo da minha jornada no laboratório.

Aos técnicos César e a Márcia por todo o suporte, imprescindível, prestado diariamente e por transformar o ambiente de trabalho em um lugar muito mais agradável.

A todos amigos feitos ao longo dos anos no laboratório, pelo incentivo, ajuda, companheirismo e por fazer do ambiente de trabalho o lugar mais leve e tranquilo possível.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia e, em especial, à Sumara e Sibebe por toda a ajuda, disponibilidade e carinho.

Aos meus grandes amigos que sempre estiveram do meu lado e, como parte importante da minha vida, são diretamente responsáveis pelas minhas conquistas.

À Marina, que com todo o afeto, amor e dedicação me ajuda a ser uma pessoa melhor e faz tudo valer a pena.

Aos meus pais, Roberto e Margarete, e ao meu irmão, Miguel, que são o começo de tudo, meu ponto de referência. São eles que me dão motivação para atingir meus objetivos e correr atrás dos meus sonhos.

RESUMO

Amblyomma sculptum, carrapato da família Ixodidae, é uma espécie amplamente distribuída no Brasil e a única espécie do complexo *Amblyomma cajennense* descrita na região sudeste. É o mais importante vetor de *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira (FMB) e também relacionado a prejuízos econômicos na produção pecuária. Proteínas salivares e do intestino médio, expressas por carrapatos, desempenham um papel importante na alimentação e digestão de sangue. As proteínas salivares secretadas no sítio alimentar estão envolvidas em vários processos, como hemostasia e modulação da resposta imune, enquanto as proteínas expressas no intestino médio estão envolvidas na digestão da dieta, bem como na proteção do epitélio. Muitos genomas e transcriptomas das glândulas salivares e intestino médio de carrapatos têm sido produzidos nos últimos anos, abrindo novas possibilidades de estudos, já que a identificação e caracterização de novas proteínas salivares e intestinais altamente expressas durante o repasto sanguíneo do carrapato poderiam indicar quais apresentam maior importância para a biologia do parasito, podendo ser utilizadas como antígenos em futuras formulações vacinais. No presente estudo, o objetivo principal foi selecionar proteínas salivares e intestinais do carrapato *A. sculptum* e avaliar sua eficácia como antígenos vacinais. Dessa forma, foram selecionadas sequências codificadoras de proteínas salivares altamente expressas e relacionadas ao processo alimentar. Além disso, proteínas intestinais de membrana também foram selecionadas pelo seu nível de antigenicidade e seus epitopos preditos para células B foram ranqueados a fim de se construir uma proteína quimérica. Três proteínas salivares foram selecionadas e expressas de forma recombinante em bactérias: uma proteína de 8,7 kDa com um domínio de kunitz (rAsKunitz), uma proteína de 9,8 kDa relativa à família 8,9 kDa (rAs8.9kDa), exclusiva de carrapatos e uma proteína de 16,8 kDa identificada como uma *Basic tail* (rAsBasicTail). Seus recombinantes foram testados para investigar propriedades anticomplemento e anticoagulantes. Os ensaios realizados revelaram que todos eles foram capazes de inibir as vias clássica e alternativa do complemento. A rAsBasicTail foi o inibidor mais eficaz contra o fXa da cascata de coagulação e a tripsina, em comparação com outros recombinantes. Por outro lado, rAsKunitz apresentou inibição da trombina, com o melhor desempenho entre os recombinantes. Além das proteínas recombinantes salivares, uma recombinante quimérica foi construída com 22 epitopos de sete proteínas intestinais de membrana. As recombinantes salivares, intestinais e a proteína quimérica foram utilizadas para imunizar camundongos e testadas como antígenos vacinais contra a infestação de *A. sculptum*. A maior taxa de mortalidade foi observada em fêmeas

alimentadas em camundongos tratados com rAs8.9kDa e rAsKunitz (58,3% e 41,6%, respectivamente), enquanto a mortalidade de ninfas alimentadas em camundongos imunizados com rAs8.9kDa, rAsBasicTail e rAsQuimera foi de 100%. A eficácia dos antígenos salivares rAs8.9kDa e rAskunitz foi de 92,89% e 85,32%, respectivamente, enquanto a proteína quimérica foi o antígeno intestinal com maior taxa de eficácia, 80,84%. Estes dados indicam que os alvos selecionados poderiam ser utilizados como parte de uma formulação vacinal. Além disso, pudemos acrescentar algumas novas informações sobre as moléculas salivares envolvidas no processo hematofágico, aumentando a compreensão sobre a fisiologia de *A. sculptum*.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*; inibidores do complemento; anticoagulantes; hematofagia; vacina.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum, a tick from the Ixodidae family, is widely distributed in Brazil and is the only specie of the *Amblyomma cajennense* complex described in the southeastern region. It is the most important vector of *Rickettsia rickettsii*, which causes the brazilian spotted fever and is also related to economic losses on livestock production. Salivary and midgut proteins expressed by ticks play an important role in blood feeding and digestion. Salivary proteins secreted at the feeding site are involved on several processes, such as hemostasis and immune response modulation, while midgut proteins are involved in digestion as well as in the protection of epithelium. Many genomes and transcriptomes of tick's salivary glands and midgut have been produced along the last years, opening new study possibilities, since the identification and characterization of new salivary and midgut proteins highly expressed during tick feeding could indicate which of those are important molecules to the parasite's biology and able to be targeted as future vaccinal antigens. At the present study, the main goal was to identify and characterize highly expressed secreted salivary proteins related to blood feeding process. Moreover, midgut proteins attached to the epithelial membrane were also selected by their immunogenicity level. Then, their epitopes for B cells were ranked in order to build a chimeric protein constructed with epitopes of different midgut proteins. Three salivary proteins were selected and expressed in bacterial recombinant system: an 8.7 kDa protein containing one kunitz domain (rAskunitz), an 9.8 kDa protein highly similar to 8.9 kDa family proteins 9 (rAs8.9kDa) and a 16.8 kDa protein related to basic tail family (rAsBasicTail). The recombinants were tested in order to investigate anti complement and anti clotting properties. The performed assays revealed that all of them were able to inhibit the classical and alternative complement pathways. rAsBasicTail was the most effective inhibitor of factor Xa, from coagulation cascade and tripsin in comparison to the other recombinants. On the other hand, rAsKunitz presented the most expressive thrombin inhibition, which means this protein had the best performance among the recombinants against that enzyme. The salivary recombinants and the chimeric protein were employed in mice immunization and tested as vaccine antigens against *A. sculptum* parasitism. The highest mortality rate was observed among female fed in mice treated with rAs8.9kDa and rAsKunitz (58.3% and 41.6%, respectively), while the mortality rate of nimphs fed on mice immunized with rAs8.9kDa, rAsBasicTail and rAsQuimera reached 100%. rAs8.9kDa and rAsKunitz salivary antigens had the most expressive efficacy rate, 92.89% and 85.32%, respectively, while the most powerful midgut based antigen was the chimeric recombinant protein, reaching a 80.84% efficacy ratio. These

data indicate that the selected targets could be part of a vaccinal formulation. Furthermore, we were able to bring some new information about salivary molecules involved in the hematophagic process, amplifying the comprehension about *A. sculptum* physiology.

Keywords: *Amblyomma sculptum*; complement inhibitors; anticoagulants; hematophagy; vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas evolutivas de <i>A. sculptum</i> : Ovos (A); Larva (B); Ninfã (C) e Adultos: Macho (D) e Fêmea (E) (Neves et al. 2016).....	18
Figura 2: Representação da ativação da via clássica, via das lectinas e via alternativa do sistema do complemento. Adaptado de Schroeder et al. (2009).	22
Figura 3: Esquema representativo da cascata de coagulação (Paim 2010).	24
Figura 4: Características da estrutura primária da proteína AsKunitz.....	44
Figura 5: Características da estrutura primária da proteína As8.9kDa.....	45
Figura 6: Características da estrutura primária da proteína AsBasicTail.	47
Figura 7: Produtos da amplificação por PCR das sequências dos transcritos salivares visualizados em gel de agarose.....	48
Figura 8: Sequência de aminoácidos das proteínas salivares recombinantes produzidas em <i>E. coli BL21</i>	49
Figura 9: Visualização das proteínas recombinantes em SDS-PAGE de alíquotas purificadas de rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C) e western blotting com anticorpo anti-HIS.	50
Figura 10: Níveis relativos de mRNA's (expressão relativa) codificantes das proteínas AsKunitz (A), As8.9kDa (B) e AsBasicTail (C) na glândula salivar de fêmeas de <i>A. sculptum</i> durante o processo alimentar.	51
Figura 11: Níveis relativos de mRNA's (expressão relativa) codificantes das proteínas AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail no corpo das larvas (A) e ninfãs (B) de <i>A. sculptum</i> durante o processo alimentar.	52
Figura 12: Inibição da via clássica do sistema complemento por rAsKunitz(A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C).	53
Figura 13: Inibição da via alternativa do sistema complemento por rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C).	54
Figura 14: Bloqueio da atividade anticomplemento por anticorpos específicos contra rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C).	55
Figura 15: Inibição da cascata da coagulação por rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail.	56
Figura 16: Inibição da atividade proteolítica de Fator Xa pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail.	57
Figura 17: Inibição da atividade proteolítica de Fator II (trombina) pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail.	57

Figura 18: Inibição da atividade proteolítica de Tripsina pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail.	58
Figura 19: Características da estrutura primária da proteína AsMucin.	59
Figura 20: Características da estrutura primária da proteína AsAPP.	61
Figura 21: Características da estrutura primária da proteína AsLAMP.	63
Figura 22: Sequência de aminoácidos da proteína rAsQuimera.....	66
Figura 23: Amplificação da sequência de DNA codificante das proteínas AsMucin, AsAPP e AsLAMP por PCR. Produtos visualizados em gel de agarose a 1,5%.....	67
Figura 24: Sequência de aminoácidos das proteínas intestinais recombinantes produzidas em <i>E. coli BL21</i>	68
Figura 25: SDS-PAGE de alíquotas purificadas de rAsMucin (A), rAsAPP (B) e rAsLAMP (C).....	68
Figura 26: Western blotting de rAsMucin (A), rAsAPP (B) e rAsLAMP (C) utilizando anticorpos anti-cauda de histidina.	69
Figura 27: Análise da rAsQuimera em SDS-PAGE após produção em bactérias e purificação em colunas de níquel e <i>western blotting</i> utilizando anticorpos anti-cauda de histidina.....	70
Figura 28: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes e quimera e desafio com <i>A. sculptum</i>	71
Figura 29: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos intestinais recombinantes.	72
Figura 30: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais.	74
Figura 31: Parâmetros Alimentares de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais.....	75
Figura 32: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais intestinais..	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas ampliações por qPCR para avaliação da expressão gênica de AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail.	33
Tabela 2: Iniciadores utilizados nas ampliações por PCR para produção dos insertos.....	34
Tabela 3: Iniciadores utilizados nas ampliações por PCR para produção dos recombinantes intestinais.....	39
Tabela 4: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas salivares maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em <i>E. coli BL21</i>	49
Tabela 5: Epitopos selecionados a partir das proteínas de membrana de <i>A. sculptum</i>	65
Tabela 6: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas intestinais maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em <i>E. coli BL21</i>	67
Tabela 7: Mortalidade de fêmeas e ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com antígenos salivares recombinantes.	72
Tabela 8: Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com os antígenos salivares recombinantes de <i>A. sculptum</i> e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas.	76
Tabela 9: Mortalidade de fêmeas e ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com antígenos intestinais.	76
Tabela 10: Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com o extrato intestinal e antígenos intestinais recombinantes de <i>A. sculptum</i> e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APP - *Amyloid precursor protein* (Proteína precursora amiloide)
- BSA - *Bovine serum albumin* (albumina do soro bovino)
- CDD – *conserved domains database*
- cDNA - DNA complementar
- CDS - *coding sequence* (sequência codificante)
- cm – centímetro
- Ct- *cycle threshold value*
- d – dias
- DAB- dietil-amino-etil-benzidina
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DO – Densidade óptica
- dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato
- dsRNA - RNA de fita dupla
- DTT – ditioneitol
- EGTA - *egtazic acid*
- EST - *expressed sequence tag* (etiqueta de sequência expressa)
- fig – figura
- FMB – febre maculosa brasileira
- g - aceleração da gravidade
- GPI – *Glycosylphosphatidylinositol*
- hr - hora
- IC₅₀ - metade da concentração inibitória máxima
- IPG - *Immobilized pH gradient*
- IPTG - *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
- Isac – *Ixodes scapularis anticomplement*
- kDa- kilodaltons
- LAMP - *Lysosome-associated membrane glycoprotein*
- M – molar
- MAC – *membrane attack complex* (complexo de ataque à membrana)
- MBL - *Mannose-binding lectin* (Lectina ligante de manose)
- mg - miligramas
- min - minutos

mL – mililitro

mL - mililitros

mM - milimolar

mRNA - RNA mensageiro

MW – *molar weight*

n - número amostral

nm – nanômetro

nM – nanomolar

°C – graus celsius

ORF – *open reading frame* (janelas abertas de leitura)

pb - pares de base

PBS- *phosphate buffered saline* (tampão fosfato)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

qPCR - PCR quantitativo (= PCR em tempo real)

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNAi - interferência por RNA

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

seg - segundos

TSLPI - *Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor* (Proteína salivar de carrapato inibidora da via das lectinas)

V – volts

V-h – Volts/hora

V_{max} - Velocidade máxima

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Amblyomma sculptum</i>	17
1.1.1. Taxonomia e classificação	17
1.1.2. Ciclo e principais hospedeiros	17
1.1.3. Distribuição e epidemiologia	18
1.1.4. Importância do <i>A. sculptum</i>	19
1.2. Controle de carrapatos.....	20
1.3. Hematofagia e função de moléculas salivares e intestinais dos carrapatos	21
1.4. Sistema complemento	21
1.5. Inibidores do complemento.....	22
1.6. Cascata da Coagulação	23
1.7. Anticoagulantes.....	24
1.8. Vacinas contra carrapatos.....	25
1.9. Estudos de sequências gênicas em larga escala.....	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
• Selecionar, através de análises <i>in silico</i> , moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do <i>A. sculptum</i>	30
• Caracterizar funcionalmente os alvos salivares selecionados.	30
• Selecionar moléculas intestinais antigênicas através de análises <i>in silico</i> de transcriptomas de intestino de <i>A. sculptum</i>	30
• Avaliar a eficácia dos alvos selecionados como antígenos vacinais contra o <i>A. sculptum</i>	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Aspectos éticos	31
4.2. Manutenção da colônia de <i>A. sculptum</i> em laboratório	31
4.3. Seleção de moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do <i>A. sculptum</i>	31

4.4.	<i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	32
4.5.	<i>Análise da expressão gênica relativa dos alvos salivares por PCR em tempo real (qPCR)</i>	33
4.6.	<i>Produção das proteínas recombinantes dos alvos salivares</i>	33
4.7.	<i>Caracterização funcional dos alvos salivares selecionados</i>	35
4.7.1.	Avaliação da inibição do sistema do complemento humano	35
4.7.2.	Bloqueio da atividade anticomplemento pelos anticorpos contra as recombinantes salivares ...	36
4.7.3.	Avaliação da ação sobre a cascata da coagulação sanguínea	37
4.7.4.	Avaliação da inibição da atividade enzimática das serino proteases Fator Xa, Trombina e Tripsina. 37	
4.8.	<i>Seleção de moléculas intestinais antigênicas através de análises in silico de transcriptomas de A. sculptum</i>	38
4.9.	<i>Produção dos alvos intestinais recombinantes</i>	38
4.10.	<i>Produção de uma proteína recombinante quimérica contendo epitopos de proteínas intestinais</i>	39
4.11.	<i>Western blotting para avaliação das proteínas recombinantes produzidas</i>	39
4.12.	<i>Avaliação do potencial vacinal dos antígenos selecionados</i>	40
4.12.1.	Imunização dos hospedeiros	40
4.12.2.	Detecção de anticorpos antígeno-específicos no soro dos hospedeiros imunizados	40
4.12.3.	Infestação dos hospedeiros e avaliação da eficácia vacinal	41
4.13.	<i>Análise estatística</i>	42
5.	RESULTADOS	43
5.1.	<i>Seleção de moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do A. sculptum e produção de seus recombinantes</i>	43
5.2.	<i>Avaliação dos níveis de expressão da AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail em diferentes momentos da hematofagia de fêmeas, larvas e ninfas</i>	50
5.3.	<i>Caracterização funcional da rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail</i>	52
5.3.1.	Avaliação da ação sobre o sistema do complemento humano	52
5.3.2.	Bloqueio da atividade anticomplemento	54
5.3.3.	Avaliação da ação sobre a cascata da coagulação sanguínea	55
5.3.4.	Avaliação da ação sobre diferentes serino proteases que participam de sistemas biológicos	56
5.4.	<i>Seleção de moléculas intestinais imunogênicas de A. sculptum</i>	58
5.4.1.	Seleção de alvos vacinais através da identificação <i>in silico</i> de moléculas intestinais	58
5.4.2.	Montagem de um alvo vacinal através da identificação <i>in silico</i> de epitopos de moléculas intestinais.....	64

5.5.	<i>Avaliação do potencial vacinal dos antígenos selecionados contra o A. sculptum</i>	66
5.5.1.	<i>Produção das proteínas recombinantes para realização dos ensaios vacinais</i>	66
5.5.2.	<i>Avaliação do potencial vacinal dos alvos selecionados</i>	70
6.	DISCUSSÃO	79
7.	CONCLUSÕES	90
8.	REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Amblyomma sculptum*

1.1.1. Taxonomia e classificação

Amblyomma sculptum é uma espécie de carrapato pertencente à família Ixodidae, conhecida por agrupar os “carrapatos de corpo duro”, por possuírem um escudo rígido quitinoso na região dorsal. Essa, por sua vez, é dividida em dois grupos: o basal, chamado Prostriata, composto pelo gênero *Ixodes* e Metastriata, onde estão os demais gêneros (Nava et al. 2009). Essa espécie faz parte do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato, que agrupa ao menos outras cinco espécies distintas (*A. cajennense* sensu stricto, *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. tonelliae*), distribuídas do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O complexo era considerado anteriormente como uma única espécie, *Amblyomma cajennense*, até a realização de uma mudança taxonômica, verificada por meio de análises moleculares e morfológicas, que demonstrou que seus membros estão relacionados a diferentes áreas biogeográficas (Beati et al. 2013, Estrada-Peña et al. 2014, Nava et al. 2014).

1.1.2. Ciclo e principais hospedeiros

A. sculptum apresenta quatro estágios de desenvolvimento em seu ciclo, sendo eles os ovos, larvas, ninfas e adultos macho e fêmea (Fig. 1). Na fase adulta, ele é popularmente conhecido como “carrapato estrela” e “rodoleiro”, enquanto costuma ser denominado “vermelhinho” e “micuim”, para ninfas e larvas, respectivamente. Ele apresenta ciclo biológico do tipo trioxeno, necessitando de um hospedeiro diferente para cada estágio evolutivo, sendo que as mudas são realizadas no solo. Sabe-se também que seu ciclo apresenta sazonalidade ao longo do ano, visto que picos de infestações das formas imaturas podem ser observados durante os meses do outono-inverno, enquanto de adultos, durante a época da primavera-verão (Oliveira et al. 2003, Szabó et al. 2018).

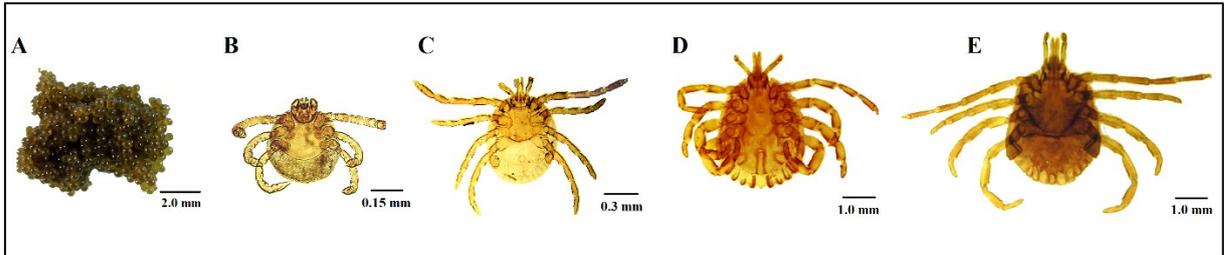


Figura 1: Formas evolutivas de *A. sculptum*: Ovos (A); Larva (B); Ninfã (C) e Adultos: Macho (D) e Fêmea (E) (Neves et al. 2016).

Uma alta especificidade para hospedeiros equinos, capivaras e antas pode ser observada para as formas adultas (Labruna et al. 2001, Van Der Heijden et al. 2005). Larvas e ninfãs, por sua vez, apresentam comportamento parasitário generalista, sendo capazes de realizar o repasto sanguíneo em uma série de diferentes hospedeiros vertebrados. Além do homem, bovinos, cães, suínos, coelhos, animais silvestres e aves, dentre outros hospedeiros já foram documentados sendo parasitados por *A. sculptum* (Lopes et al. 1998, Rojas et al. 1999, Szabó et al. 2018). Já foi observada também a facilidade de manter colônias de *A. sculptum* se alimentando em animais de laboratório como camundongos e coelhos (Lopes et al. 2008, Franco et al. 2016).

1.1.3. Distribuição e epidemiologia

Martins (2014) demonstrou a existência de pelo menos duas espécies de carrapatos pertencentes ao complexo *A. cajennense* distribuídas no território brasileiro, sendo elas *A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum*. *A. cajennense* s. s. foi encontrada sobretudo nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, enquanto *A. sculptum* foi descrita em todas as regiões do país, além de ser a única espécie do complexo presente no Sudeste. Essa está altamente associada ao clima tropical, presente em áreas de Pantanal, Mata Atlântica e, sobretudo, no bioma do Cerrado onde é amplamente distribuída (Martins et al. 2016). De acordo com Pajuaba Neto et al. (2018), a larga distribuição horizontal de *A. sculptum* em áreas de cerrado pode ter relação com a dispersão causada por pequenos hospedeiros.

A espécie ainda possui grande associação com humanos, que é comprovada pela alta prevalência em regiões urbanas e periurbanas, em áreas verdes e sombreadas (Souza et al. 2009). Pode se dizer que a disponibilidade de hospedeiros preferenciais, como as capivaras, nestes ambientes também está relacionada a altas infestações, já que esses animais são eficazes na manutenção do ciclo do carrapato e suas populações têm crescido em regiões urbanizadas, sobretudo pela alimentação abundante e a falta de predadores (Queirogas et al. 2012). Por fim,

é possível observar um comportamento agressivo, traduzido em um misto de procura ativa e espera em posições estratégicas pelo contato com o hospedeiro, realizado por *A. sculptum*. Essa característica contribui para o alto índice de parasitismo observado em pessoas, valor consideravelmente maior que para outras espécies da mesma região, como o *Amblyomma dubitatum*, por exemplo, que é uma espécie de carrapato adaptada a capivaras (Ramos et al. 2017, Pajuaba Neto et al. 2018).

1.1.4. Importância do *A. sculptum*

No Brasil, *A. sculptum* é considerado o principal carrapato em importância médica. Isso se deve, primeiramente, ao fato de ser a espécie mais associada às infestações em humanos e estar presente em áreas verdes de regiões urbanizadas e populosas (Guglielmone et al. 2006, Labruna 2009, Queirogas et al. 2012). Além disso, é também o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), que é a riquetsiose de maior ocorrência e maior gravidade no país, com mais de 1200 casos confirmados e 411 mortes entre 2007 e 2015 (Nava et al. 2014, de Oliveira et al. 2016, Martins et al. 2016).

Grande parte dos casos de FMB ocorridos, sobretudo na região sudeste, têm estreita relação com as populações de capivaras presentes em centros urbanos. Estas possuem papel importante na dinâmica de transmissão do patógeno da FMB por agir como hospedeiros amplificadores tanto dos vetores quanto da bactéria *R. rickettsii* para o carrapato, que não é capaz de manter a infecção ao longo de várias gerações através da transmissão vertical (Soares et al. 2012). Dessa forma, na maior parte das áreas endêmicas, as capivaras podem ser consideradas peças-chave, por portarem a bactéria e manter os níveis de infecção nos carrapatos que, por sua vez, acabam por disseminar o agente causador da doença (Szabó et al. 2013, Polo et al. 2017, Costa et al. 2019).

A. sculptum também pode estar envolvido na transmissão de outras bactérias do gênero *Rickettsia* possivelmente patogênicas, dentre elas, *Rickettsia parkeri*, *R. bellii*, *R. felis* e *R. amblyommatis*, além de espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, causadoras da Doença de Lyme-símile brasileira (Nascimento et al. 2016, Bitencourth et al. 2017, Sebastian et al. 2017).

Além de sua importância médica na saúde pública, *A. sculptum* representa grande interesse na medicina veterinária devido aos grandes prejuízos econômicos que causam na pecuária. Durante a alimentação, as fêmeas retiram grandes volumes de sangue, podendo causar comprometimento da capacidade produtiva dos hospedeiros e predispor a infecções

secundárias, instalação de miíases, desvalorização do couro dos hospedeiros, gastos com carrapaticidas, entre outros (Borges et al. 2002).

1.2. Controle de carrapatos

O controle das infestações por carrapatos depende intensamente do uso de acaricidas químicos. Arsênico já era utilizado para combater os parasitos desde o final do século XIX, mas a partir do início do uso em massa dos organoclorados, em meados dos anos 40, foi possível observar uma busca constante por novos produtos. (George 2000). Com isso, várias bases acaricidas surgiram no mercado, dentre elas os piretroides, as avermectinas e os organofosforados, que vem sendo amplamente utilizados.

A aplicação inadequada de produtos acaricidas nos animais é capaz de levar a seleção de populações resistentes e à contaminação da carne, do leite e do ambiente. Adicionalmente, o alto custo dos acaricidas também é um fator negativo em relação ao seu uso exclusivo para o controle (Jongejan & Uilenberg 1994). Portanto, o ideal é que o controle químico seja integrado com formas de controle estratégico alternativas como, por exemplo, o manejo das áreas de pastagem pela introdução de espécies resistentes ao parasito em áreas de alta densidade de carrapatos (De Castro 1997) e o sistema de integração lavoura-pecuária. Esse último é altamente desejável, já que a alternância do uso da área entre as duas atividades seria capaz de interromper o ciclo dos carrapatos presentes no local, de forma que após um ciclo de lavoura, grande parte dos carrapatos presentes no local iriam morrer pela falta de hospedeiros e a pastagem estaria praticamente “limpa”, permitindo a reintrodução de animais previamente tratados (Cançado et al. 2012).

O controle biológico também é uma alternativa, já que trabalhos mostraram eficácia na eliminação dos parasitos através do uso de fungos patogênicos, como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, que chegaram a levar à mortalidade de 100% de ninfas de *A. cajennense* (Lopes et al. 2007). Monteiro et al. (2014), por sua vez, reportaram a patogenicidade de nematódeos do gênero *Heterorhabditis* sobre o *Dermacentor nitens*. Ainda seguindo a linha da realização de metodologias de controle alternativas, extratos vegetais menos nocivos aos animais e ao ambiente vêm sendo testados em alternativa aos acaricidas tradicionais (Benelli et al. 2016).

A imunização dos animais também é uma medida que poderia ser integrada a outros métodos, a fim de otimizar os resultados do controle. No entanto, até o momento, nenhuma vacina contra *A. sculptum* está disponível no mercado.

1.3. Hematofagia e função de moléculas salivares e intestinais dos carrapatos

Os carrapatos ixodídeos são ectoparasitas hematófagos e permanecem no hospedeiro durante longos períodos de tempo, podendo chegar a várias semanas (Sonenshine 1991). A hematofagia é uma das fases mais arriscadas para o carrapato, pois é o momento em que, para a obtenção de sangue, eles precisam localizar a fonte alimentar e penetrar suas peças bucais na pele sem serem percebidos, já que a percepção do hospedeiro à picada poderia provocar uma interrupção precoce do repasto sanguíneo ou levar a uma reação mecânica que poderia levar à morte do parasito (Rossignol et al. 1985). Essa ameaça é contornada por diferentes adaptações que fazem com que o processo alimentar cause o mínimo de distúrbio no hospedeiro. Dentre estas, destacam-se as adaptações das peças bucais para a hematofagia, além da produção de um coquetel de moléculas bioativas nas glândulas salivares e no intestino, que contrapõem as reações imunes e hemostáticas desencadeadas no local da picada (Francischetti et al. 2009, Kotál et al. 2015, Šimo et al. 2017) e no sangue ingerido (Black & Kondratieff 2005). O sistema complemento e a coagulação são dois exemplos de importantes mecanismos da resposta imune e hemostática, respectivamente, exercidos pelos hospedeiros vertebrados ante a espoliação sanguínea e contrapostos por moléculas ativas produzidas pelos carrapatos.

1.4. Sistema complemento

O sistema do complemento é um dos mecanismos de defesa do sistema imune inato de vertebrados, o qual os carrapatos devem contrapor durante o processo alimentar. Se trata de um sistema com moléculas ativadas em cascata e que conta com mais de 30 glicoproteínas (Dunkelberger & Song 2010). Sua principal função é reconhecer e opsonizar ou lisar elementos estranhos como micro-organismos patógenos ou células alteradas e apoptóticas do próprio hospedeiro (Sim & Laich 2000).

A ativação do sistema complemento pode ocorrer através de três vias: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (Sim & Dodds 1997). A clássica é ativada por anticorpos IgM e IgG aderidos à superfície de agentes estranhos. A via das lectinas é bastante semelhante à via clássica, uma vez que ambas compartilham componentes, porém, a primeira é ativada quando a proteína plasmática lectina ligante a manose (MBL) reconhece resíduos de oligossacarídeos neutros contendo manose, N- acetilglicosamina ou fucose presentes na parede celular de vários tipos de microorganismos (Sim & Laich 2000, Chen & Wallis 2004). A via alternativa, por sua vez, se inicia de forma espontânea no plasma e em outros fluídos orgânicos quando a molécula

C3 é hidrolisada de forma espontânea ou por C3 convertases formando C3b, que se deposita em uma superfície de ativação e inicia a cascata (Sim & Dodds 1997). Após iniciadas, várias componentes intermediários são ativados em cascata e as três vias convergem para a formação das chamadas C5 convertases, que são os primeiros componentes da via comum. Estas enzimas dão continuidade à via comum, que culmina na construção do Complexo de Ataque à Membrana (MAC), levando à formação de poros na membrana celular da célula alvo (Dunkelberger & Song 2010) (Fig. 2).

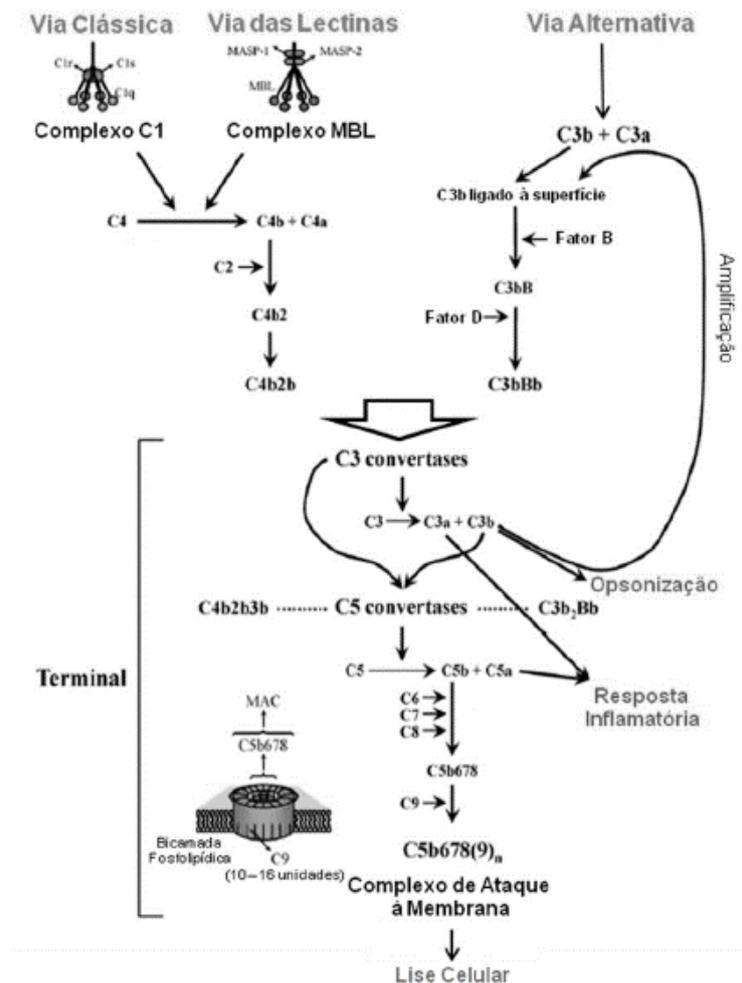


Figura 2: Representação da ativação da via clássica, via das lectinas e via alternativa do sistema do complemento. Adaptado de Schroeder et al. (2009).

1.5. Inibidores do complemento

Moléculas capazes de desempenhar atividade anticomplemento já foram identificadas e caracterizadas em uma série de parasitos hematófagos. As suas características podem ser bem variáveis nos diferentes grupos, podendo atuar em diversos pontos da cascata (Schroeder et al. 2009). A principal função dos inibidores secretados na saliva ou no lúmen intestinal é realizar

a proteção das células do trato digestivo, que entrarão em contato direto com o sangue ingerido. Este, por sua vez, carrega os componentes do complemento que, caso ativado no ambiente intestinal, culminaria em morte celular e, conseqüentemente, lesão tecidual (Barros et al. 2009).

Vários estudos já comprovaram a importância do sistema complemento e sua inibição no processo alimentar de carrapatos. Wikel & Allen (1977) observaram a diminuição da resistência a larvas de *Dermacentor andersoni* alimentadas em cobaias com baixos níveis de atividade do sistema do complemento. Kemp et al. (1989), por sua vez, demonstraram a presença de danos no epitélio intestinal de carrapatos em contato com moléculas ativas do sistema complemento. Por fim, Soares et al. (2005) silenciaram o gene relativo a uma proteína da família Isac em ninfas (*I. scapularis* salivary anticomplement) e relataram um peso significativamente menor após o repasto sanguíneo.

Diversos inibidores produzidos por carrapatos foram identificados e caracterizados. *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus*, vetores importantes de *Borrelia burgdorferi* no hemisfério norte, produzem inibidores salivares pertencentes à família Isac, atuantes sobre a via alternativa (Valenzuela et al. 2000, Daix et al. 2007, Tyson et al. 2008). A *Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor* (TSLPI) é um outro inibidor caracterizado na saliva de *I. scapularis*. No entanto, esse pertence à família das *Basic Tail Proteins* e atua sobre a via das lectinas (Schuijt et al. 2011a, b). *Rhipicephalus microplus*, por sua vez, já teve identificada uma proteína homóloga à família RaCI (*Rhipicephalus appendiculatus* C5 Inhibitor) de inibidores da via comum (Jore et al. 2016). Adicionalmente, a saliva de *R. microplus* também se mostrou capaz de inibir tanto a via clássica, quanto a alternativa (Silva et al. 2016).

Franco et al. (2016) demonstraram que a saliva e o extrato de glândulas salivares (EGS) de fêmeas de *A. sculptum* também possuem atividade anticomplemento, inibindo a via clássica. No entanto, até o momento, nenhum inibidor foi identificado ou caracterizado para a espécie em questão.

1.6. Cascata da Coagulação

A coagulação do sangue, da mesma forma que o sistema do complemento, ocorre em cascata, quando serino proteases atuam na conversão dos fatores inativos, culminando na ativação da trombina e formação de um trombo de fibrina, com o objetivo de evitar a perda de sangue (Furie 2009). Essa cascata pode ser ativada por duas diferentes vias: a intrínseca, ativada a partir do contato do sangue com superfícies hidrofílicas e a via extrínseca, iniciada pela formação de um complexo (fVIIa/FT) entre o fator tecidual presente na superfície das células e

o fator VIIa, que se encontra no sistema vascular. Na primeira, a proteína plasmática denominada fator XII é auto-ativada e cliva a pre-caliceína, dando origem a caliceína. Essa, por sua vez, ativa mais fXII, levando a ativação subsequente de fXI, fIX, fX e protrombina. Já a ativação da segunda ocorre a partir de uma lesão tecidual, culminando na formação do complexo fVIIa/FT, que por sua vez, induz a ativação do fX e protrombina (Versteeg et al. 2013). Ambas as vias convergem para a formação de fXa, que converte protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), e culmina na conversão de fibrinogênio em fibrina, que dá origem ao coágulo (Adams & Bird 2009). (Fig. 3).

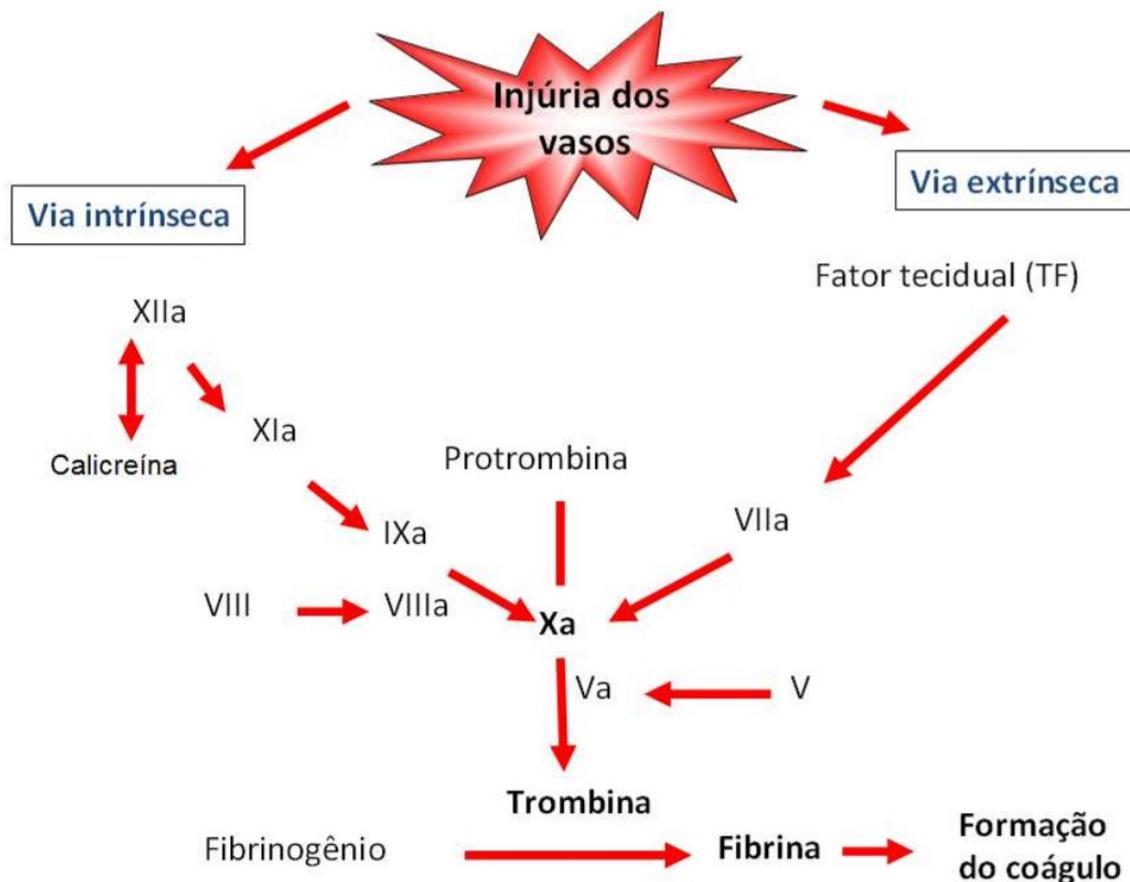


Figura 3: Esquema representativo da cascata de coagulação (Paim 2010).

1.7. Anticoagulantes

Artrópodes hematófagos enfrentam os mecanismos de manutenção da hemostasia exercidos pelo hospedeiro durante o repasto sanguíneo. A fluidez do sangue é necessária para que os parasitos consigam obter o volume necessário durante o processo alimentar e também durante a digestão. Portanto é importante que esses organismos produzam moléculas anticoagulantes capazes de opor a cascata da coagulação sanguínea (Koh & Kini 2009).

A importância da inibição da coagulação realizada por carrapatos foi demonstrada em trabalhos como o realizado por Kim et al. (2016), no qual observou-se diminuição de 50% na ingestão de sangue por fêmeas silenciadas por RNA de interferência (RNAi) relativo a AAS19, uma serpina salivar de *Amblyomma americanum* capaz de atuar sobre fXa, fXIa, fIIa, fIXa e fXIIa. Resultado semelhante foi observado por Gao et al. (2011) que, através do silenciamento da rhipilina-1, um inibidor do tipo kunitz produzido por *Rhipicephalus haemaphysaloides*, obteve diminuição da taxa de fixação dos carrapatos em 52,5% e diminuição de 21,9% do ganho de peso.

Proteínas com função anticoagulante foram amplamente descritas no conteúdo salivar e intestinal de artrópodes hematófagos de diversos grupos (Champagne 2004), dentre eles, os carrapatos. Vários inibidores expressos por carrapatos foram caracterizados e atuam sobre a trombina: amblina é um inibidor presente na hemolinfa de *Amblyomma hebraeum*, enquanto boophilina e ixophilina são inibidores intestinais de *R. microplus* e *I. scapularis*, respectivamente e atuam sobre esse fator da cascata da coagulação, além de apresentar em suas sequências, domínios do tipo Kunitz/BTPI (Lai et al. 2004, Macedo-Ribeiro et al. 2008, Narasimhan et al. 2013). IxscS-1E1, uma serpina salivar expressa por *I. scapularis*, foi capaz de inibir tripsina e trombina, além de atrasar o tempo de protrombina (Ibelli et al. 2014). Já a Salp14, também presente no conteúdo salivar do mesmo carrapato, é caracterizada como uma *Basic tail protein*, atuando na inibição da atividade do fXa (Das et al. 2001, Narasimhan et al. 2002, Ribeiro et al. 2006). Uma outra proteína salivar de *I. scapularis* e homóloga à salp14 é a ixonnexin. No entanto, ela se mostrou capaz de aumentar a atividade catalítica do fXa, além de atuar na fibrinólise, possivelmente através de um mecanismo em que mimetiza a fibrina e interage com o fibrinogênio (Assumpção et al. 2018). A saliva de *I. scapularis* também é capaz de inibir o complexo formado por fVIIa/TF, através da ixolaris, proteína que apresenta dez cisteínas e dois domínios tipo Kunitz em sua estrutura (Francischetti et al. 2002).

Em *A. sculptum*, foram identificadas e caracterizadas a amblyomin-X, uma proteína salivar do tipo Kunitz, também inibidora da atividade do complexo FVIIa/TF e do FXa (Batista et al. 2010) e a sculptina, inibidora salivar de trombina com regiões homólogas às hirudinas (Iqbal et al. 2017).

1.8. Vacinas contra carrapatos

Estudos em busca de antígenos que possam ser utilizados em uma vacina contra os carrapatos vêm sendo realizados há mais de quarenta anos (Roberts 1968). Uma série de

antígenos já foi testada, dentre eles, proteínas relacionadas à detoxificação de heme, proteínas presentes e/ou transportadas para o ovo, proteínas envolvidas na expressão gênica, proteínas salivares e intestinais (Willadsen 2004, Parizi et al. 2009, 2012, Guerrero et al. 2012, Merino et al. 2013). Apesar de todos estes estudos, até o momento, só foram produzidas comercialmente apenas três vacinas (sob os nomes TickGARD, Gavac[©] e Ixovac[®]), sendo que todas têm como base o antígeno oculto Bm86, uma glicoproteína intestinal de *R. microplus* (Willadsen et al. 1989, Canales et al. 1997). Os anticorpos do tipo IgG gerados pelo hospedeiro contra o antígeno seriam ingeridos pelo carrapato junto ao sangue e, no lúmen intestinal, se ligariam às Bm86 presentes na membrana, ativando a via clássica do sistema do complemento e culminando em lesão tecidual. Dessa forma, foi possível observar a diminuição do número de fêmeas ingurgitadas, do ganho de peso e da oviposição, contribuindo assim, para o controle dos níveis de parasitismo (Rodríguez-Valle et al. 1995, 2012). Apesar de ter sido inovadora, essa vacina apresenta algumas desvantagens, como o fato do seu efeito ser tardio, uma vez que sua ação é observada na redução da infestação larval em uma geração subsequente, o que faz com que a vacina perca competitividade com os acaricidas, capazes de realizar um efeito *knock-down*, mais eficaz a curto prazo (de la Fuente et al. 2007). Um segundo ponto importante é a variação de eficiência em diferentes regiões e países. Estudos mostraram que esta eficiência pode variar de 51 a 91% (revisado por Parizi et al. 2009), provavelmente devido ao polimorfismo apresentado pelo Bm86 de carrapatos de cada região (Garcia-Garcia et al. 2000).

Na tentativa de minimizar estes problemas, uma proteína com função homóloga à Bm86, chamada de Bm95, foi identificada e apresentou resultados mais constantes entre rebanhos (Garcia-Garcia et al. 2000). Outra estratégia foi o sequenciamento da Bm86 de 20 isolados de carrapatos que identificou a região mais similar entre eles para produção de um peptídeo sintético (SBm7462[®]) que seria utilizado na formulação de uma vacina comercial (Patarroyo et al. 2002, Peconick et al. 2008b). No entanto, até o momento, os antígenos vacinais comercialmente disponíveis ainda não asseguram um grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (de la Fuente et al. 2007).

A maior parte dos trabalhos sobre a formulação de vacinas anticarrapatos desenvolvidos até o momento foi focada no *R. microplus*, o que é justificado pelo grande prejuízo econômico no setor agropecuário causado por seu parasitismo. No entanto, também foram realizados estudos que buscaram selecionar antígenos capazes de compor vacinas quiméricas com diferentes epitopos, que seriam eficientes contra mais de uma espécie de carrapato e poderiam ser utilizadas por diferentes hospedeiros (De La Fuente & Contreras 2015).

A partir do número crescente de trabalhos que desenvolveram genomas e transcriptomas de diversas espécies de carrapatos, uma abordagem *in silico* para o desenvolvimento de vacinas vem sendo cada vez mais utilizada. A estratégia, chamada de vacinologia reversa, consiste em analisar as sequências identificadas em genomas e transcriptomas, selecionando, de acordo com softwares de bioinformática, aquelas com características imunogênicas que, em seguida, serão testados em ensaios vacinais para avaliação de sua eficiência no controle dos parasitos (Rodríguez-Valle & Guerrero 2018).

1.9. Estudos de sequências gênicas em larga escala

Nos últimos anos, o número de sequências gênicas de seres vivos depositadas nos bancos de dados vem aumentando de forma considerável (Stephens et al. 2015). Sequências pertencentes a artrópodes vetores são depositadas como genomas, bibliotecas de DNA complementar (cDNA) de tecidos / órgãos ou etiquetas de sequências expressas (EST) em diferentes bancos, como o GenBank/Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database.

Estudos nos quais foram realizados transcriptomas do intestino de carrapatos, ou mialomas, já foram conduzidos para diferentes espécies, como o *Dermacentor variabilis* (Anderson et al. 2008), *I. ricinus* (Kotsyfakis et al. 2015b) e *Haemaphysalis flava* (Xu et al. 2016). Dentre os estudos, foram produzidos recentemente dois transcriptomas intestinais de *A. sculptum*. Moreira et al. (2017) identificaram 25.569 sequências codificantes (CDS) relacionadas ao intestino de fêmeas ingurgitadas (8-10 dias de repasto sanguíneo), com destaque para sequências codificadoras de proteínas imunomodulatórias. Martins et al. (2017) também publicaram um mialoma, no qual encontraram 9.560 CDSs. Nesse mesmo estudo foi avaliada a modulação de genes em função da infecção das fêmeas com *R. rickettsii*. Neste trabalho, os autores observaram uma regulação de 479 genes e destes, 416 tiveram sua expressão aumentada.

Até o momento, já existe uma série de transcriptomas realizados a partir das glândulas salivares (sialomas) de carrapatos, como *I. scapularis* (Ribeiro et al. 2006), *I. pacificus* (Francischetti et al. 2005), *Hyalomma excavatum* (Ribeiro et al. 2017), *R. microplus* (Santos et al. 2004) e *D. andersoni* (Alarcon-Chaidez et al. 2007). *A. sculptum*, especificamente, também teve transcriptomas das glândulas salivares realizados em trabalhos anteriores: Batista et al. (2008) revelaram 1.754 ESTs através da análise de uma biblioteca de cDNA gerada a partir de glândulas salivares de fêmeas alimentadas por cinco dias. Observou-se que 6,5% das sequências foram relativas a proteínas envolvidas no processo alimentar, com destaque para proteases e

inibidores de proteases. No trabalho realizado por Garcia et al. (2014), foram identificadas 4.604 CDSs e, dessas, 1.015 foram relativas a proteínas secretadas, com destaque para proteínas com domínio kunitz. Moreira et al. (2017), por sua vez, identificaram 10.697 em um sialoma de *A. sculptum* e dentre as mais expressas, estavam as sulfotransferases, kunitz, lipocalinas, serpinas e imunomoduladores. Por fim, no transcriptoma realizado por Esteves et al. (2017), utilizando fêmeas em jejum ou alimentadas por 72 horas, foram identificadas 9.560 CDSs. Observaram também que o número de leituras relativas a proteínas secretadas correspondeu a 36% no transcriptoma de fêmeas alimentadas, enquanto ficou na faixa de apenas 11% para o das fêmeas em jejum.

Adicionalmente, existe uma seleção de sequências contendo informações de 3.454 proteínas salivares (classificadas como provavelmente secretadas) extraídas de janelas abertas de leitura (ORF) de várias espécies de ixodídeos (como *Amblyomma variegatum*, *A. americanum*, *A. cajennense*, *R. appendiculatus*, *R. (B.) microplus*, *Ixodes pacificus*, *I. scapularis*, *I. ricinus*,) e argasídeos (como *Ornithodoros parkeri*, *Ornithodoros moubata*, *Argas monolakensis*) (Francischetti et al. 2009).

Além dos transcriptomas, outra ferramenta utilizada em genômica funcional bastante popularizada nos últimos estudos gênicos em carrapatos é o RNAi, utilizado para silenciamento gênico. Essa técnica se mostrou bastante útil para avaliação funcional de genes, seleção e caracterização de antígenos contra carrapatos, contribuindo para o maior entendimento de seus sistemas biológicos, além de gerar novas possibilidades no desenvolvimento de vacinas (Kocan et al. 2011). de la Fuente et al. (2010) utilizaram essa técnica na seleção de antígenos vacinais contra *A. americanum*, enquanto uma abordagem semelhante foi utilizada para *R. microplus* (Almazán et al. 2010).

O fato do número de sequências referentes a proteínas salivares e intestinais de carrapatos depositadas nos diversos bancos de dados ter aumentado de maneira considerável nos últimos anos representa uma grande vantagem, sobretudo nas linhas de pesquisa relacionadas a estudos de caracterização de moléculas envolvidas no processo hematofágico. Partindo do pressuposto de que inibidores de serino proteases estão altamente envolvidos na regulação da resposta imune e hemostasia contra o repasto sanguíneo realizado por carrapatos (Mulenga et al. 2001), a publicação de novas sequências também se traduz no aumento do número de alvos disponíveis a serem utilizados em formulações vacinais que visem realizar o controle de carrapatos.

2. JUSTIFICATIVA

A. sculptum é a espécie brasileira de carrapato de maior importância na medicina humana por ser o vetor da Febre Maculosa Brasileira. Na medicina veterinária, o carrapato estrela é responsável por consideráveis prejuízos relacionados principalmente à espoliação sanguínea, que leva à queda na produção, predisposição a diversas doenças (incluindo outras parasitoses) e gastos com mão de obra e medicamentos. Essa espécie de ixodídeo apresenta um perfil alimentar generalista (podendo parasitar diferentes mamíferos e o homem), o que aumenta sua importância como parasito de humanos e animais.

Apesar da existência de vários métodos de controle para carrapatos, o uso de acaricidas ainda continua sendo a prática mais usual. Entretanto, essa possui desvantagens, como o desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos e a contaminação dos produtos de origem animal. Além disso, programas de controle estratégico contra o carrapato estrela recomendam um alto número de aplicações de carrapaticidas ao longo do ano (até 16 intervenções/ano), prática extremamente laboriosa e difícil de ser utilizada em animais de manejo precário. Desta forma, a busca por novos métodos torna-se um desafio e uma necessidade para minimizar o uso de acaricidas. A identificação, produção e caracterização de moléculas com potencial vacinal poderiam auxiliar na elucidação de aspectos que possam afetar a hematofagia do carrapato, gerando informações importantes relacionadas à forma de combate desses artrópodes, além de permitir a produção de vacinas contra *A. sculptum*. A utilização de vacinas ainda poderia reduzir a mão de obra envolvida, uma vez que um número menor de intervenções seriam necessárias (normalmente três doses iniciais com reforço semestral ou anual), viabilizando sua aplicação em animais de difícil manejo como, por exemplo, os silvestres. Dessa forma, o desenvolvimento de uma estratégia de controle do parasito mais eficaz seria de grande importância na diminuição de suas populações no ambiente e, conseqüentemente, da transmissão da *R. rickettsii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar proteínas salivares e intestinais importantes para o desenvolvimento do *A. sculptum* e avaliar sua eficácia como antígenos a serem utilizados em formulações vacinais.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar, através de análises *in silico*, moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do *A. sculptum*.
- Caracterizar funcionalmente os alvos salivares selecionados.
- Selecionar moléculas intestinais antigênicas através de análises *in silico* de transcriptomas de intestino de *A. sculptum*.
- Avaliar a eficácia dos alvos selecionados como antígenos vacinais contra o *A. sculptum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo imunização de camundongos e coleta de material biológico foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob o protocolo de número 103/2017 (Anexo I).

4.2. Manutenção da colônia de *A. sculptum* em laboratório

Para a manutenção da colônia de *A. sculptum*, os carrapatos foram mantidos em estufa BOD em condições de temperatura e umidade controladas ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ de umidade). A manutenção do ciclo ocorreu através da alimentação das larvas, ninfas e adultos em camundongos da linhagem *Swiss*, de acordo com a metodologia de Bouchard & Wikel (2005), em que os carrapatos são colocados em câmaras de alimentação fixadas com cola atóxica na região dorsal dos hospedeiros, onde completam o repasto sanguíneo. Larvas e ninfas foram alimentados nas câmaras em grupos de aproximadamente, 50 e 20 espécimes, respectivamente, por camundongo. Um casal de adultos, por sua vez, foi colocado em cada câmara de alimentação. As fêmeas ingurgitadas foram, em seguida, colocadas em placas de cultura com 6 poços, onde realizaram a oviposição e os ovos produzidos, armazenados em potes fechados com voal capaz de impedir a saída das larvas após a eclosão.

4.3. Seleção de moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do *A. sculptum*

As buscas pelos alvos salivares foram feitas utilizando as informações de moléculas de *A. sculptum* disponíveis nos bancos de dados (NCBI) e no transcriptoma de glândulas salivares de fêmeas parcialmente alimentadas (não publicado) que foi realizado através de nossa parceria com os Drs. Jesus Valenzuela e Fabiano Oliveira do NIH (EUA). A seleção das moléculas salivares presentes na saliva de *A. sculptum* foi realizada com base em domínios e características de suas sequências de aminoácidos que fossem indicativas de atividade anti-hemostática ou imunossupressora. A busca por domínios nas sequências salivares foi realizada através dos serviços de busca nos bancos de dados Conserved Domain Database (CDD)

(Marchler-Bauer et al. 2005) e Pfam (Finn et al. 2014). Os alinhamentos com proteínas caracterizadas funcionalmente foram realizados a partir da ferramenta Clustal Omega (Sievers & Higgins 2018) e a busca por epitopos lineares para células B contidos nas sequências peptídicas foi realizada pela ferramenta ABCpred (Saha & Raghava 2006), com o threshold de 0.85, afim de se aumentar a especificidade na predição de epitopos. Foram utilizadas as ferramentas NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al. 2004) e NetOGlyc 4.0 Server (Steentoft et al. 2013) para a identificação de possíveis sítios de N-glicosilação e O-glicosilação que possam estar presentes nas proteínas nativas. Adicionalmente, os níveis de expressão dos alvos na glândula salivar de *A. sculptum*, estimados através do número de leituras (RPKM) no transcriptoma, foram outro fator considerado para a seleção. Por fim, todos os alvos teriam que ser obrigatoriamente secretados e foram analisados para a verificação presença de peptídeo sinal por meio do programa SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011).

4.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

Fêmeas *A. sculptum*, a partir de um período de 20-40 dias após a muda e, em jejum ou retiradas do hospedeiro após 1, 3, 5 ou 8 dias de alimentação, tiveram suas glândulas salivares dissecadas em solução salina 0,9% com o auxílio de micro pinças. As glândulas foram transferidas individualmente para microtubos de 1,5 mL contendo 50 uL de Trizol® Reagent (Life Technologies®), onde foi realizada a homogeneização mecânica com auxílio de pistilo e os demais procedimentos para extração de RNA de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™) e a produção de cDNA feita a partir da reação com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®). O mesmo procedimento foi realizado com larvas e ninfas, a partir de um período de 20-40 dias após eclosão dos ovos (larvas) ou muda (ninfas), em jejum ou retiradas do hospedeiro após três dias de alimentação. A extração do RNA foi realizada de todo o corpo das larvas (cinco por tubo) e ninfas (duas por tubo).

Para o cDNA feito a partir do intestino, a extração de RNA foi feita de um *pool* de três intestinos de fêmeas parcialmente alimentadas (aproximadamente 5 dias), dissecados em situação semelhante à das glândulas e colocados em 300 uL de Trizol®.

4.5. Análise da expressão gênica relativa dos alvos salivares por PCR em tempo real (qPCR)

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica dos alvos salivares selecionados, em diferentes etapas do processo alimentar, foi realizada a quantificação dos níveis de mRNA codificantes de cada alvo através da qPCR.

As reações de qPCR foram preparadas em triplicata utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (*Applied Biosystems*), 1 μ L do produto da síntese dos cDNA's relativos às glândulas salivares, larvas ou ninfas, 200 nM de cada iniciador desenhado no presente estudo (Tab. 1) e água Milli-Q, em um volume final de 25 μ L. Foram utilizados controles negativos para cada par de iniciadores, com água em substituição ao cDNA, para detectar possíveis dímeros formados pelos iniciadores ou contaminações, e controles com RNA em substituição do cDNA, para detectar possíveis amplificações de DNA genômico. Os ciclos de amplificação foram: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. As reações foram processadas no equipamento termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems*). A quantificação relativa de transcritos-alvo para cada amostra foi determinada a partir do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen 2001), utilizando o gene de referência “fator de alongamento 1 α ” (ELF₁A) (Moura-Martinião et al. 2017), para a normalização dos resultados obtidos.

Tabela 1: Iniciadores utilizados nas amplificações por qPCR para avaliação da expressão gênica de AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail.

Alvo	Iniciador direto	Iniciador reverso	Produto (pb)
AsKunitz	5' AGACGCCAACCTGCTTTCTA	5' ATTGTCCCTCCTTCGCTTTT	105
As8.9kDa	5' TCTGTACCCTCGTCGCTTTT	5' AGCGTGTTACGCTCGAAGAT	118
AsBasicTail	5' TTTTGGGCGAAGGATAACAC	5' TTTGGCTTCTTCGTGCTTTT	125
ELF ₁ A	5' CGTGCCACAAAATCCTTAT	5' GGAAGTCTCAAAGCCGGTA	153

4.6. Produção das proteínas recombinantes dos alvos salivares

Os alvos salivares selecionados a partir dos bancos de dados e transcriptomas foram produzidos de forma recombinante. Para isso, iniciadores relativos a cada sequência foram desenhados através do software Primer3 (Rozen & Skaletsky 1999) e utilizados em reações de PCR para produção dos insertos (relativos às sequências codificadoras das proteínas maduras) a serem clonados. Os iniciadores diretos receberam o sítio de restrição *XhoI* (CTCGAG) e os reversos o sítio *NheI* (GCTAGC) (Tab. 2).

Tabela 2: Iniciadores utilizados nas ampliações por PCR para produção dos insertos.

Alvo	Iniciadores diretos	Iniciadores reversos	Produto (pb)
AsKunitz	5' CTCGAGTATAAACGGCCCAAATTTTGCT	5' GCTAGCTCATGGGGCGTTGAGAATA	234
As8.9kDa	5' CTCGAGGTCCAGGAACATGGCCACTC	5' GCTAGCGTTGGTGCCATCGCAGACT	264
AsBasicTail	5' CTCGAGTATGATATTGTCCGTGGTTGC	5' GCTAGCTTCGCCCAGGATTTTACCAT	459

Inicialmente, os insertos foram produzidos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os seguintes ciclos: 1x - separação de fitas a 94°C / 5 min; 30x - separação de fitas a 94°C / 40 seg, anelamento 60°C / 40 seg, extensão 72°C / 40 seg; 1x - extensão 72°C / 7 seg. O cDNA produzido a partir de glândulas salivares de fêmeas parcialmente alimentadas foi utilizado como molde. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose 1,5% (*Sigma-aldrich*®) e os produtos relativos a cada um dos alvos selecionados foram purificados do gel pelo kit Wizard® DNA Clean-Up System (*Promega*®) e clonados separadamente no vetor pGEM-T-Easy (*Promega*®) de acordo com as recomendações do fabricante. Os vetores foram inseridos em células competentes *E. coli* da linhagem DH5α através de choque térmico (mantidas em gelo por 15 min, transferidas para banho-maria a 42°C por 45 seg e, recolocadas no gelo por 2 min). Em seguida, as bactérias foram distribuídas em placas de Petri com meio LB e ampicilina (100 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C. As colônias contendo as construções plasmidiais corretas (visualização das bandas relativas aos insertos após PCR) foram selecionadas por PCR utilizando os iniciadores da Tabela 2, cultivadas em 10 mL de meio LB líquido e tiveram os plasmídeos purificados utilizando o kit The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*®). Em seguida, foi realizada a digestão do vetor nos sítios de restrição *NheI* e *XhoI*, a partir do uso das enzimas de restrição correspondentes, de acordo com as especificações do fabricante (*Promega*®). A Separação dos vetores digeridos e insertos foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. As bandas correspondentes aos insertos foram retiradas e tiveram o DNA purificado pelo kit Wizard® DNA Clean-Up System (*Promega*®). Foi realizada, então, a clonagem dos insertos obtidos em vetor de expressão pET28a(+) 6xHis-TEV através de enzima T4 DNA Ligase (*Promega*®). Os insertos clonados no vetor de expressão foram avaliados por meio de sequenciamento, realizado pela empresa Myleus Biotecnologia, para verificação da efetividade do protocolo de clonagem. A transformação, por sua vez, foi realizada em bactérias *E. coli* DH5α, por choque térmico. Após a amplificação plasmidial nas bactérias, foi feita nova purificação dos plasmídeos e transformação, dessa vez na bactéria *E. coli* BL21. Posteriormente as bactérias foram distribuídas sobre placas de petri com meio LB, ágar e kanamicina (50 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37 °C. A expressão dos recombinantes foi feita através das

colônias obtidas nas placas. O crescimento das bactérias foi feito a 37°C sob agitação, até que atingissem a absorbância de 0,4-0,6 na OD₆₀₀, quando foi feita a indução da expressão por adição de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (0,4 mM) e crescimento a 37°C sob agitação *overnight*. O processo de purificação foi realizado a partir do método desnaturante recomendado para o kit ProBond™ Purification System (*Invitrogen*®) em coluna com afinidade para cauda de histidina. As alíquotas eluídas foram analisadas por meio de SDS-PAGE 12,5% corado com nitrato de prata, para a confirmação da presença dos recombinantes e, aquelas que possuíram as bandas referentes aos alvos, misturadas. As frações contendo cada um dos recombinantes foram dialisadas em membranas de diálise (*Sigma-aldrich*®) num volume 200x maior de tampão fosfato pH 7,4 a 4°C. Para a renaturação das proteínas produzidas, ditioneitol (DTT) na concentração final de 10 mM foi adicionado aos tubos contendo cada recombinante e o processo de diálise repetido novamente *overnight* a 4°C. As diferentes proteínas recombinantes foram dosadas por método de Bradford (1976), alíquotadas e estocadas a -20°C.

4.7. Caracterização funcional dos alvos salivares selecionados

4.7.1. Avaliação da inibição do sistema do complemento humano

Nos ensaios realizados *in vitro* para avaliação da inibição da via clássica do sistema do complemento, foram utilizadas hemácias do sangue de um carneiro mantido na Escola de Veterinária da UFMG. O sangue foi retirado da veia jugular do animal em um tubo que continha volume igual de solução conservadora anticoagulante (ácido cítrico 0,05%, citrato de sódio 0,8%, glicose 2,05%, NaCl 0,42%), alíquotado e armazenado a 4°C. As hemácias foram tratadas da seguinte forma antes de serem utilizadas no ensaio: o sangue/solução conservadora foi centrifugado a 2.000 g por 5 min a 4°C e o sobrenadante descartado; as células foram ressuspensas em solução GHB-EDTA (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, EDTA 10 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4) e centrifugadas novamente por três vezes; após as lavagens, as células foram ressuspensas em solução GHB-EDTA e opsonizadas com anticorpos IgG anti-hemácia de carneiro produzidos em coelhos (*Sigma-aldrich*®) na diluição 1:1.000 por 30 min a 37°C sob baixa agitação; lavadas novamente uma vez com solução GHB-EDTA e duas com GHB²⁺ (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, CaCl₂ 0,15 mM, MgCl₂ 0,5 mM e gelatina 0,1%, pH 7,4); a concentração das hemácias foi ajustada para 2x10⁸ células/mL em solução GHB²⁺. Foi utilizado

um *pool* de soro humano obtido do sangue de voluntários saudáveis do laboratório, que foi alíquotado e congelado a -80°C até a data do ensaio.

Para cada ensaio, foram adicionados três controles (Hemólise total, Positivo e Negativo) e as amostras contendo as proteínas recombinantes em diferentes concentrações. Amostras tratadas com proteinase K ($0,5\ \mu\text{g}$) foram incubadas por 3 horas a 42°C e fervidas por 30 min e foram usadas como controle negativo da atividade das proteínas. Em tubos de 1,5 mL foram adicionados: $25\ \mu\text{L}$ de tampão fosfato (PBS) contendo recombinante (ou puro para os controles), $25\ \mu\text{L}$ de soro humano na diluição 1:30 em GHB^{2+} (ou tampão puro para controle negativo) e $25\ \mu\text{L}$ de hemácias de carneiro na concentração ajustada. Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C para a ativação do complemento e, em seguida, foi adicionado $250\ \mu\text{L}$ de tampão fosfato em cada tubo (água destilada para hemólise total). A centrifugação dos tubos foi realizada a $1700\ \text{g}$ por 1 min e foi aspirado o volume de $200\ \mu\text{L}$ do sobrenadante de cada, sendo transferidos para placa de 96 poços, na qual foi feita a leitura no comprimento de onda de 414 nm em leitor de ELISA (*VersaMax*TM). Os testes foram realizados em duplicata e com, ao menos, três repetições. A hemólise mediada pelo complemento foi estimada a partir do valor da absorbância de cada amostra (decrecida do valor do controle negativo) em relação ao controle positivo, que foi considerado como 100%.

Nos ensaios realizados para avaliação da inibição da via alternativa do sistema do complemento, foram utilizadas hemácias provenientes da coleta por punção da veia auricular de coelhos mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As células foram lavadas com solução Mg-EGTA (HEPES 1 mM, NaCl 30 mM, EGTA 10 mM, MgCl_2 7 mM, glicose 3%, gelatina 0,02%, pH 7,4) e centrifugadas a $480\ \text{g}$ por 5 min a 4°C , seguida de descarte do sobrenadante por três vezes e, por fim, foi feita a ressuspensão das células em 1 mL de Mg-EGTA. Antes dos experimentos, a concentração das células foi ajustada para 1×10^8 células/mL. A diluição do soro humano utilizado nos ensaios foi de 1:20 em Mg-EGTA.

4.7.2. Bloqueio da atividade anticomplemento pelos anticorpos contra as recombinantes salivares

Foram realizados ensaios hemolíticos com a rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail na presença do soro inativado a $56^{\circ}\text{C}/30$ min de camundongos imunizados com cada uma delas. Os ensaios foram realizados da mesma forma anteriormente descrita no item 4.7.1, com a diferença de que as recombinantes utilizadas no ensaio foram previamente incubadas com *pools* de soros, em diferentes concentrações, de animais previamente imunizados (ver 4.12.1) com

cada um dos antígenos. Foi realizado um controle contendo apenas o soro dos camundongos diluído em PBS sem a proteína recombinante para verificar se ele não seria capaz de influenciar na hemólise das hemácias.

4.7.3. Avaliação da ação sobre a cascata da coagulação sanguínea

Foram realizados ensaios para apurar alterações no tempo de recalcificação do plasma humano citratado na presença das proteínas recombinantes. O controle positivo foi feito com o 1 µg do extrato de glândulas salivares de fêmeas de *A. sculptum* e o controle negativo, sem amostra. O plasma humano, por sua vez, foi obtido a partir da centrifugação a 3000 g por 15 min de um *pool* de sangue com anticoagulante (citrato de sódio 129 mM) coletado de voluntários saudáveis do laboratório. As proteínas recombinantes e o extrato de glândulas salivares foram diluídos para um volume final de 30 µL de tampão fosfato e misturados a 30 µL de plasma humano citratado. Em seguida, o conteúdo foi depositado, em duplicatas, em placa de 96 poços e incubado a 37°C por 5 min. Foi adicionado então, 30 µL de CaCl₂ 25 mM pré-aquecido a 37°C para disparar a cascata de coagulação. Imediatamente após a adição do CaCl₂, foram iniciadas as leituras sequenciais da absorbância no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA a fim de se estimar o tempo decorrido até a variação de turbidez gerada no momento da coagulação do plasma. A análise do resultado foi feita através do valor de unidades de atividade anticoagulante, sendo que 1 unidade significa que o tempo para a coagulação com determinada amostra foi dobrado em relação ao controle sem anticoagulantes.

4.7.4. Avaliação da inibição da atividade enzimática das serino proteases Fator Xa, Trombina e Tripsina.

A capacidade de inibição da atividade enzimática de fator Xa, Trombina e Tripsina foi avaliada para as três proteínas salivares recombinantes. Diferentes concentrações de cada um dos recombinantes e a enzima (5×10^{-5} U FXa, $2,5 \times 10^{-3}$ U Trombina e 9 U Tripsina) (*Sigma-aldrich*®), diluídos em solução tampão 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% BSA, pH 7,4, foram misturados e incubados a 37°C por 15 min em tubos de 500 µL. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi colocado em placa de 96 poços e acrescido do substrato: CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH para FXa, N_α-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida hidróclorido para Tripsina e N-(p-Tosil)-Gly-Pro-Arg p-nitroanilida acetato de sódio para Trombina (*Sigma-aldrich*®) na

concentração final de 4 mM para um volume total de 100 μ L. Imediatamente após a adição do substrato, foram iniciadas as leituras sequenciais da absorbância no comprimento de onda de 405 nm em leitor de ELISA, por 30 min, a fim de captar a variação de cor causada pela degradação do substrato. A velocidade máxima (V_{max}) para cada enzima foi determinada pelo controle, em que não houve a presença de proteínas recombinantes.

4.8. Seleção de moléculas intestinais antigênicas através de análises *in silico* de transcriptomas de *A. sculptum*

Para identificação de novos alvos vacinais intestinais, foi realizada uma abordagem *in silico* das informações de moléculas de *A. sculptum* disponíveis nos bancos de dados (NCBI) e no transcriptoma intestinal de fêmeas de *A. sculptum* parcialmente alimentadas (não publicado) que foi realizado através de nossa parceria com os Drs. Jesus Valenzuela e Fabiano Oliveira do NIH (EUA). Foi formulado um *ranking* contendo proteínas antigênicas que fossem preferencialmente expressas na superfície do epitélio intestinal de *A. sculptum* através do uso dos programas BepiPred (Larsen et al., 2006) e também uma ferramenta desenvolvida pelos professores Ricardo Toshio Fujiwara e Daniella Castanheira Bartholomeu do ICB-UFMG que integra várias plataformas para predição de epitopos de células B associado a diferentes características. Dessa forma, foi possível identificar diversos epitopos lineares preditos para células B contidos nas proteínas selecionadas. Essa seleção também levou em consideração a existência de peptídeo sinal, âncora GPI e região transmembrana, que foram avaliadas através dos programas SignalP 4.0, GPI-SOM (Fankhauser & Mäser 2005) e TMHMM Server v. 2.0 (Sonnhammer et al. 1998), respectivamente, uma vez que estas características indicariam que as proteínas escolhidas fossem ancoradas ou inseridas na membrana da superfície do epitélio intestinal. Utilizamos as ferramentas NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al. 2004) e NetOGlyc 4.0 Server (Stentoft et al. 2013) para a identificação de possíveis sítios de N-glicosilação e O-glicosilação nas proteínas nativas.

4.9. Produção dos alvos intestinais recombinantes

Os alvos intestinais selecionados a partir dos bancos de dados e transcriptomas foram produzidos de forma recombinante. Para cada alvo, foi selecionado um par de iniciadores que

abrangesse uma região antigênica da molécula e esses foram desenhados durante o presente estudo através do software Primer3. Os iniciadores diretos receberam o sítio de restrição *XhoI* (CTCGAG) e os reversos, o sítio *NheI* (GCTAGC) (Tab. 3).

Tabela 3: Iniciadores utilizados nas amplificações por PCR para produção dos recombinantes intestinais.

Alvo	Iniciador direto	Iniciador reverso	Produto (pb)
AsMucin	5' CTCGAGACAACCACCACTGCACCAC	5' GCTAGCGATACCTCCCAGGAAGCTCA	276
AsAPP	5' CTCGAGCAAGGCAAGGACACTTCCAG	5' GCTAGCCTGTGGCAGCAGCTCGAT	648
AsLAMP	5' CTCGAGCACGAACCAACTGTGACCAG	5' GCTAGCCTCTGCGCCAGTGATGAAG	618

O processo de clonagem dos insertos, transformação e expressão foi realizado de maneira semelhante à dos alvos salivares.

4.10. Produção de uma proteína recombinante quimérica contendo epítopos de proteínas intestinais

Uma proteína quimérica recombinante foi desenhada a partir de epítopos lineares das sequências codificadoras selecionadas nos transcriptoma intestinal de *A. sculptum*. Para isso, 22 epítopos de proteínas intestinais identificados na análise de epítopos para célula B descrita no item 4.8 foram selecionados. O tamanho escolhido para cada epítopo foi de 16 aminoácidos e eles foram montados em sequência, separados por sequências de Glicina-Serina-Glicina-Serina-Glicina. A sequência de nucleotídeos foi então otimizada para expressão em bactérias, produzida sinteticamente e clonada no vetor pET-28a(+)-TEV pela empresa pela empresa FastBio (representante nacional da empresa GenScript). A transformação, expressão e purificação foi realizada de forma semelhante às outras recombinantes.

4.11. *Western blotting* para avaliação das proteínas recombinantes produzidas

O western blotting foi realizado para confirmar as bandas referentes às proteínas recombinantes purificadas e submetidas ao SDS-PAGE. As proteínas recombinantes separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 2 horas em 100 V.

Em seguida à transferência, a membrana foi bloqueada com solução bloqueadora (PBS/Tween20 0,1% + leite em pó desnatado 10%) sob agitação. Em seguida, foi lavada por três vezes por 5 min com PBS/Tween 0,1% e depois incubada sob agitação com o anticorpo anti-cauda de histidina (his TAG) produzido em camundongo (*Sigma-aldrich*®) na diluição de 1:2000 em PBS/BSA 1% por 1 hr e 30 min. Foram realizadas mais três lavagens e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos de coelhos anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (*Sigma-aldrich*®) diluídos a 1:4000 em PBS/Tween 0,1% por mais 1 hr e 30 min. Por fim, as membranas foram lavadas novamente por 3 vezes e a revelação da membrana foi feita através do kit Peroxidase Substrate DAB (Vector Laboratories®).

4.12. Avaliação do potencial vacinal dos antígenos selecionados

4.12.1. Imunização dos hospedeiros

As proteínas recombinantes obtidas dos alvos salivares e intestinais selecionados foram testadas a fim de se avaliar sua capacidade de proteger camundongos da linhagem *Swiss* do parasitismo causado por fêmeas e ninfas de *A. sculptum*. Foram realizados três eventos de imunização com intervalos de 14 dias em camundongos com idade entre 4 e 8 semanas. O desafio, por sua vez, foi realizado 14 dias após a última imunização. Nos eventos de imunização, cada camundongo foi injetado no dorso, de forma subcutânea, com 0,1 mg de hidróxido de alumínio e 5 µg de proteína recombinante ou extrato de proteínas intestinais em um volume final de 100 µL de tampão fosfato estéril. A exceção foi o grupo controle, injetado apenas com o hidróxido de alumínio diluído no tampão fosfato estéril. Os camundongos foram mantidos em biotério (ciclo claro-escuro de 12:12 h) com alimentação e água *ad libitum*.

4.12.2. Detecção de anticorpos antígeno-específicos no soro dos hospedeiros imunizados

Amostras individuais de sangue foram colhidas por punção da veia lateral caudal dos camundongos antes e após os eventos de imunização. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g por 10 min para a obtenção do soro. Os níveis de IgG antígeno-específicos para cada um dos alvos vacinais foram determinados individualmente no soro dos hospedeiros, de acordo com a

realização de um ELISA indireto. Foram utilizados 0,5 µg/poço de cada antígeno recombinante purificado em placas de ELISA de 96 poços Nunc MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific). Após incubação *overnight*, as placas foram lavadas, bloqueadas com solução de bloqueio, incubadas com os soros dos camundongos na diluição 1:160 e, após novas lavagens, incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (*Sigma-aldrich*®) na diluição 1:5.000. A revelação foi feita com a adição do tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5.0 contendo H₂O₂ e O-Fenilenodiamina. A reação foi parada com a adição de H₂SO₄ 12,5% e a absorbância medida a 495 nm em leitor de ELISA.

4.12.3. Infestação dos hospedeiros e avaliação da eficácia vacinal

Os carrapatos adultos e as ninfas foram alimentados em camundongos da linhagem *Swiss* a partir da metodologia descrita por Bouchard & Wikel (2005). Eles foram acomodados em câmaras de alimentação feitas com tubos de polipropileno para centrifuga com capacidade de 1,5 mL cortados a 1,5 cm do topo e fixados ao dorso dos camundongos. As tampas foram perfuradas com uma agulha fina para permitir a circulação de ar dentro da câmara. As câmaras foram examinadas diariamente para verificar e documentar os indivíduos que haviam terminado o processo alimentar e se soltado da pele do hospedeiro. Os carrapatos que não se fixaram em até 24 horas após serem colocados na câmara de alimentação foram retirados e descartados. Os indivíduos foram utilizados nos ensaios durante um intervalo de tempo que variou entre 20 e 40 dias após a muda do estágio anterior. Para a avaliação dos parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentados em hospedeiros imunizados, foi feita a infestação com um casal de carrapatos adultos por camundongo (n= 20 n = 14 para alvos salivares e quimera e n = 8 para alvos intestinais). Nos ensaios realizados com ninfas, cada camundongo foi infestado com 10 indivíduos (n = 5 para controle, n = 4 para AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail e n = 3 para quimera).

Os seguintes parâmetros relacionados à alimentação de carrapatos em camundongos imunizados foram analisados: tempo de alimentação, peso final após alimentação e mortalidade (ocorrida durante o processo alimentar ou então antes da oviposição, para as fêmeas ou da muda, para as ninfas). Foram avaliados parâmetros reprodutivos das fêmeas, como a massa total de ovos produzida por fêmea e taxa de eclosão dos ovos, que foi calculada pela razão do número de larvas emergidas em relação ao número de ovos produzidos por cada fêmea (larvas e ovos foram pesados e a massa foi convertida em número de indivíduos). A eficácia da imunização em cada um dos grupos foi avaliada através da seguinte fórmula: Eficácia (%E)=

$100 \times [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$, em que CRT, CRO e CRF significam coeficiente de redução de fêmeas ingurgitadas, coeficiente de redução de oviposição e coeficiente de redução de fertilidade dos ovos, respectivamente (Canales et al. 1997).

4.13. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prism 5.0 e representados pela média \pm erro padrão ou média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para dados com distribuição normal, foi feita a comparação entre dois grupos pelo Teste T, enquanto utilizamos o Teste de Mann-Whitney para grupos com distribuição não paramétrica. No caso de comparação entre mais de dois grupos, foi feito o ANOVA e o pós-teste de Dunnett ou ANOVA-Dois fatores e pós teste de Bonferroni. Para dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de moléculas salivares anti-hemostáticas e imunossupressoras importantes para o processo alimentar do *A. sculptum* e produção de seus recombinantes

A seleção dos alvos salivares feita com base em seus altos níveis de expressão, presença de domínios ou estruturas indicativas de atividade anti-hemostática ou imunossupressora e epitopos preditos para células B permitiram a escolha três sequências que codificam proteínas salivares secretadas. A primeira (GenBank: GBBK01000794.1) é traduzida em uma proteína cujo precursor possui 98 aminoácidos e a proteína madura (após processamento e remoção do peptídeo sinal) passa a ser constituída por 77 aminoácidos (Fig. 4A). Seu peso molecular foi estimado em 8,7 kDa (10,9 kDa com o peptídeo sinal) e o pI = 8,2. A análise de sua sequência de aminoácidos pela ferramenta ABCpred revelou a predição de três epitopos para células B (Fig. 4B). A sua análise estrutural revelou uma região compatível com um domínio do tipo Kunitz_Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz_BPTI) entre os resíduos 6-60 (Fig. 4C), cuja família possui representantes caracterizados como inibidores de serino proteases. Portanto, foi nomeada como AsKunitz.

A
AsKunitz
MKTPTCFLCALLCLMVVLVQGYKRPKFCYAKAKEGQCGHERPSIERWYFDARYGYCGPFLWG
GCGGNNNNFPNCTLCMTVCS D HSDPEGACRNILNAP
*Amarelo = peptídeo sinal.

B

Rank	Sequence	Start position	Score
1	TVCS D HSDPEGACRNI	58	0.96
2	CGPFLWGGCGGNNNNF	35	0.92
3	ERPSIERWYFDARYGY	19	0.88

C

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites
				Start	End	Start	End	From	To				
Kunitz_BPTI	Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain (shorten)	Domain	n/a	6	61	6	60	1	52	53	51.7	7.5e-14	n/a
#HMM	vCslpadeGpCka...seeryynsetkeCekFvYgGcggneNnFeskeeCeslC												
#MATCH	+C +a+eG+C + s+er+y++++ + C +F +gGcgggn+NnF + C+++C												
#PP	6*****9733366*****												
#SEQ	FCYAKAKEGQCGHerpSIERWYFDARYGYCGPFLWGGCGGNNNNFPNCTLCMTVC												

Figura 4: Características da estrutura primária da proteína AsKunitz. Sequência de aminoácidos e presença de peptídeo sinal (A), epítopos antigênicos preditos para células B (B) e a presença de um domínio do tipo Kunitz_BPTI (C).

A segunda sequência apresenta 327 pares de base (GBBK01000746.1) e codifica uma proteína madura com 89 aminoácidos (108 na proteína com peptídeo sinal), peso estimado de 9,8 kDa (11,9 kDa com peptídeo sinal) e $pI = 5,45$. (Fig. 5A). Foram identificados quatro epítopos lineares preditos para células B (Fig. 5B) e um domínio do tipo fator de von Willebrand (vWF) tipo C (Fig. 5C). Além disso, a proteína apresentou oito resíduos de cisteína conservados, que são característicos de proteínas da família 8.9 kDa, o que foi comprovado pelo alinhamento com outras proteínas salivares de Ixodídeos (Fig. 5D). Conseqüentemente, esse alvo foi nomeado As8.9Kda.

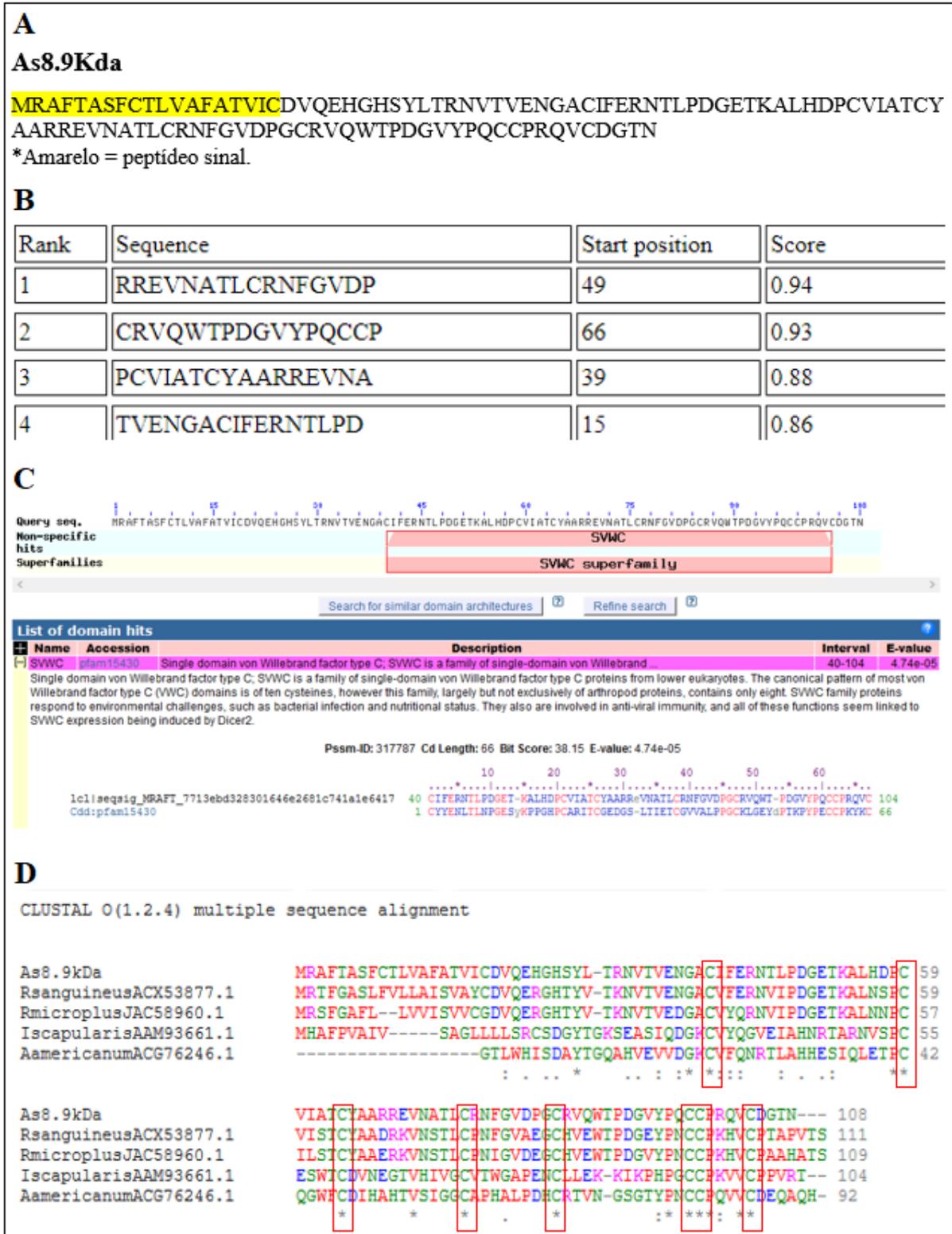


Figura 5: Características da estrutura primária da proteína As8.9kDa. Sequência de aminoácidos e presença de peptídeo sinal (A), epítopos antigênicos preditos para células B (B), presença do domínio von Willebrand tipo c (C) e alinhamento com proteínas da família 8.9 kDa com destaque para os resíduos de cisteína conservados (D).

O último alvo selecionado codifica uma proteína secretada de 149 aminoácidos (166 com peptídeo sinal) (GenBank: GBBK01000509.1), 16,8 kDa (18,6 kDa com peptídeo sinal) e $pI = 9,6$ (Fig. 6A). Ao longo de sua sequência peptídica foram encontrados 13 epítopos lineares preditos para células B (Fig. 6B). Além disso, também há vários resíduos de lisina na região carboxi-terminal, a presença do bloco YY e três pontes dissulfeto, características de proteínas da família exclusiva de carrapatos, conhecida como Basic Tail. O alinhamento com a proteína Salp14 de *I. scapularis* (GenBank: AAK97824.1), representante dessa família e caracterizada como inibidora do fator Xa da coagulação, evidenciou trechos de similaridade, sobretudo na região carboxi-terminal, onde estão concentrados os resíduos de lisina (Fig. 6C). Dessa forma, o alvo selecionado de *A. sculptum* foi nomeado AsBasicTail.

Amplificações por PCR que tiveram como moldes, cDNAs produzidos a partir de RNA extraído das glândulas salivares de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas por 5 dias, e iniciadores produzidos para cada alvo, foram realizadas como o primeiro passo para a produção das proteínas recombinantes. A análise da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciou a presença de produtos posicionados entre 200 e 300 pb para As8.9kDa e AsKunitz e 400 e 500 pb para AsBasicTail, tamanhos compatíveis aos produtos esperados (Fig. 7). Esses produtos de PCR foram posteriormente clonados em vetor pET-28a(+)-TEV e transformados em bactérias *E. coli* da linhagem *BL21*.

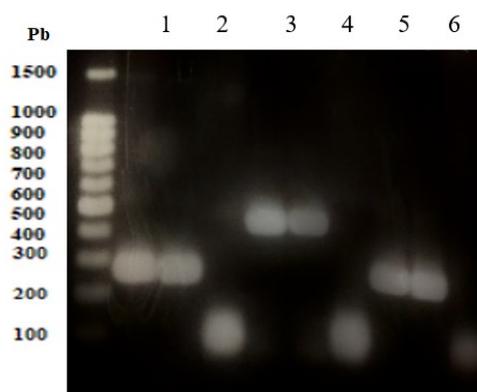


Figura 7: Produtos da amplificação por PCR das seqüências dos transcritos salivares visualizados em gel de agarose. 1-As8.9kDa; 2- As8.9kDa sem cDNA; 3-AsBasicTail; 4-AsBasicTail sem cDNA; 5-AsKunitz; 6-AsKunitz sem cDNA.

As características das proteínas recombinantes expressas pelas construções montadas em pET-28a(+)-TEV estão representadas na tabela 4. Os pesos moleculares estimados variaram de 10,9 a 18,9 kDa. A diferença entre as características das proteínas nativas e recombinantes se deve a presença das caudas de histidina (utilizada na purificação por colunas de níquel), alguns aminoácidos extras presentes no vetor ou necessários para a clonagem e da ausência da região correspondente ao peptídeo sinal, nas recombinantes (Fig. 8). Os sequenciamentos do inserto relativo à proteína 8.9kDa revelou uma seqüência idêntica à daquela catalogada no GenBank (GBBK01000746.1). Para AsKunitz e AsBasicTail, por sua vez, foram reveladas diferenças pequenas diferenças em relação à CDS catalogadas no GenBank, o que pode ter sido ocasionado por erros no transcriptoma ou mutações gênicas. A seqüência de aminoácidos da AsKunitz difere em apenas um resíduo de aminoácido em relação à que está catalogada (GBBK01000794.1). A seqüência identificada por GBBK01000509.1 (*Basic tail*), por sua vez, difere ligeiramente da obtida pelo nosso sequenciamento, sobretudo na porção final, provavelmente devido a um erro no transcriptoma, em que houve exclusão de uma base,

alterando a janela de leitura e mudando a sua sequência de aminoácidos na região carboxi-terminal (Anexo II).

Tabela 4: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas salivares maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em *E. coli* BL21.

	AsKunitz	rAsKunitz	As8.9kDa	rAs8.9kDa	AsBasicTail	rAsBasicTail
PM (kDa)	8,7	10,9	9,8	13	16,8	18,9
pI	8,2	7,64	5,45	6,44	9,6	9,68

PM= Peso molécula; pI= ponto isoelétrico.

As proteínas recombinantes foram nomeadas colocando “r” em frente ao nome dado à nativa.

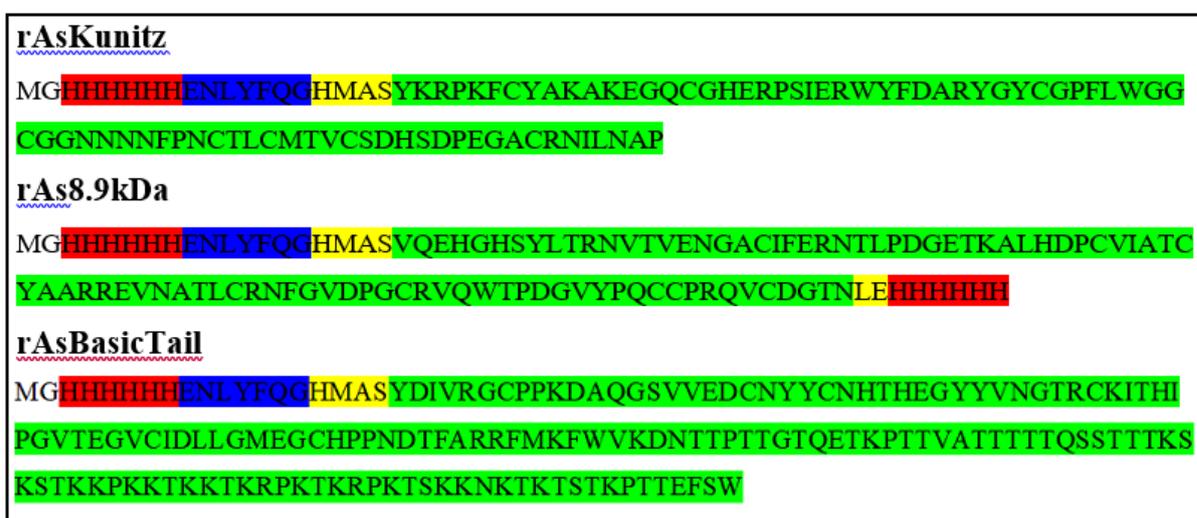


Figura 8: Sequência de aminoácidos das proteínas salivares recombinantes produzidas em *E. coli* BL21. As regiões destacadas são: Vermelho = Caudas de polihistidina utilizadas para a purificação por cromatografia de afinidade – Ni-NTA; Azul = Sítio-TEV para purificação utilizando a enzima TEV; Verde = Sequência relativa à proteína nativa contida na proteína recombinante; Amarelo = Sítios de restrição usados durante a clonagem. *Os produtos clonados relativos à AsKunitz e AsBasicTail possuíam o códon de parada. Portanto, suas recombinantes são truncadas antes da adição da cauda de histidina na região carboxi-terminal.

Ao avaliar as proteínas recombinantes em SDS-PAGE foi possível observar que a banda relativa a alíquota purificada da rAsKunitz ficou acima de 15 kDa, pouco acima do peso esperado (Fig. 9A). Ocorreu o mesmo com a rAs8.9Kda, que também ficou ligeiramente acima da faixa esperada (Fig. 9B). A banda correspondente a rAsBasicTail, a recombinante de maior tamanho, ficou posicionada próximo à banda de 25,9 kDa do padrão, acima do peso esperado,

assim como as anteriores (Fig. 9C). O *western blotting* realizado com os anticorpos anti-his revelaram que as bandas visualizadas no SDS-PAGE corresponderam, de fato, às proteínas recombinantes purificadas, já que as marcações foram compatíveis nas membranas de nitrocelulose.

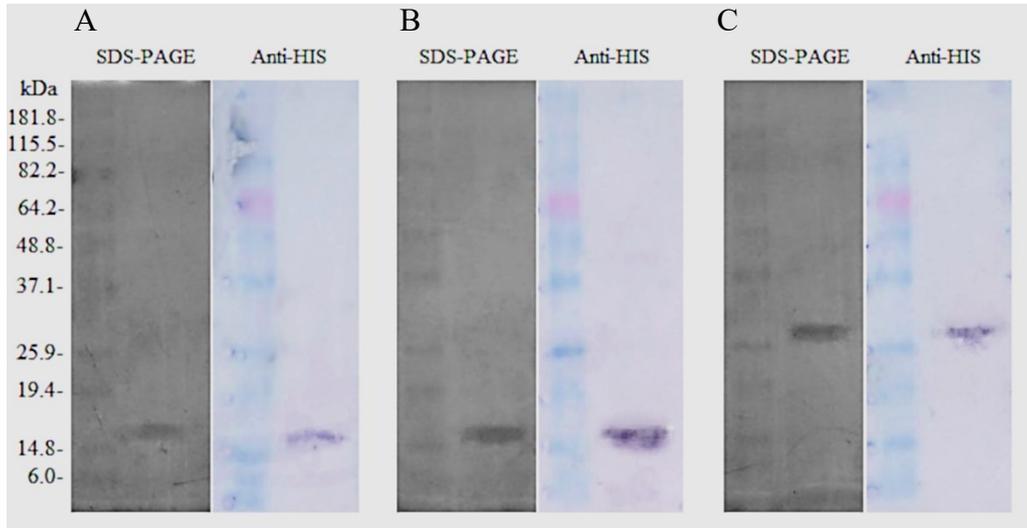


Figura 9: Visualização das proteínas recombinantes em SDS-PAGE de alíquotas purificadas de rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C) e western blotting com anticorpo anti-HIS. Coloração por nitrato de prata.

5.2. Avaliação dos níveis de expressão da AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail em diferentes momentos da hematofagia de fêmeas, larvas e ninfas

A expressão dos genes da AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail na glândula salivar de *A. sculptum* durante o processo alimentar foi avaliada utilizando a técnica de PCR em tempo real. Dessa forma, foi possível quantificar e comparar os níveis de expressão nas glândulas de fêmeas em jejum ou alimentadas por 1, 3, 5 e 8 dias. A análise da AsKunitz em fêmeas mostrou que os seus níveis de expressão foram altamente variáveis ao longo da alimentação. Foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação ao grupo jejum, já a partir das primeiras 24 horas de fixação no hospedeiro, quando ocorreu um expressivo aumento médio de mais de 18 milhões de vezes em relação ao jejum (Fig. 10A), indicando uma modulação da expressão logo no início do processo alimentar. Já nos tempos 3, 5 e 8 dias de repasto sanguíneo, foi visível uma queda gradativa dos níveis médios de expressão, mas que ainda se mantiveram relativamente elevados em relação ao das fêmeas em jejum.

A As8.9kDa e AsBasicTail também apresentaram um perfil de aumento da expressão na glândula salivar modulado pelo repasto sanguíneo, mas no caso desses genes, os maiores valores de mRNA foram observados numa fase mais tardia do processo alimentar. No quinto dia de fixação no hospedeiro, foram observados os picos de expressão: 364 vezes mais elevada em relação àquela detectada no jejum ($p < 0,001$) para a As8.9kDa (Fig. 10B) e 471 ($p < 0,01$) para AsBasicTail (Fig. 10C). Os níveis de expressão voltaram a diminuir no oitavo dia, porém ainda se mantiveram elevados em relação àqueles do jejum.

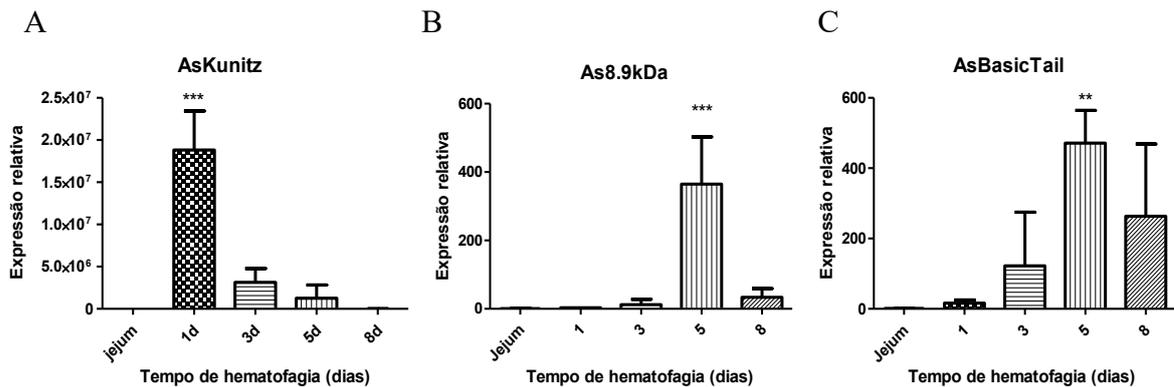


Figura 10: Níveis relativos de mRNA's (expressão relativa) codificantes das proteínas AsKunitz (A), As8.9kda (B) e AsBasicTail (C) na glândula salivar de fêmeas de *A. sculptum* durante o processo alimentar. ANOVA-Dunnett *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$. Dados representados por média \pm DP.

A expressão dos três genes também foi avaliada no corpo das larvas e ninfas de *A. sculptum*. Para as larvas (Fig. 11A), observamos um aumento médio do nível de transcritos em todos os grupos que foram alimentados, sobretudo na análise da As8.9kDa, em que houve um crescimento significativo ($p < 0,01$) da expressão de aproximadamente 15 vezes em relação àquela observado nos grupos de larvas em jejum. Para as ninfas (Fig. 11B), por sua vez, o gene no qual se observou a maior regulação na expressão foi o AsKunitz, já que o aumento médio do número de transcritos no grupo dos carrapatos alimentados foi na ordem de aproximadamente 750 vezes. Portanto, pode-se afirmar que os genes avaliados são expressos nos três estágios evolutivos e são modulados de acordo com o processo alimentar.

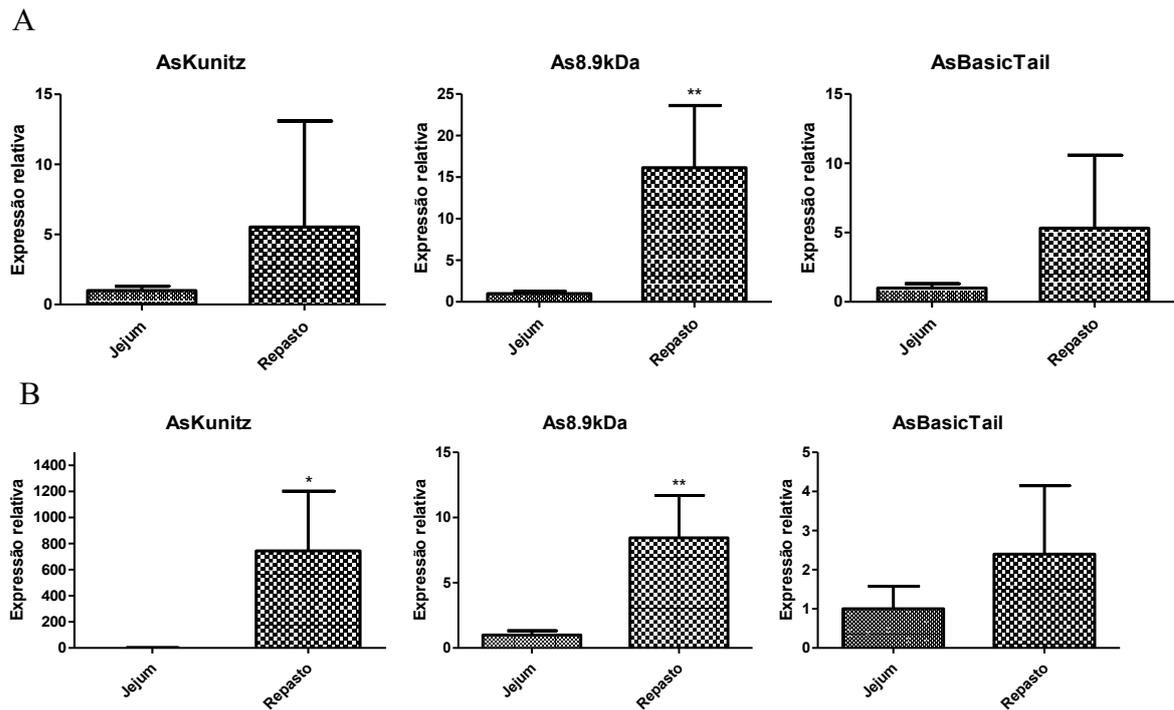


Figura 11: Níveis relativos de mRNA's (expressão relativa) codificantes das proteínas AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail no corpo das larvas (A) e ninfas (B) de *A. sculptum* em jejum ou após três dias repasto sanguíneo. Teste t * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Dados representados por média \pm DP.

5.3. Caracterização funcional da rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail

5.3.1. Avaliação da ação sobre o sistema do complemento humano

As três proteínas recombinantes foram testadas a fim de se avaliar sua capacidade de inibir a hemólise mediada pela ativação da via clássica do sistema do complemento. Todas apresentaram atividade anticomplemento em comparação ao grupo controle sem inibidor ($P < 0,05$), porém com níveis de eficiência diferentes. A rAsKunitz foi capaz de inibir a via clássica do complemento de forma dose dependente, sendo que na concentração final de $2 \mu\text{M}$, o valor de inibição chegou a cerca de 85% (Fig. 12A) sendo, desta forma, a mais eficiente. A rAs8.9kDa também foi capaz de causar inibição de maneira dose dependente, sendo que na concentração de $4 \mu\text{M}$, a inibição chegou a 94% (Fig. 12B). A rAsBasicTail, por sua vez, foi a menos eficiente em opor a via clássica dentre as três, já que foi necessária uma concentração de $4 \mu\text{M}$ para uma inibição significativa ($p < 0,001$), contra $0,5 \mu\text{M}$ das anteriores. Com a

recombinante do tipo Basic tail foi possível inibir até 91% da hemólise, porém numa concentração consideravelmente maior, de 8 μM (Fig. 12C).

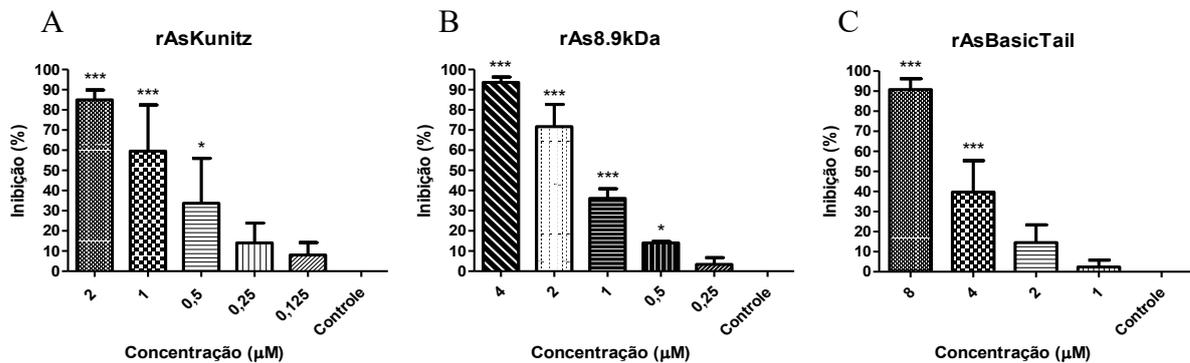


Figura 12: Inibição da via clássica do sistema complemento por rAsKunitz(A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C). ANOVA - Dunnett * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Dados representados por média \pm DP.

As proteínas recombinantes também apresentaram inibição da via alternativa do sistema do complemento humano. A rAsKunitz e a rAs8.9kDa, as mais eficientes na inibição da via clássica, foram menos efetivas que a rAsBasicTail na via alternativa. A rAsKunitz, na mesma concentração (2 μM) do ensaio anterior, inibiu a hemólise em apenas 38% (Fig. 13A), indicando eficiência consideravelmente menor em contrapor essa via. Já a segunda, também mostrou menor taxa de inibição, pois com 4 μM , inibiu apenas 57% de hemólise (Fig. 13B), contra 94% na via clássica. A rAsBasicTail, ao contrário do observado nos ensaios anteriores, foi a mais eficiente, já que inibiu a hemólise em quase 89% com apenas 2 μM (Fig. 13C), mostrando uma eficácia por volta de seis vezes maior na via alternativa em relação à via clássica. A inibição gerada pelas três recombinantes também foi dose dependente. Isso indica que elas devem ser capazes de atuar na inibição de fatores da ativação pela via clássica, alternativa e/ou fatores da via comum do sistema do complemento.

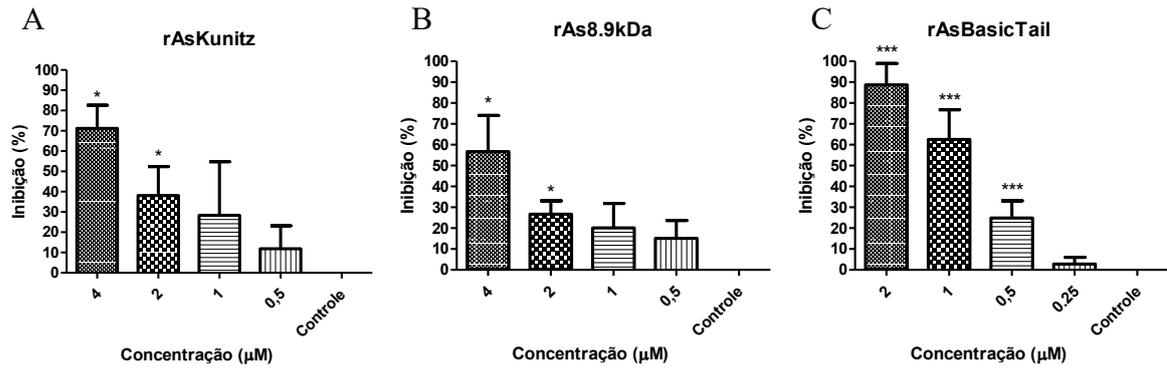


Figura 13: Inibição da via alternativa do sistema complemento por rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C). ANOVA - Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Dados representados por média \pm DP.

5.3.2. Bloqueio da atividade anticomplemento

As proteínas recombinantes salivares em contato com soros inativados de camundongos imunizados com cada uma delas foram submetidas aos ensaios hemolíticos. As três proteínas tiveram sua atividade inibitória do sistema do complemento significativamente ($p < 0,05$) reduzidas quando em contato com os soros relativos a elas. rAsKunitz (Fig 14A) e rAs8.9kDa (Fig 14B) apresentaram níveis de inibição da via clássica significativamente menores na presença dos soros diluídos até 200x e 100x, respectivamente. Já a rAsBasicTail, por sua vez, apresentou uma inibição significativamente menor ($p < 0,05$) da via alternativa quando em contato com o soro diluído até 10X (Fig 14C). Esses resultados indicam que as proteínas recombinantes perdem a capacidade inibitória de fatores da cascata do complemento quando interagem com os anticorpos, presentes nos soros, correspondentes a cada uma delas.

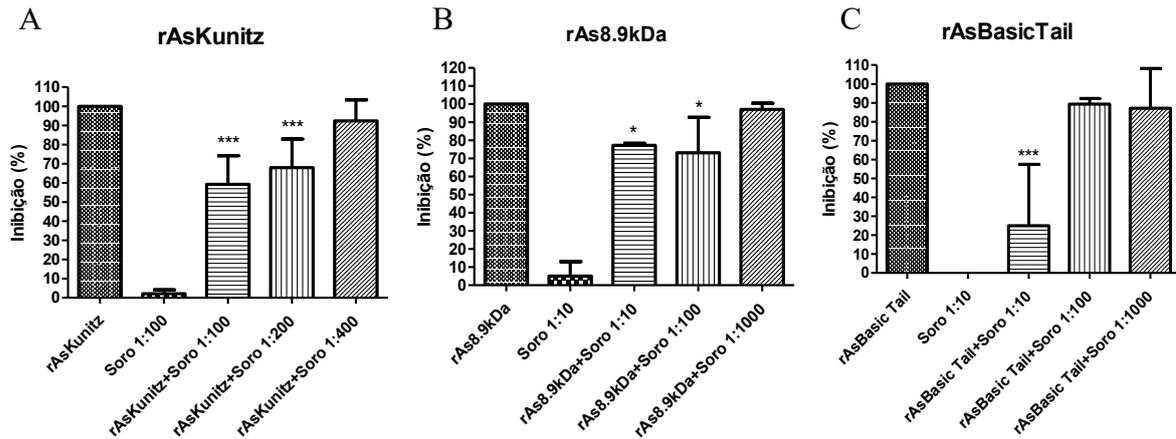


Figura 14: Bloqueio da atividade anticomplemento por anticorpos específicos contra rAsKunitz (A), rAs8.9kDa (B) e rAsBasicTail (C). ANOVA – Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Dados representados por média \pm DP.

5.3.3. Avaliação da ação sobre a cascata da coagulação sanguínea

A fim de se avaliar a capacidade inibidora da coagulação pelas recombinantes das proteínas salivares, foi realizado um ensaio que avalia o tempo de recalcificação do plasma humano citratado. Através desse ensaio foi possível observar que as três proteínas foram capazes de retardar a coagulação do plasma. A eficiência de cada uma delas na inibição da cascata de coagulação foi comparada em ensaios em que foram utilizadas na concentração de $0,25 \mu\text{M}$. Os resultados obtidos demonstraram que a rAsBasicTail foi a mais eficaz, apresentando, em média, 1,76 unidades de atividade anticoagulante. O valor observado foi significativamente maior ($p < 0,01$) que aqueles referentes à rAskunitz e rAs8.9kDa, apresentaram 1,0 e 0,79 unidades de atividade anticoagulante, respectivamente, enquanto as duas últimas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), entre elas, na inibição da coagulação (Fig. 15). Adicionalmente foi observado que, a partir da concentração de $0,5 \mu\text{M}$ de qualquer uma das três proteínas no ensaio, não houve a coagulação do plasma durante todo o período de avaliação (20 min).

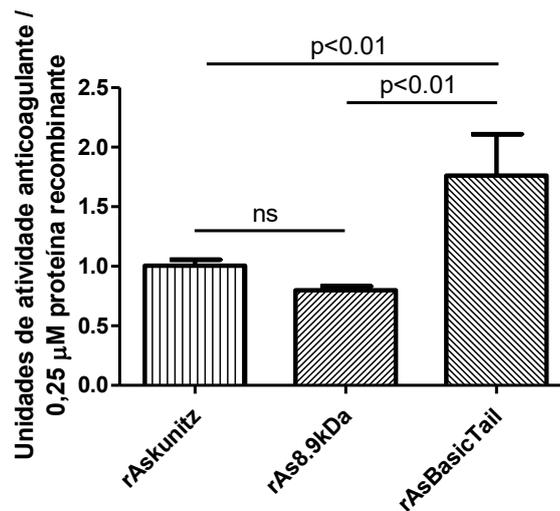


Figura 15: Inibição da cascata da coagulação por rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail. Dados representados por média \pm DP. ANOVA – Dunnett. ** $p < 0,01$. As recombinantes foram testadas através da avaliação do aumento do de tempo de recalcificação do plasma humano citratado. Uma unidade de atividade coagulante equivale a quantidade necessária de inibidor para dobrar o tempo normal de coagulação do plasma.

5.3.4. Avaliação da ação sobre diferentes serino proteases que participam de sistemas biológicos

Para verificar a presença de atividade inibitória pelas proteínas recombinantes salivares, foram realizados ensaios enzimáticos com fator Xa (FXa), Trombina e Tripsina. Dessa forma, foi possível compará-las e, também, inferir sobre o papel biológico de cada uma.

O fator Xa foi mais inibido por rAsBasicTail que pelas outras recombinantes. A proteína em questão apresentou IC_{50} de apenas $0,89 \mu M$, além de inibir o fator significativamente ($p < 0,05$) na concentração de $0,5 \mu M$. Mesmo na concentração mais alta utilizada, de $4 \mu M$, rAs8.9kDa não foi capaz de reduzir a velocidade máxima (V_{max}) da reação em 50%, apesar dos valores de V_{max} relativos às concentrações de $0,5$, 1 , 2 e $4 \mu M$ terem sido significativamente menores ($p < 0,05$) que o controle sem inibidor. A rAsKunitz, por sua vez, não foi capaz de inibir significativamente ($p > 0,05$), em nenhuma das concentrações testadas, a atividade enzimática de FXa (Fig. 16).

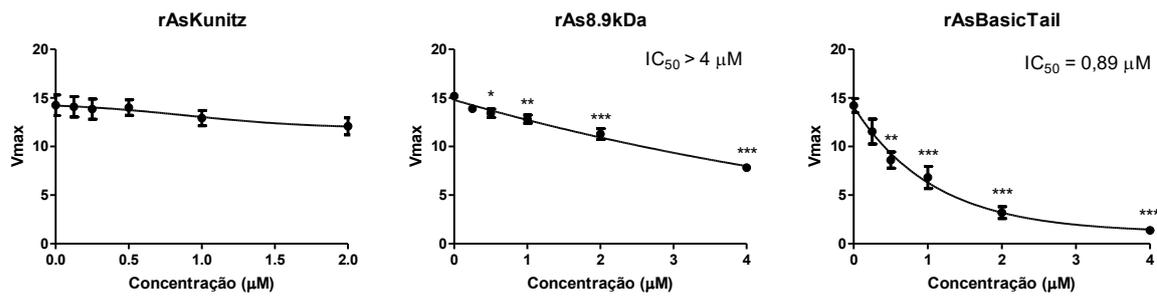


Figura 16: Inibição da atividade proteolítica de Fator Xa pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail. Dados representados por média \pm EP. ANOVA - Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

rAsKunitz, em comparação com as outras duas proteínas recombinantes, foi a mais eficiente contra a atividade enzimática da trombina, sendo capaz de inibi-la significativamente ($p < 0.001$) com apenas $0,5 \mu\text{M}$, valor inferior à concentração necessária pelas outras proteínas. Além disso, apresentou o menor valor de IC_{50} dentre as três, reduzindo a velocidade máxima da reação em 50% em uma concentração de apenas $0,65 \mu\text{M}$, enquanto foram necessárias concentrações de rAs8.9kDa e rAsBasicTail consideravelmente mais altas, $2,23$ e $2,34 \mu\text{M}$, respectivamente (Fig. 17).

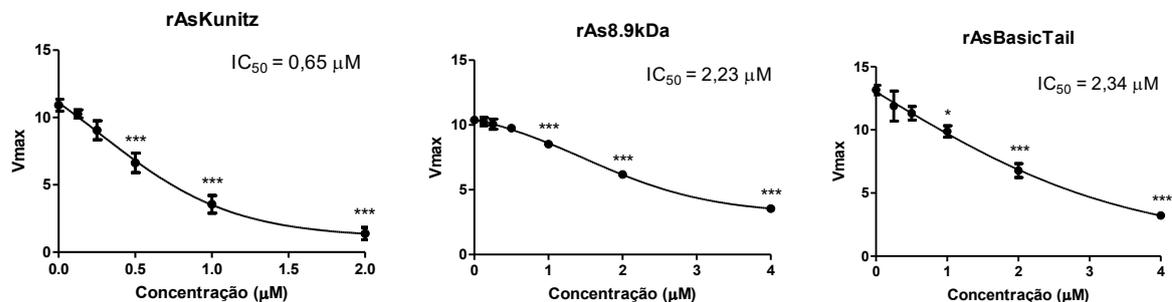


Figura 17: Inibição da atividade proteolítica de Fator II (trombina) pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail. Dados representados por média \pm EP. ANOVA - Dunnett * $p < 0.05$ e *** $p < 0,001$.

Tal qual anteriormente observado nos ensaios enzimáticos com o FXa, a rAsKunitz não foi capaz de inibir a atividade da tripsina de forma significativa em nenhuma das concentrações testadas. rAs8.9kDa, por sua vez, a partir da concentração de $1 \mu\text{M}$, diminuiu significativamente ($p < 0.05$) a V_{max} da reação, enquanto foi capaz de reduzi-la em 50% na concentração de $2,96 \mu\text{M}$. A mais eficiente foi a rAsBasicTail, que diminuiu a V_{max} significativamente ($p < 0.001$) na concentração de apenas $0,5 \mu\text{M}$. Além disso, seu valor de IC_{50} estimado foi de $1,61 \mu\text{M}$, bem mais baixo que o da anterior, evidenciando sua maior eficácia na inibição da serino protease em questão (Fig. 18).

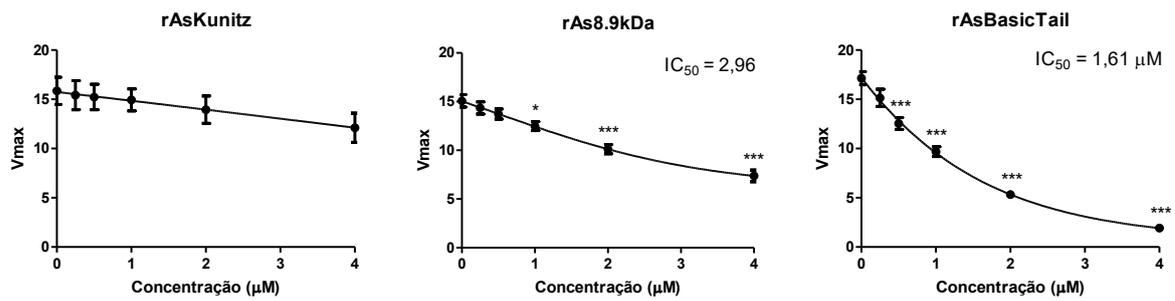


Figura 18: Inibição da atividade proteolítica de Tripsina pelas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail. Dados representados por média \pm EP. ANOVA - Dunnett * $p < 0.05$ e *** $p < 0,001$.

5.4. Seleção de moléculas intestinais imunogênicas de *A. sculptum*

5.4.1. Seleção de alvos vacinais através da identificação *in silico* de moléculas intestinais

As seqüências codificadoras identificadas no transcriptoma de intestino de *A. sculptum* foram ranqueadas por seu nível de antigenicidade e, analisadas para verificar a presença de peptídeo sinal e se estavam ancoradas à membrana intestinal ou se eram proteínas transmembrana. Dessa forma, selecionamos três seqüências codificadoras para clonagem e produção de proteínas recombinantes. A primeira seqüência possui 456 pares de base (pb) e codifica uma proteína de 13,5 kDa (Fig. 19A) (16,5 kDa com o peptídeo sinal), pI = 6,7 e região transmembrana prevista entre os resíduos de aminoácidos 98-120, sendo a maior parte da proteína exposta no lúmen intestinal (Fig. 19B). As análises realizadas através do NetNGlyc 1.0 Server e NetOGlyc 4.0 Server revelaram a possível presença de dois sítios de N-glicosilação e 30 sítios de O-glicosilação. Já a busca feita através da ferramenta ABCpred revelou a presença de cinco epitopos preditos para células B na região presente no lúmen intestinal (Fig. 19C), enquanto a análise feita no Pfam revelou similaridade entre uma região (resíduos 38-132) de sua seqüência e o domínio *Multi-glycosylated core protein 24* (MGC-24), sialomucin, indicando que a seqüência em questão pertence ao grupo das mucinas expressas na membrana intestinal (Fig. 19D). Portanto, o alvo foi chamado de AsMucin.

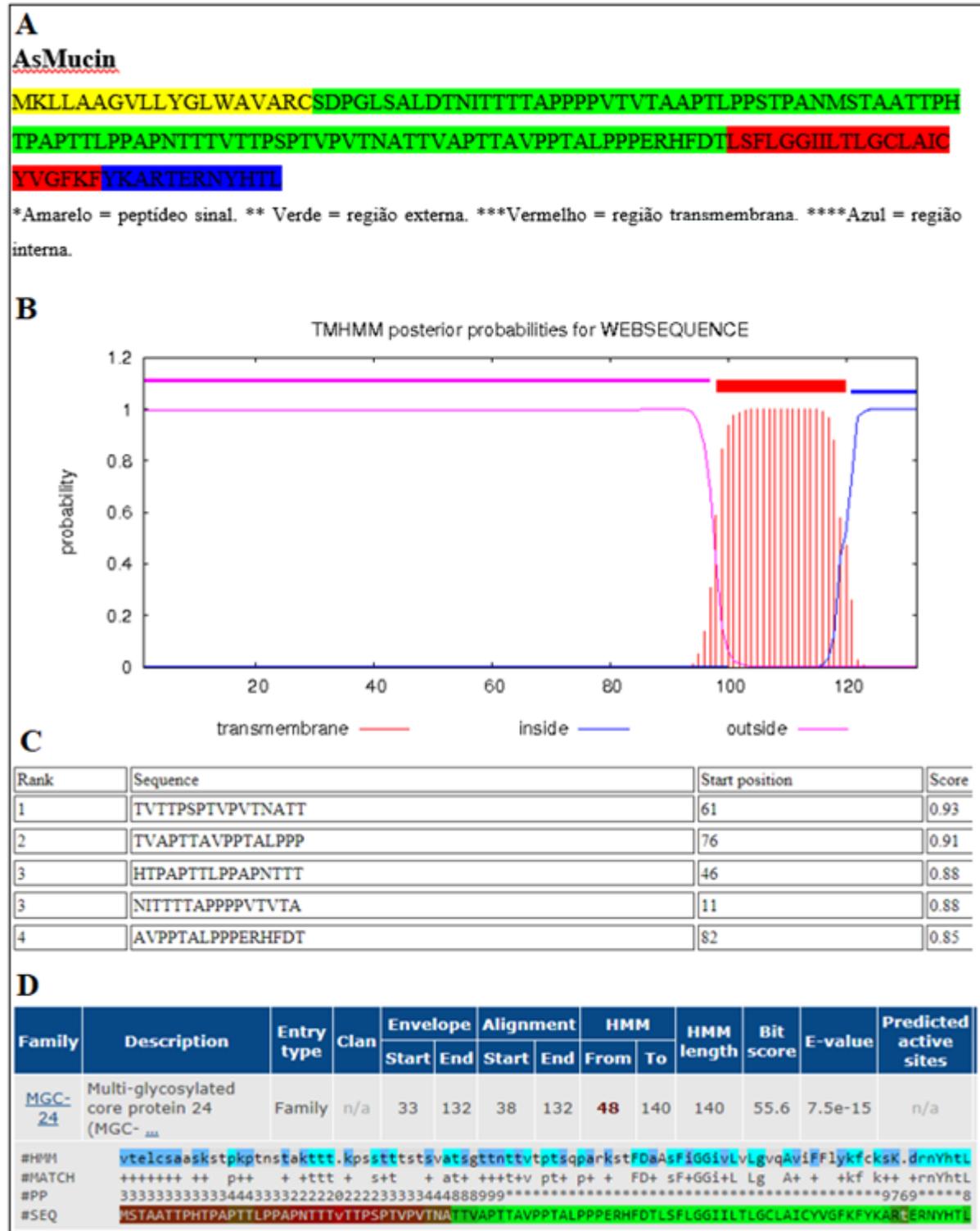


Figura 19: Características da estrutura primária da proteína AsMucin. Sequência de aminoácidos, presença de peptídeo sinal e localização de aminoácidos em relação à membrana celular do epitélio intestinal (A), a identificação de regiões transmembrana (B), epitopos antigênicos preditos para células B (C) e o domínio do tipo *Multi-glycosylated core protein 24* (MGC-24) (D).

A segunda sequência está catalogada no GenBank (NCBI) sob número de acesso GEEX01004013.1, possui 1.854 pb e também codifica uma proteína transmembrana com 65,6 kDa (68,5 kDa com o peptídeo sinal) e pI=6,2 (Fig. 20A). A análise de sua sequência de aminoácidos indicou a presença de região transmembrana próximo a sua extremidade carboxi-terminal, entre os resíduos 516-538 (Fig. 20B). As análises realizadas através do NetNGlyc 1.0 Server e NetOGlyc 4.0 Server revelaram a possível presença de três sítios de N-glicosilação e 49 sítios de O-glicosilação. Adicionalmente, quinze epitopos preditos para célula B com *threshold* a partir de 0.85 foram encontrados através da análise da sequência no ABCpred (Fig. 20C) e, quando analisada na ferramenta Pfam, foi encontrada similaridade com o domínio *E2 domain of amyloid precursor protein* na região compreendida entre os resíduos 230-411 (Fig. 20D). Dessa forma, o segundo alvo selecionado foi identificado como AsAPP.

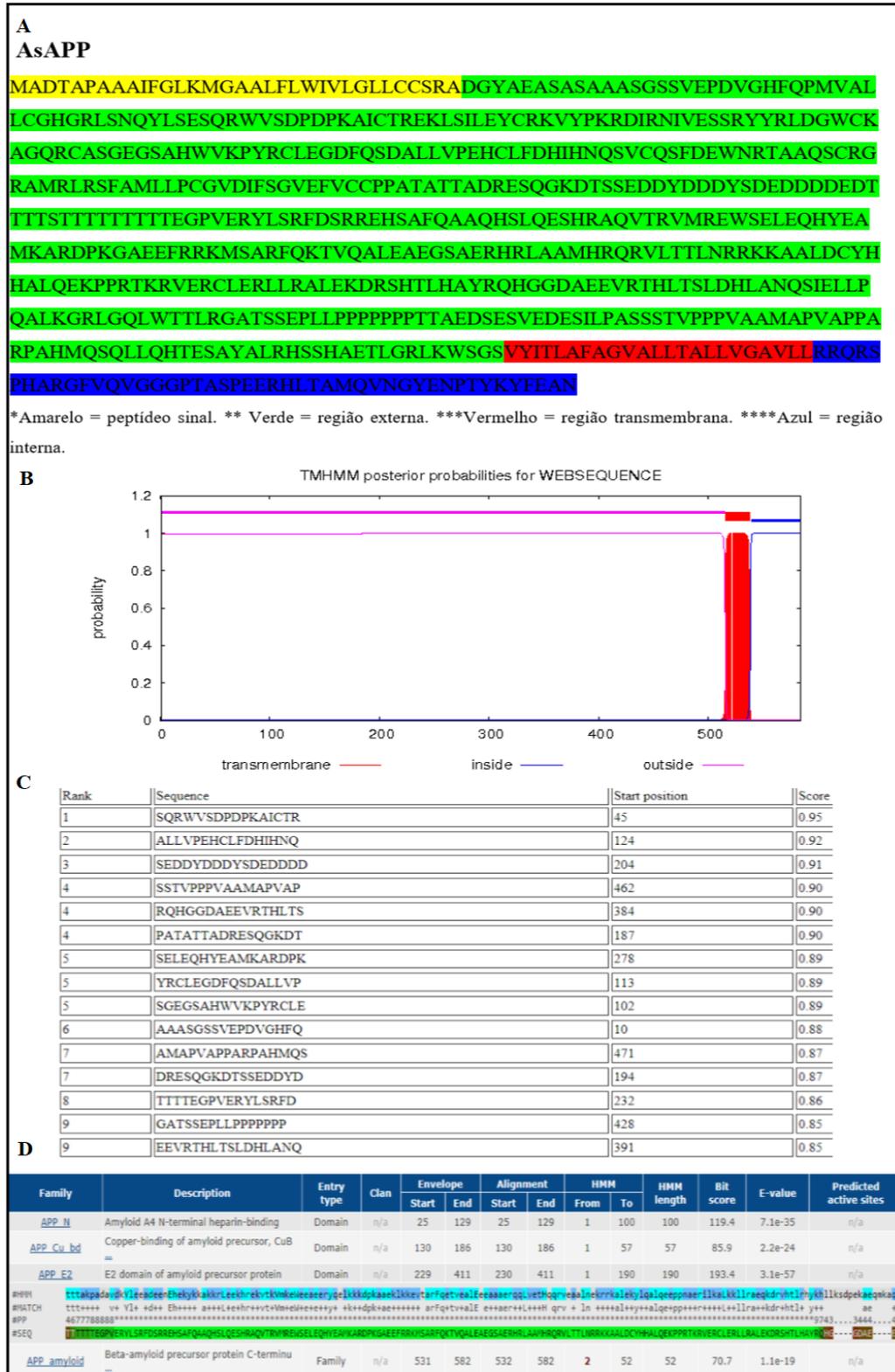


Figura 20: Características da estrutura primária da proteína AsAPP. Sequência de aminoácidos, presença de peptídeo sinal e localização de aminoácidos em relação à membrana celular do epitélio intestinal (A), a identificação de regiões transmembrana (B), epitopos antigênicos preditos para células B (C) e a presença de domínios conhecidos (D).

A última sequência selecionada possui 909 pb, sendo traduzida em uma proteína madura de 30,4 kDa (32,3 kDa com o peptídeo sinal) e pI = 5,4 (Fig. 21A). A presença de região transmembrana entre os resíduos 249-271 foi evidenciada pela análise de sua sequência de aminoácidos (Fig. 21B), enquanto as análises realizadas através do NetNGlyc 1.0 Server e NetOGlyc 4.0 Server revelaram a possível presença de sete sítios de N-glicosilação e 28 sítios de O-glicosilação. Essa também apresentou epitopos preditos para células B na região externa, sendo revelados 10 deles na análise pelo ABCpred (Fig. 21C). A proteína teve 99% de identidade com a sequência GEEX01001368.1 armazenada no GenBank (NCBI). Ela parece ser bastante conservada, já que apresentou identidade acima de 80% com sequências de outras espécies do gênero *Amblyomma* como o *A. aureulatum* (GFAC01000181.1), *A. americanum* (GBZX01000245) e *A. triste* (GBBM01000233.1). Sua análise através do Pfam apontou a presença do domínio Lysosome-associated membrane protein (LAMP) na região compreendida pelos resíduos 71-225 (Fig. 21D), o que indica se tratar de uma glicoproteína de membrana, sendo então identificada por AsLAMP.

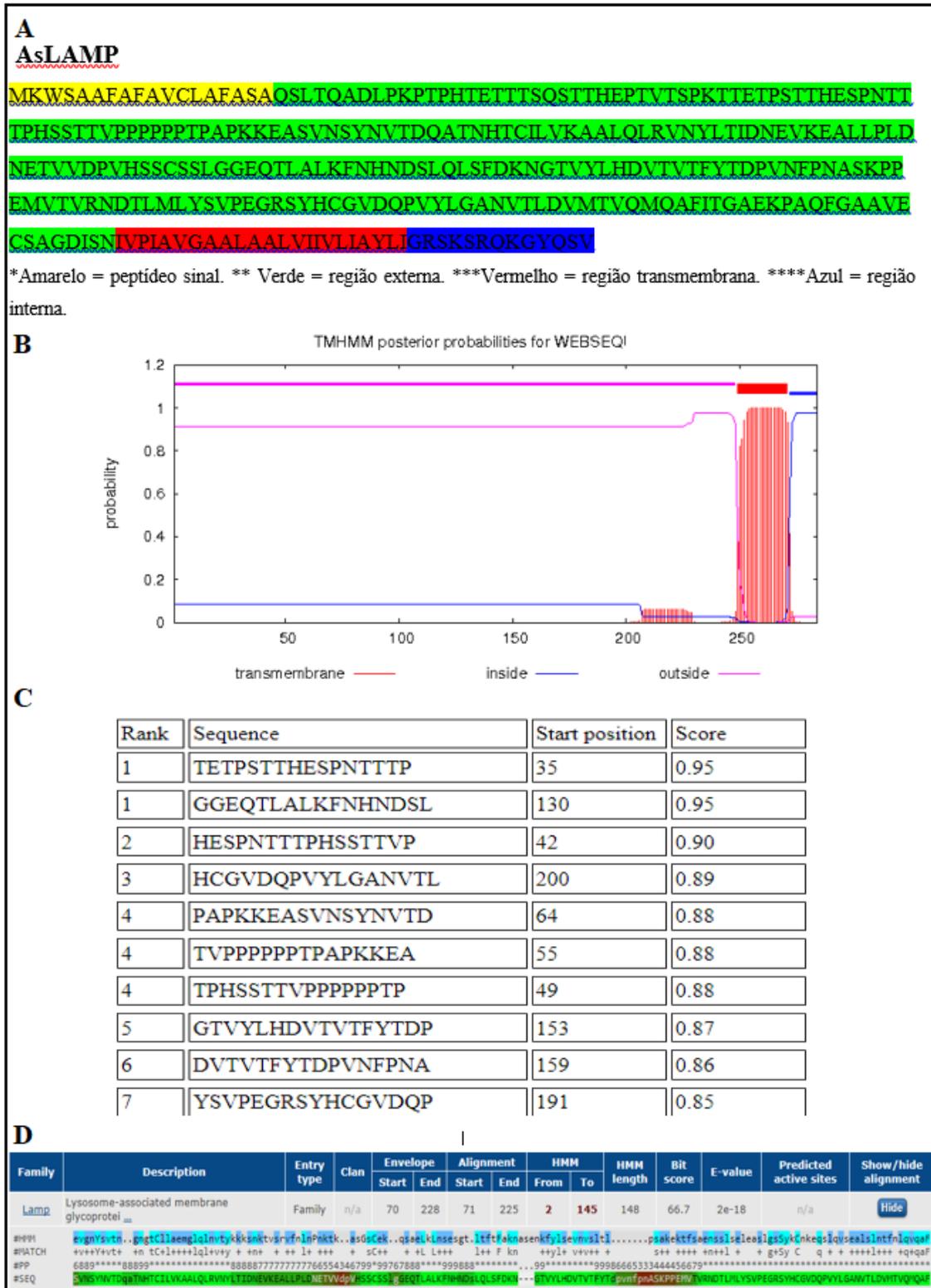


Figura 21: Características da estrutura primária da proteína AsLAMP. Sequência de aminoácidos, presença de peptídeo sinal e localização de aminoácidos em relação à membrana celular do epitélio intestinal (A), a identificação de regiões transmembrana (B), epitopos antigênicos preditos para células B (C) e a presença de domínio do tipo Lysosome-associated membrane protein (LAMP) (D).

5.4.2. Montagem de um alvo vacinal através da identificação *in silico* de epitopos de moléculas intestinais

No intuito de produzir um peptídeo altamente antigênico que pudesse ser usado como alvo vacinal, todas as sequências de um transcriptoma de intestino de *A. sculptum* montado pelo LFIH em conjunto com o NIH foram submetidas à identificação de epitopos para célula B utilizando uma ferramenta desenvolvida pela Prof.^a Daniella Bartholomeu do ICB/UFMG. Os epitopos identificados foram ranqueados e a sequência codificadora que continha cada epitopo foi identificada. Cada uma das sequências foi avaliada utilizando diferentes ferramentas quanto à presença de peptídeo sinal e localização na membrana do epitélio intestinal, isto é, se possuíam peptídeo sinal e se eram transmembrana ou ancoradas na membrana do epitélio intestinal. Em seguida, todos os epitopos selecionados foram avaliados quanto a localização e apenas aqueles presentes na região externa da membrana foram mantidos na seleção. A partir dessa análise, foi possível identificar 22 epitopos preditos para células B provenientes de sete proteínas de membrana do epitélio intestinal de *A. sculptum* (Tab. 5). Dos 22 epitopos selecionados, dois estão contidos na AsMucin, quatro na AsAPP, dois na AsLAMP e os outros 14 de outras quatro proteínas expressas no intestino. Das quatro, três possuem sequências de nucleotídeos publicadas no GenBank: Duas delas, proteínas possivelmente ancoradas à membrana (GBBK01001784.1 e GEEX01010907.1) por GPI e a outra (GEEX01003209.1) por uma região transmembrana. A última, identificada como “Transmembrana” (sequência no Anexo III) não obteve correspondência com nenhuma proteína de *A. sculptum* catalogada no GenBank.

Tabela 5: Epitopos selecionados a partir das proteínas de membrana de *A sculptum*.

	Epitopo	Sequência	Score
1	GKEQQSPSRPRPACTA	GBBK01001784.1	0,92
2	AFGSSTPRTFDLDLAT	GBBK01001784.1	0,92
3	KRLIWEADHERKEAML	GBBK01001784.1	0,91
4	EERRRRIEEMRHRDQE	GBBK01001784.1	0,90
5	QGGSGPPQHPVVLVTP	GEEX01003209.1	0,92
6	PQAAQGPVVHPVWANT	GEEX01003209.1	0,92
7	SSQPQEPTYETPHTSP	GEEX01003209.1	0,91
8	PSSWPSQPHPDNPAVS	GEEX01003209.1	0,90
9	TVTTPSPTVPVTNATT	AsMucin	0,93
10	TVAPTTAVPPTALPPP	AsMucin	0,91
11	TTTLTLPPGPAKSVNP	Transmembrana	0,94
12	DADQRQPPEMMVTNTT	Transmembrana	0,92
13	SEDDYDDDYSDEDDDD	AsAPP	0,91
14	SSTVPPPVAAMAPVAP	AsAPP	0,90
15	RQHGGDAEEVRTHLTS	AsAPP	0,90
16	SELEQHYEAMKARDPK	AsAPP	0,89
17	TETPSTTHESPNTTTP	AsLAMP	0,95
18	HESPNTTTPHSSTTVP	AsLAMP	0,90
19	PPLIEPTFAHDPRKAN	GEEX01010907.1	0,89
20	EEASEAATSSDTTSDT	GEEX01010907.1	0,86
21	VVPPPAPATPDKRANM	GEEX01010907.1	0,97
22	TGSGDFDDEFDDFKSA	GEEX01010907.1	0,94

Os 22 epitopos foram utilizados para produzir uma proteína quimérica a ser usada como alvo vacinal. Para isto, foi montada uma sequência de nucleotídeos que continha diferentes regiões que codificavam os 22 epitopos selecionados, intercalados por nucleotídeos que codificavam a sequência GSGSG como espaçadores, além de nucleotídeos que codificavam duas caudas de histidina (no início e no final) e outros aminoácidos necessários para a clonagem em vetor de expressão (Fig. 22). A construção montada codifica uma proteína recombinante de 484 aminoácidos com peso molecular de 48,5 kDa, pI = 5,08 e foi chamada de rAsQuimera.

MG **HHHHH**ENLYFQGHMAS **GKEQQSPSRPRPACTA** **GSGSG**AFGSSTPRTFDL~~DLA~~T
GSGSGKRLIWEADHERKEAML **GSGSG**EERRRRIEMRHRDQE **GSGSG**QGGSGPPQHP
 VVLVTP**GSGSG**PQAAQGPVVHPVWANT **GSGSG**SSQPQEPTYETPHTSP **GSGSG**PSSW
 PSQPHPDNPAVS **GSGSG**TVTTPSPTVPVTNATT **GSGSG**TVAPTTAVPPTALPPP**GSGSG**
 TTTLTLPPGPAKSVNP**GSGSG**DADQRQPPEMMVTNTT **GSGSG**SEDDYDDDYSD~~EDD~~
 DD**GSGSG**SSTVPPPVAAMAPVAP**GSGSG**RQHGGDAEEVRTHLTS **GSGSG**SELEQH~~YE~~
 AMKARDPK **GSGSG**TETPSTTHESPNTTTP **GSGSG**HESPNTTTPHSSTTV**GSGSG**PPLI
 EPTFAHDPRKAN **GSGSG**EEASEAATSSD~~TTSDT~~ **GSGSG**VVPPPAPATPDKRANM**GSG**
SGTGSGDFDDEFDDFKSALE **HHHHH**.

Figura 22: Sequência de aminoácidos da proteína rAsQuimera. As regiões destacadas são: Vermelho = Caudas de polihistidina utilizadas para a purificação por cromatografia de afinidade – Ni-NTA; Azul = Sítio de clivagem para a enzima TEV; Cinza = Sítios de restrição utilizados para clonagem; Verde = Epitopos selecionados; Amarelo = Espaçadores.

5.5. Avaliação do potencial vacinal dos antígenos selecionados contra o *A. sculptum*

5.5.1. Produção das proteínas recombinantes para realização dos ensaios vacinais

Foram selecionados sete antígenos para os testes em ensaios vacinais, sendo eles AsKunitz, As8.9kDa, AsBasicTail, AsMucins, AsLAMP, AsAPP e AsQuimera. As proteínas recombinantes relativas aos alvos AsKunitz, As8.9kDa, AsBasicTail foram produzidas anteriormente para utilização na caracterização funcional e, estes mesmos recombinantes, foram usados nas formulações vacinais.

Para a produção das proteínas recombinantes que apresentassem as regiões extracelulares e imunogênicas de AsMucin, AsAPP e AsLAMP, sequências de DNA foram amplificadas por PCR em que o molde foi cDNA produzido a partir dos intestinos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas parcialmente e os iniciadores desenhados especificamente para cada alvo. A análise da PCR por meio do gel de agarose 1,5% evidenciou a presença de um produto posicionado na faixa de 300 pb para AsMucin e 600 pb para AsAPP e AsLAMP, tamanhos compatíveis aos produtos esperados (Fig. 23).

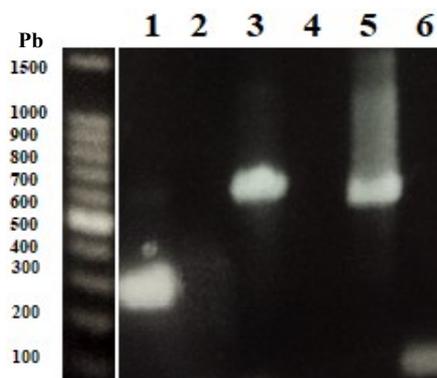


Figura 23: Amplificação da sequência de DNA codificante com os iniciadores relativos à AsMucin, AsAPP e AsLAMP por PCR. Produtos visualizados em gel de agarose a 1,5%. Colunas: 1-AsMucin; 2-AsMucin sem cDNA; 3-AsAPP; 4-AsAPP sem cDNA; 5-AsLAMP; 6-AsLAMP sem cDNA.

Os produtos de PCR obtidos foram utilizados no processo de clonagem, para a produção das proteínas recombinantes. Essas, por sua vez, apresentaram os pesos moleculares e pontos isoelétricos (pI) estimados mostrados na Tabela 6 e as sequências de aminoácidos mostrados na Fig. 24.

Tabela 6: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas intestinais maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em *E. coli BL21*.

	AsMucin	rAsMucin	AsAPP	rAsAPP	AsLAMP	rAsLAMP
Peso (kDa)	19,3	12,46	65,2	28,49	83,5	25,74
pI	4,47	6,54	6,36	6,35	4,55	5,83

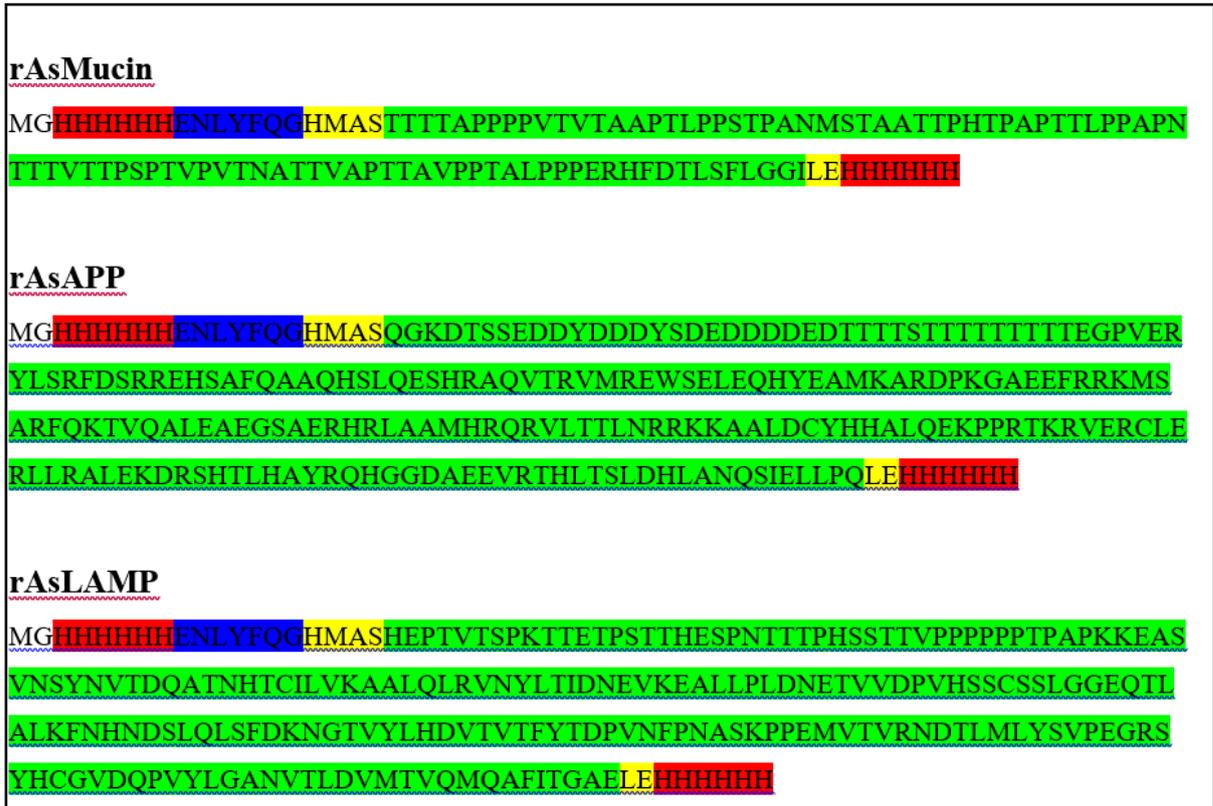


Figura 24: Sequência de aminoácidos das proteínas intestinais recombinantes produzidas em *E. coli* BL21. As regiões destacadas são: Vermelho = Caudas de polihistidina utilizadas para a purificação por cromatografia de afinidade – Ni-NTA; Azul = Sítio de clivagem para a enzima TEV; Verde = Sequência da recombinante homologa à nativa; Amarelo = Sítios de restrição.

Após a expressão, os produtos foram analisados em SDS-PAGE, sendo possível observar que a rAsMucin ficou próxima à marcação relativa a 25 kDa do padrão (Fig. 25A), com aproximadamente o dobro do peso esperado. Já a rAsAPP (Fig. 25B) e a rAsLAMP (Fig. 25C) se posicionaram no SDS-PAGE ligeiramente acima de 25 kDa, como esperado.

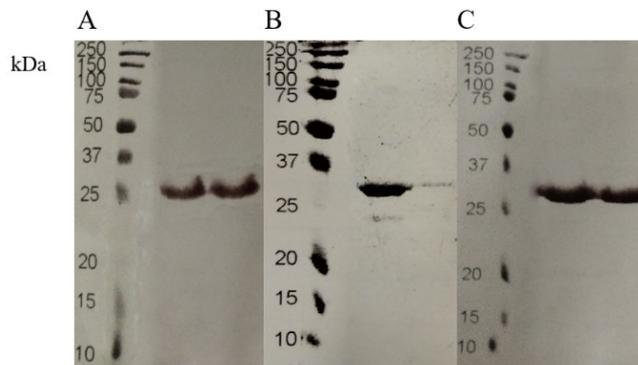


Figura 25: SDS-PAGE de alíquotas purificadas de rAsMucin (A), rAsAPP (B) e rAsLAMP (C). Coloração por azul de comassie.

Com o objetivo de confirmar se as proteínas purificadas corresponderam, de fato, às recombinantes, a técnica do western blotting utilizando anticorpos anti-cauda de histidina foi aplicada para cada uma delas. Na membrana com a rAsMucin (Fig. 26A) pudemos ver que os anticorpos se ligaram fortemente a um produto de aproximadamente 25 kDa e coincidiu com a banda observada no SDS-PAGE. As membranas referentes à rAsAPP (Fig. 26B) e rAsLAMP (Fig. 26C), reveladas, apresentaram bandas correspondentes àquelas observada no SDS-PAGE, que ficaram ligeiramente acima da marcação de 25 kDa. Nas membranas da rAsMucin e da rAsLAMP, também foi possível observar bandas com aproximadamente o dobro do tamanho esperado para as recombinantes, o que sugere a presença de dímeros. Os resultados indicam que as proteínas recombinantes foram produzidas em quantidade e pureza satisfatórias para serem, em seguida, utilizadas nos ensaios vacinais.

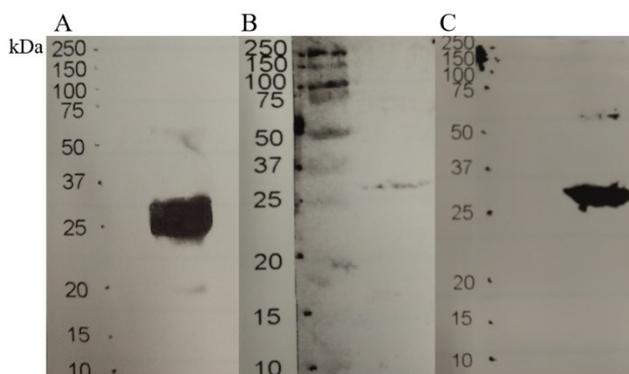


Figura 26: Western blotting de rAsMucin (A), rAsAPP (B) e rAsLAMP (C) utilizando anticorpos anti-cauda de histidina. Foi aplicado 5 μ g de cada proteína recombinante nos géis utilizados no western blotting.

Para a produção da rAsQuimera, a construção do vetor, adquirida comercialmente da empresa FastBio, foi inserida em bactérias *E. coli* BL21 e produzida utilizando protocolos semelhantes aos usados para as outras proteínas. A proteína produzida foi purificada em coluna de níquel e avaliada em SDS-PAGE (Fig. 27), onde foi possível observar uma banda de peso estimado de 48 kDa, que é compatível com o tamanho estimado da proteína. No entanto, também houve outras bandas de tamanho superior, de forma semelhante ao observado no gel das outras recombinantes, que poderiam ser dímeros ou outros polímeros formados. Com o objetivo de confirmar se a proteína purificada correspondeu, de fato, à quimera, a técnica do *western blotting* utilizando anticorpos anti-cauda de histidina foi aplicada. Na membrana (Fig. 27) pudemos ver que os anticorpos se ligaram fortemente às bandas observadas no SDS-PAGE, indicando que essas podem ser dímeros da proteína quimérica.

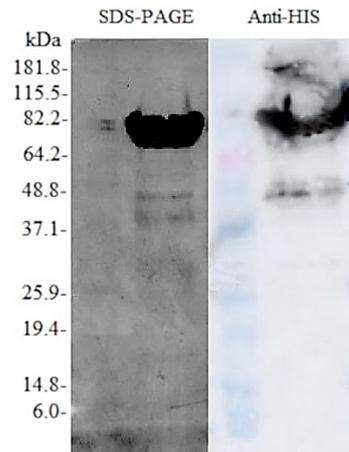


Figura 27: Análise da rAsQuimera em SDS-PAGE após produção em bactérias e purificação em colunas de níquel e *western blotting* utilizando anticorpos anti-cauda de histidina. Coloração por nitrato de prata.

5.5.2. Avaliação do potencial vacinal dos alvos selecionados

5.5.2.1. Produção de anticorpos antígeno-específicos no soro dos hospedeiros imunizados

A resposta humoral antígeno-específica foi avaliada para os grupos experimentais através da quantificação dos níveis de IgG através da técnica do ELISA indireto. A análise revelou que todos os antígenos testados induziram uma resposta com produção de IgG antígeno-específico após a vacinação dos camundongos, visto que em todos os grupos pudemos observar um aumento médio significativo dos níveis de anticorpos em relação ao grupo controle, que não recebeu antígenos na vacinação (Fig 28). Para os antígenos recombinantes salivares e a proteína quimérica, os níveis de IgG dos camundongos foram avaliados após o desafio com os adultos, revelando que, para a rAsKunitz ($P < 0,05$), rAs8.9kDa ($p < 0,001$) e a recombinante quimérica ($p < 0,001$), os níveis de IgG ainda foram significativamente maiores que o controle mesmo após 60 dias da data do desafio, ao passo que para a AsBasicTail os níveis séricos de IgG antígeno-específico não foram significativamente mais altos que o controle após 30 dias do desafio.

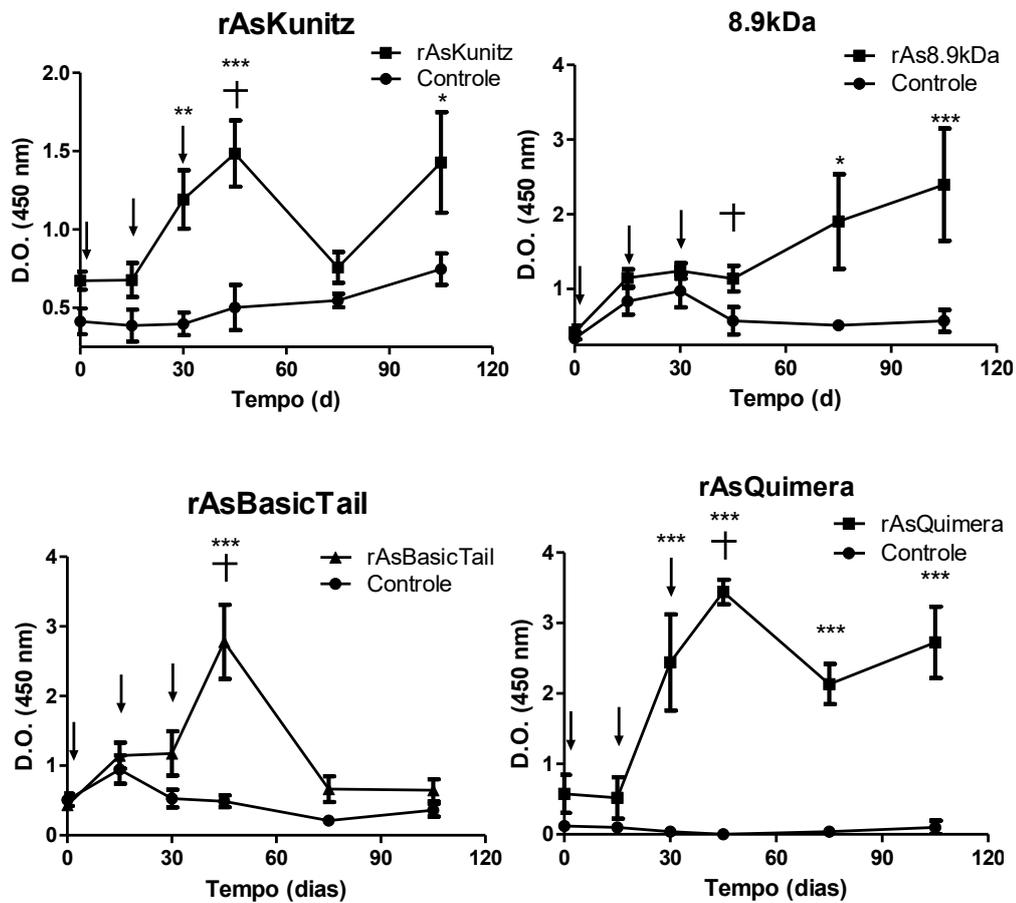


Figura 28: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos salivares recombinantes e quimera e desafio com *A. sculptum*. Os níveis de IgG totais no soro dos animais vacinados foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto e comparados com aqueles do grupo controle. As setas indicam os dias das imunizações e a cruz representa o dia do desafio. Dados representados por média \pm EP. ANOVA – Dois fatores - Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A produção de anticorpos antígeno-específicos também foi avaliada para os camundongos imunizados com as proteínas intestinais recombinantes. Obtivemos os soros de camundongos do grupo controle (adjuvante) e recombinantes (rAsMucin; rAsAPP e rAsLAMP + adjuvante) 15 dias após a terceira imunização. Através da técnica do ELISA indireto, observamos um aumento significativo dos níveis de IgG ($p < 0,001$) específicos para os três antígenos testados, indicando que estes foram capazes de induzir uma resposta humoral satisfatória nos hospedeiros (Fig. 29).

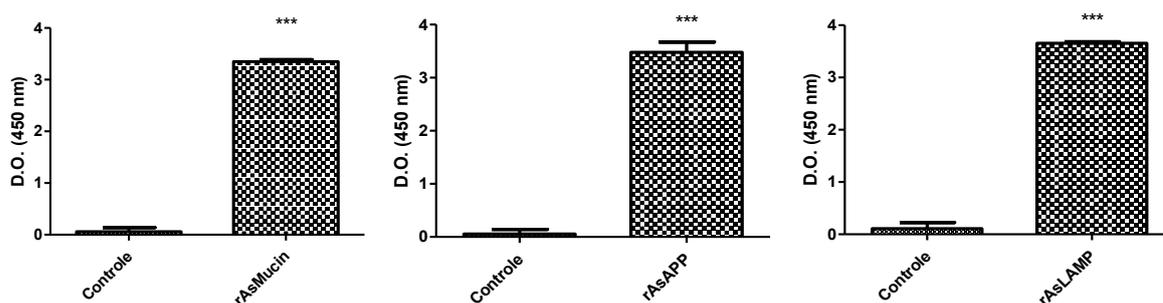


Figura 29: Resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com antígenos intestinais recombinantes. Os níveis de IgG totais no soro dos animais vacinados foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto e comparados com aqueles do grupo controle. Teste t. *** $p < 0,001$.

5.5.2.2. Ensaios vacinais com proteínas salivares

Foram realizados testes com fêmeas de *A. sculptum*, que se alimentaram em camundongos imunizados com as proteínas salivares recombinantes, tendo seus parâmetros alimentares e reprodutivos avaliados. Em todos os grupos avaliados houve mortalidade de fêmeas durante o processo alimentar ou antes de realizar a oviposição. Portanto, o primeiro parâmetro avaliado foi a taxa de mortalidade das fêmeas submetidas ao repasto sanguíneo nos diferentes grupos, através do qual observamos um aumento dentre as fêmeas dos grupos imunizados com cada um dos três antígenos salivares. Os maiores níveis foram obtidos no grupo 8.9kDa, cuja taxa foi de 58,3%, valor praticamente duas vezes maior que a do grupo controle (Tab. 7).

Tabela 7: Mortalidade de fêmeas e ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com antígenos salivares recombinantes.

Ínstar/Grupo	Controle	rAsKunitz	rAs8.9kDa	rAsBasicTail
Fêmeas (%)	30.0	41.6	58.3	33.3
Ninfas (%)	32.0	70.0	100.0	100.0

Os dados relacionados ao tempo médio necessário para a realização do processo alimentar (Fig 30A), o peso médio das fêmeas após o fim do processo (Fig 30B) e o peso médio da massa de ovos gerada por cada uma delas (Fig 30C) também foram obtidos. No entanto, as variações observadas dentre os diferentes grupos imunizados não foram significativas ($p > 0,05$)

em relação ao controle. Porém, quando avaliamos a viabilidade dos ovos gerados pelas fêmeas pertencentes aos diferentes grupos, por meio de sua taxa de eclosão, observamos uma grande variação em relação ao grupo controle (Fig 30D). De todas as massas de ovos geradas pelas fêmeas do grupo 8.9kDa (n=6), foi observado o surgimento de larvas de apenas uma. Dessa forma, a taxa de eclosão média do grupo foi de apenas 4,4%, valor significativamente menor ($p<0,01$) que a média do grupo controle (40,8%). A taxa observada no grupo Kunitz também foi significativamente menor ($p<0,01$) em relação ao controle, com apenas 7.14% de eclosão. Apesar de não ter sido significativamente menor que o controle, a eclosão média observada nos ovos do grupo BasicTail foi de 18,3%, valor consideravelmente mais baixo que o controle.

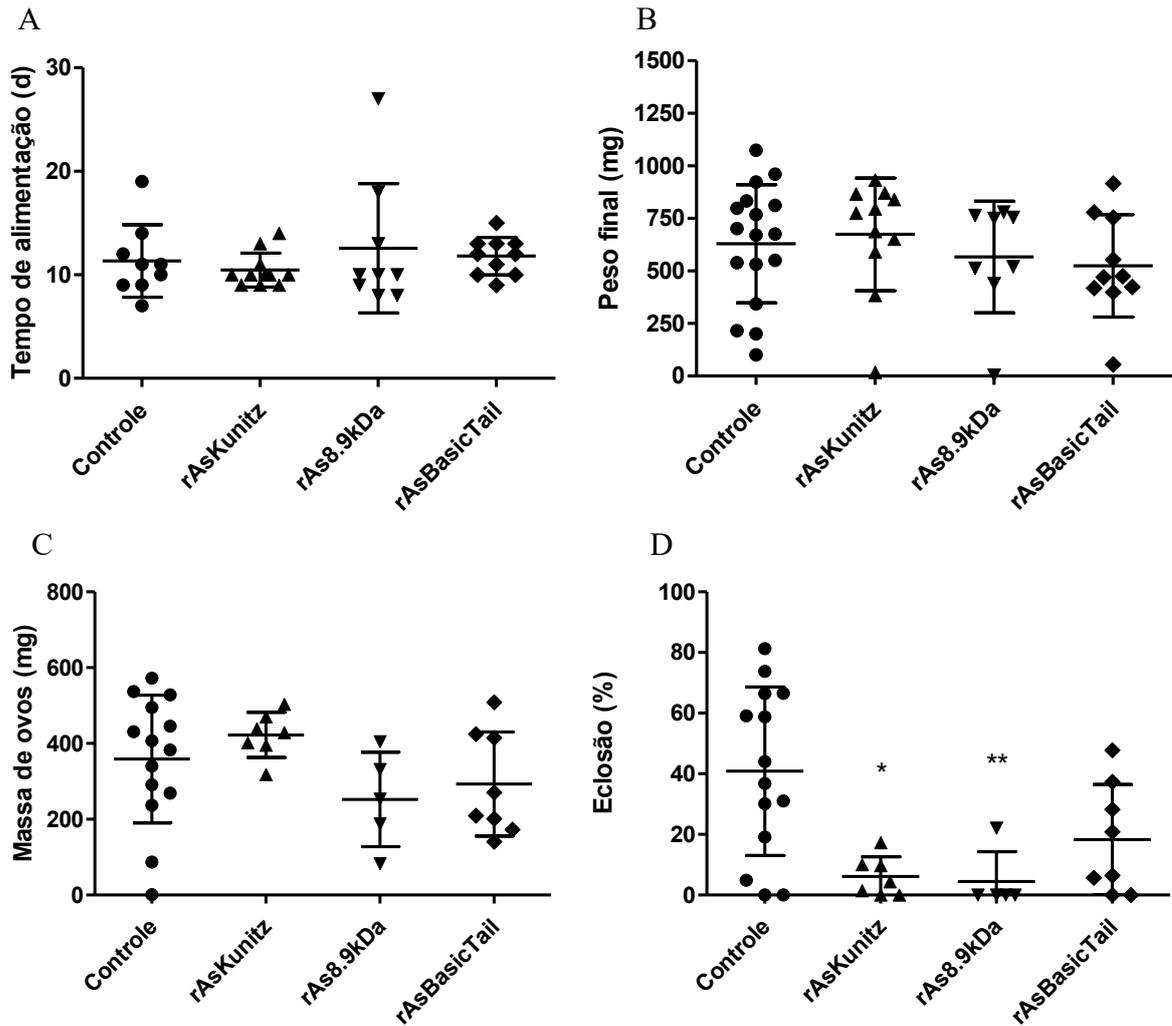


Figura 30: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais. Dados representados por média \pm DP. Tempo médio de alimentação (A), Peso final médio após alimentação (B), Peso médio da massa de ovos produzidos pelas fêmeas (C) e Taxa de eclosão dos ovos (D). Kruskal-Wallis – Dunn's, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Ninfas de *A. sculptum* também foram alimentadas nos grupos imunizados com as proteínas recombinantes salivares e tiveram seus parâmetros alimentares analisados. Foi possível observar uma taxa de 100% de mortalidade das ninfas que alimentaram em camundongos imunizados com rAs8.9kDa e rAsBasicTail. A taxa de mortalidade no grupo rAsKunitz também foi alta, chegando a 70%. No grupo controle, por sua vez, apenas 30% das ninfas morreram durante a alimentação ou após a alimentação, porém antes de realizar a muda (Tab. 7). A duração da hematofagia e o peso final também foram analisados, porém apenas no grupo rAsKunitz, uma vez que este foi o único no qual restaram ninfas vivas durante o ensaio vacinal. Nessa análise foi constatado que o tempo médio de alimentação das ninfas do grupo

rAsKunitz foi de 5,8 dias, valor significativamente maior ($p < 0,05$) que os 5,2 dias necessários para o repasto dos carrapatos do grupo controle (Fig. 31A). Por fim, o peso final das ninfas dos grupos controle e rAsKunitz após o repasto sanguíneo foi calculado. No entanto, não foi observada variação significativa nesse parâmetro e a média dos dois grupos foi de aproximadamente 12 mg (Fig. 31B).

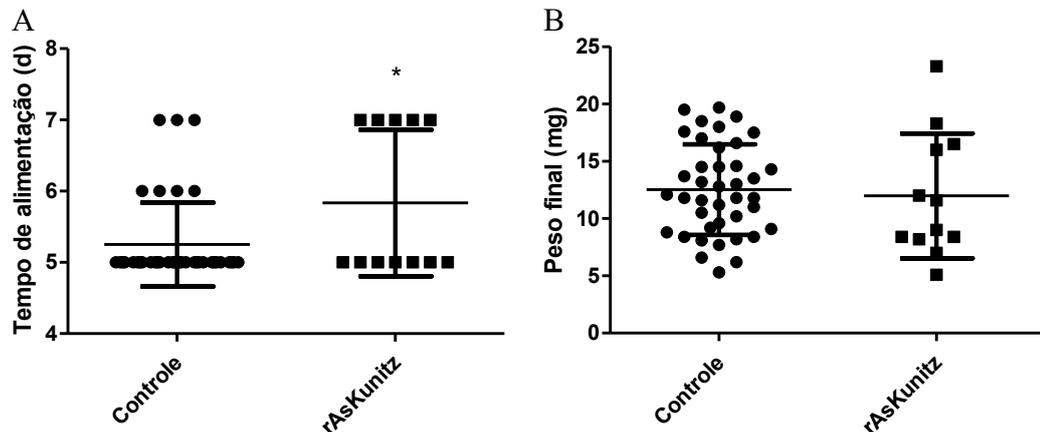


Figura 31: Parâmetros Alimentares de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais. Dados representados por média \pm DP. Tempo médio de alimentação (A) e Peso final médio (B). Mann-Whitney, $*p < 0.05$.

A partir dos índices de ingurgitamento das fêmeas, oviposição e eclosão dos ovos gerados foi possível quantificar a eficácia de cada um dos antígenos contra *A. sculptum* (Tab. 8). Na comparação entre os três antígenos, a proteína rAs8.9kDa apresentou valor de 92.89%, a maior taxa de eficácia dentre os antígenos testados. Esse valor foi bem próximo àquele obtido com a vacinação com rAsKunitz, de 85.37%. A vacinação com rAsBasicTail, por sua vez, resultou no menor desempenho entre os alvos testados, com eficácia de 59.62%. Esses resultados sugerem que imunizações de camundongos com rAs8.9kDa, rAsKunitz e rAsBasicTail podem ser capazes de afetar parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum*.

Tabela 8: Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com os antígenos salivares recombinantes de *A. sculptum* e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas.

	rAsKunitz	rAs8.9kDa	rAsBasicTail
CRT	1,07	0,78	0,98
CRO	1,24	0,81	0,79
CRF	0,11	0,11	0,52
Eficácia (%)	85,32	92,89	59,45

5.5.2.3. Ensaios vacinais com proteínas intestinais

Os parâmetros alimentares e reprodutivos também foram avaliados nas fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo em hospedeiros imunizados com antígenos intestinais. A taxa de mortalidade foi o primeiro a ser avaliado, revelando que não houve aumento expressivo em nenhum dos grupos, apesar de um leve crescimento na taxa de fêmeas mortas durante o repasto ou antes da oviposição, nos grupos rAsLAMP e rAsQuimera, em relação ao controle (Tab. 9).

Tabela 9: Mortalidade de fêmeas e ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com antígenos intestinais.

	Controle	Extrato intestinal	rAsMucin	rAsAPP	rAsLAMP	rAsQuimera
Mortalidade (%)	30	12,5	12,5	12,5	37,5	40,0

De forma semelhante aos resultados observados na imunização com os antígenos salivares, não houve variação significativa no tempo necessário para realização da hematofagia (Fig. 32A) e nem no peso das fêmeas ingurgitadas (Fig. 32B). No entanto, os valores relativos às fêmeas do grupo rAsQuimera foram os que mais variaram em relação ao controle, relevando uma tendência de aumento do tempo de contato com o hospedeiro, que foi de 12 dias no controle e 14 dias no rAsQuimera, em média. Já o peso médio das fêmeas no grupo controle foi de 629 mg, contra 473 mg das fêmeas do grupo rAsQuimera, indicando que as últimas tiveram menos eficiência na ingestão do sangue. Novamente, não observamos variação significativa no peso médio da massa de ovos das fêmeas dos diferentes grupos (Fig. 32C), apesar do valor médio obtido no grupo da imunização com o extrato intestinal (269 mg) ter sido consideravelmente

mais baixo que o do grupo controle (340 mg). Entretanto, a análise da taxa de eclosão dos ovos revelou que as médias de todos os grupos, exceto rAsLAMP, foram mais baixas que a do controle. A taxa de eclosão no grupo rAsQuimera, por sua vez, foi significativamente menor ($p < 0,05$), com valor médio igual a 9,3%, contra 40,8% no grupo controle (Fig. 32D), indicando baixa viabilidade dos ovos produzidos pelas fêmeas do grupo. Igualmente às recombinantes salivares, ninfas foram submetidas à alimentação nos camundongos imunizados com a recombinante quimérica e, como resultado, pudemos observar 100% de mortalidade durante o processo alimentar.

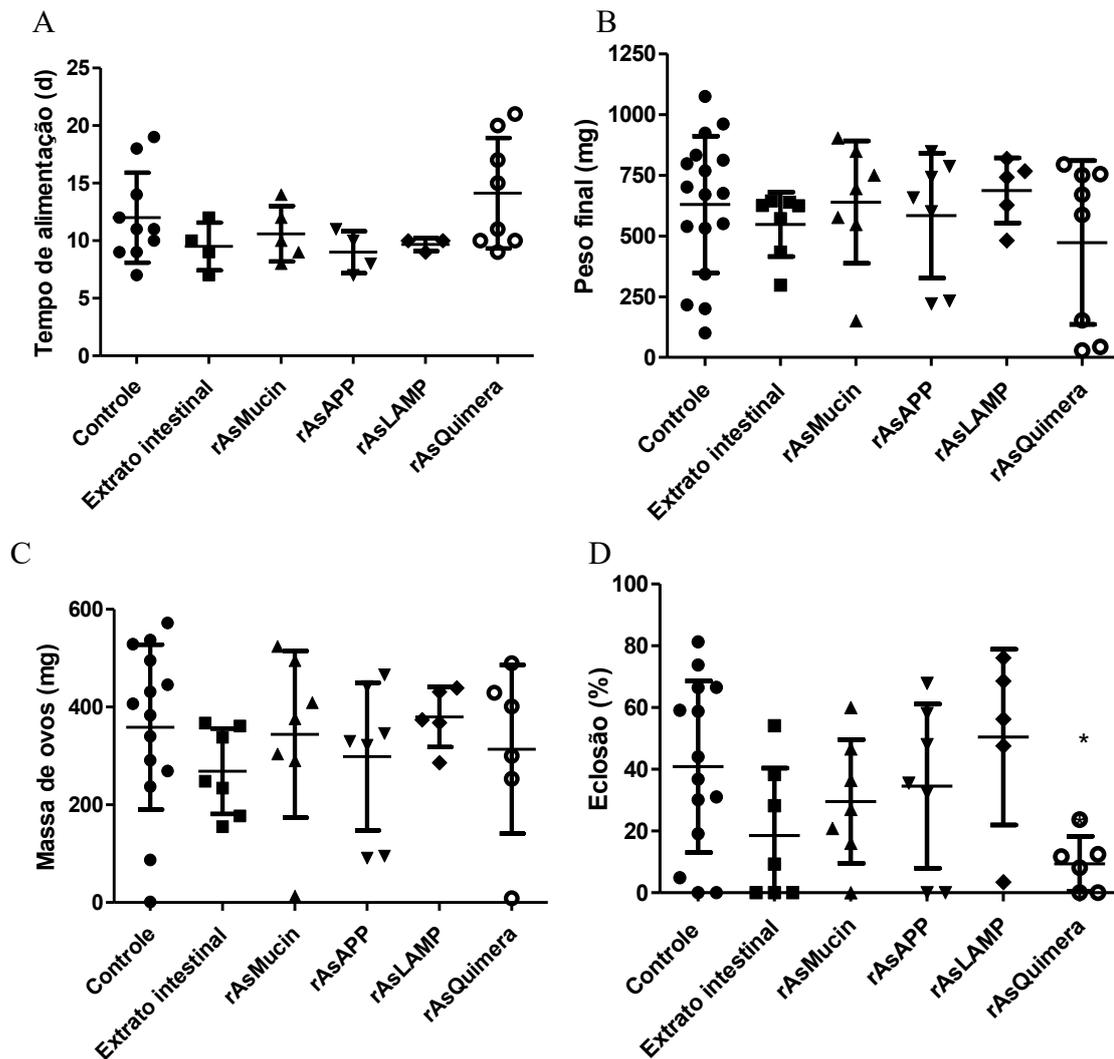


Figura 32: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais intestinais. Dados representados por média \pm DP. Tempo médio de alimentação (A), Peso final médio após alimentação (B), Peso médio da massa de ovos produzidos pelas fêmeas (C) e Taxa de eclosão dos ovos (D). ANOVA – Dunnet, * $p < 0,05$.

A análise dos dados obtidos nos permitiu verificar a eficácia de cada um dos alvos testados. A proteína quimérica apresentou 80,84% de eficácia, a maior dentre todos os antígenos intestinais. O uso do extrato intestinal como formulação vacinal revelou uma eficácia de 51,79%, valor consideravelmente mais baixo que a anterior. Já a proteína recombinante rAsAPP apresentou um valor bem mais baixo que as duas, apenas 26,64%, enquanto as restantes, rAsMucin e rAsLAMP não foram eficazes contra o parasitismo realizado por *A. sculptum* (Tab. 10).

Tabela 10: Coeficientes de redução de fêmeas ingurgitadas (CRT), oviposição (CRO) e fertilidade dos ovos (CRF) relativos à vacinação com o extrato intestinal e antígenos intestinais recombinantes de *A. sculptum* e suas taxas de eficácia no controle da infestação por fêmeas.

	Extrato intestinal	rAsMucin	rAsAPP	rAsLAMP	rAsQuimera
CRT	1,03	1,03	1,03	0,74	0,94
CRO	0,91	1,17	1,01	1,28	0,80
CRF	0,52	0,90	0,70	1,25	0,26
Eficácia (%)	51,80	-7,89	26,65	-18,04	80,84

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho tem como meta desenvolver novos métodos de controle de carrapatos baseados na vacinação de hospedeiros. Até o presente momento, esse foi o primeiro trabalho no qual se abordou essa forma de controle para o *A. sculptum*. Realizamos uma seleção de alvos antigênicos expressos no intestino e nas glândulas salivares com base em características desejáveis para antígenos vacinais, fizemos a produção das proteínas de forma recombinante e as testamos em ensaios que nos permitiram quantificar sua eficácia no controle do parasitismo. Paralelamente, as proteínas salivares recombinantes produzidas e testadas como antígenos vacinais também passaram por uma ampla caracterização funcional, cujo objetivo foi elucidar sua importância e seu papel no processo alimentar do carrapato.

A principal estratégia usada na escolha dos alvos salivares foi buscar por aqueles que codificassem proteínas com domínios ou estruturas que pudessem sugerir sua atuação como anti-hemostáticos ou inibidores da resposta imune, além de serem altamente expressos durante o repasto sanguíneo. A hipótese do trabalho é que a atuação do sistema imune do hospedeiro contra essas proteínas no sítio alimentar poderia ser prejudicial para o processo alimentar do parasito. Dessa forma, o primeiro alvo foi uma proteína pertencente à família kunitz, amplamente presente em carrapatos e outros artrópodes hematófagos (Mans & Neitz 2004, Francischetti et al. 2009, Koh & Kini 2009). Vários representantes dessa família, que podem possuir de um a sete domínios do tipo kunitz-like, são classificados como inibidores de serino proteases e compõem a maioria das moléculas com função antihemostática produzidas por carrapatos identificadas até o momento (Parizi et al. 2018, Chmelař et al. 2019).

O segundo alvo, caracterizado como uma proteína 8.9kDa faz parte de uma superfamília de proteínas exclusiva dos carrapatos ixodídeos, a 8.9 kDa superfamily. Esteves et al. (2017) identificaram 24 transcritos relativos a proteínas dessa família no transcriptoma salivar de *A. sculptum*, sendo que a expressão gênica de 23 deles foi positivamente regulada nas glândulas salivares de fêmeas parcialmente alimentadas, enfatizando a importância das proteínas dessa família na realização do processo alimentar. Contudo, até o momento, nenhum representante da família havia sido caracterizado funcionalmente, apesar de um possível papel na imunidade dos carrapatos já ter sido especulado por Kotsyfakis et al. (2015a).

O último alvo codifica uma proteína da “*Basic Tail Protein Family*”, que é exclusiva de carrapatos ixodídeos e argasídeos e que possui alguns representantes que já foram identificados como inibidores de serino proteases. Estas proteínas são caracterizadas, sobretudo, pela

basicidade da região carboxi-terminal rica em resíduos de lisina de suas integrantes, mas que pode também ser inexistente ou até mesmo ter caráter ácido (Valenzuela et al. 2002, Ribeiro et al. 2006, Francischetti et al. 2009).

A análise da expressão gênica dos alvos selecionados, em carrapatos alimentados ou em jejum, revelou que os três são expressos durante as fases de larva, ninfa e adultos, além de serem regulados positivamente nos carrapatos durante a hematofagia, em quase todos os instares. Esses perfis de expressão são indicativos de que os genes analisados codificam proteínas fortemente relacionadas à hematofagia. A regulação positiva de genes ao longo da alimentação foi demonstrada anteriormente em diferentes trabalhos. Esteves et al. (2017) realizaram a comparação entre transcriptomas salivares de fêmeas de *A. sculptum* em jejum e parcialmente alimentadas, observando um perfil de regulação positiva da maioria das sequências codificadoras de proteínas secretadas, que passaram de 11% para 36% do total de leituras após 72 horas de repasto sanguíneo. As sequências codificadoras de proteínas do tipo Kunitz, Basic tail e 8.9 kDa também apresentaram grande aumento no número de leituras durante a hematofagia, o que corrobora com nossos resultados. Resultados semelhantes também já foram observados nos sialotranscriptomas de outros representantes do gênero, como o *A. maculatum* (Karim et al. 2011) e *A. americanum* (Karim & Ribeiro 2015). Nesses trabalhos os autores chamam atenção para a grande diversidade de sequências codificantes de proteínas salivares secretadas dentro das diferentes famílias ao longo da alimentação. A expressão de diferentes sequências codificantes de proteínas homólogas ou que possuam funções semelhantes em períodos variados do repasto levaria a uma mutação da composição salivar durante o processo, num mecanismo de variação antigênica, cuja principal vantagem seria evitar o reconhecimento por parte do sistema imune do hospedeiro (Kotsyfakis et al. 2007, Esteves et al. 2017). Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo causador dessas variações, que poderiam ser causadas por um relógio interno do parasito ou até mesmo pela presença de um tipo de sensor biológico capaz de avaliar o estresse alimentar ao longo do contato com o hospedeiro (Karim & Ribeiro 2015). Porém, já foi observado que a expressão de genes relacionados ao processo alimentar foi mais alta nas glândulas de carrapatos que se alimentaram em hospedeiros vivos, em comparação com a de carrapatos que ingeriram solução artificial desfibrinada e depletada de componentes do sistema imune (Perner et al. 2018), corroborando com a segunda hipótese.

O perfil da expressão de AsKunitz, As8.9kDa e AsBasictail em fêmeas durante o repasto evidenciou a ocorrência de picos de expressão, que por sua vez, ocorreram em fases diferentes do processo. Levando essa variação da composição antigênica da saliva em consideração, a utilização dos alvos, em conjunto, em uma vacina multicomponente poderia ser desejável pois,

dessa forma, o sistema imune do hospedeiro vacinado seria capaz de reconhecer antígenos produzidos ao longo de todas as fases da alimentação.

Outro fator interessante a ser observado foi o nível de aumento na expressão gênica de AsKunitz nas glândulas salivares de fêmeas após apenas um dia fixado no hospedeiro, na ordem de 18 milhões de vezes. Apesar de não terem detectado aumentos dessa proporção nos transcriptomas de *A. americanum*, Karim & Ribeiro (2015) observaram que a maioria das CDSs relativas a proteínas do tipo kunitz têm seus níveis de expressão fortemente aumentados após um curto período de apenas 12 horas de repasto.

Os ensaios hemolíticos realizados demonstraram que as recombinantes salivares rAsKunitz, rAs, 8.9kDa e rAsBasicTail, testadas separadamente, são capazes de opor a ativação do sistema do complemento humano tanto na via clássica quanto na alternativa. Franco et al. (2016) já haviam demonstrado que a saliva do *A. sculptum* apresenta atividade inibidora da via clássica, mas nenhuma proteína havia sido identificada. A saliva de *R. microplus* também foi testada através de ensaios hemolíticos e apresentou atividade inibidora tanto da via clássica quanto da alternativa do complemento (Silva et al. 2016). No entanto, o perfil de inibição dessas duas espécies difere daquele observado em carrapatos do gênero *Ixodes*, que já tiveram uma série de inibidores salivares caracterizados até o momento e, em sua maioria, atuam exclusivamente sobre as vias alternativa e das lectinas (Schroeder et al. 2009, Schuijt et al. 2011a). Esse dado é um indicio de que os mecanismos de inibição do complemento devem ser bem diferentes entre os carrapatos dos grupos metastriata e prostriata.

rAsKunitz e rAs8.9kDa bloquearam a ativação da via clássica e são os primeiros inibidores do complemento descritos para carrapatos em suas respectivas famílias. O mecanismo de atuação da rAsKunitz ainda requer a realização de novos estudos para que seja elucidado, mas pode ser que esse inibidor atue sobre mais de um componente da cascata, já que foi observada uma inibição da ativação através da via alternativa, porém com menor eficiência. A atividade anticomplemento observada em rAs8.9kDa, por sua vez, pode ter relação com a presença do domínio relativo ao fator de von Willebrand em sua sequência, pois se sabe que o vWF atua como um cofator na regulação do sistema nos vertebrados, através da clivagem do fator C3b (Feng et al. 2015). Dessa forma, a proteína salivar também poderia estar atuando na inativação desse componente e, conseqüentemente, inibindo a ativação da cascata.

AsBasicTail, por sua vez, se opôs fortemente a ativação do complemento pela via alternativa. Portanto, podemos afirmar que se trata do primeiro inibidor dessa via identificado na espécie e também da família Basic Tail. No entanto, não se trata do primeiro inibidor do complemento caracterizado na família, já que outra integrante foi identificada na saliva de *I.*

scapularis. O TSLPI, homólogo a Salp14, atua no bloqueio da ativação da via das lectinas (Schuijt et al. 2011b, a).

Em complemento aos ensaios hemolíticos, pudemos verificar que os anticorpos presentes no soro de animais imunizados com cada uma das proteínas salivares recombinantes se mostraram capazes de interferir em sua atividade inibidora do complemento. Resultados semelhantes também foram observados em ensaios hemolíticos que envolveram um inibidor salivar de *L. longipalpis* incubado com diferentes concentrações de anticorpos específicos contra ele, tendo sua atividade bloqueada pela imunoprecipitação (Ferreira et al. 2016). Esse efeito é altamente desejável, caso as proteínas sejam utilizadas como antígenos vacinais, visto que a supressão da atividade salivar anticomplemento sobre o sangue ingerido contribuiria para a ativação da cascata no lúmen intestinal, culminando em lesões nas células epiteliais (Barros et al. 2009). Esse quadro, por sua vez, seria capaz de acarretar em perda de eficácia alimentar, reprodutiva ou até mesmo na morte do parasito (Willadsen et al. 1989). Adicionalmente, também já foi observado que o bloqueio da atividade de proteínas salivares com função anticomplemento também é capaz de prejudicar a transmissão de patógenos para os hospedeiros vertebrados (Daix et al. 2007, Tyson et al. 2007, Schuijt et al. 2011a, de Taeye et al. 2013), sugerindo que a imunização de hospedeiros com os antígenos salivares de *A. sculptum* também poderia ser capaz de interferir na transmissão da *R. rickettsii*.

A caracterização funcional das proteínas salivares recombinantes também revelou sua atividade anti-hemostática através da inibição da coagulação. Os ensaios realizados com as três recombinantes revelaram que todas foram eficientes em atrasar a coagulação do plasma sanguíneo, sendo a AsBasic Tail a mais eficaz dentre elas. Conseqüentemente, decidimos testar a capacidade inibitória sobre os fatores Xa e Trombina, componentes muito importantes na ativação da cascata e alvos de uma série de inibidores produzidos por artrópodes hematófagos (Francischetti et al. 2009, Koh & Kini 2009), além da tripsina. rAskunitz apresentou atividade antihemostática e o mecanismo de ação parece ser pela inibição da capacidade enzimática da trombina, já que ela foi a mais eficiente dentre as três recombinantes na inibição desse componente da cascata de coagulação e não apresentou inibição significativa contra o fXa. Outros inibidores de trombina com domínios do tipo kunitz já foram identificados e caracterizados previamente em outras espécies de carrapatos ixodídeos, como os inibidores intestinais de *R. microplus*, *Haemaphysalis longicornis*, e *I. scapularis*, Boophilina, Hemalina e Ixophilina, respectivamente (Macedo-Ribeiro et al. 2008, Liao et al. 2009, Narasimhan et al. 2013), além da Amblina, presente na hemolinfa de *A. hebraeum* (Lai et al. 2004). Até o momento, nenhuma proteína da família kunitz havia sido caracterizada como inibidor de

Trombina na saliva de ixodídeos, apesar de um potente inibidor desse componente da cascata da coagulação, a sculptina, classificada como uma *hirudin-like*, já ter sido identificada no conteúdo salivar de *A. sculptum* (Iqbal et al. 2017). Diferentemente dos inibidores citados previamente, que apresentam dois domínios kunitz, AsKunitz possui apenas um e é consideravelmente menor que os anteriores. Mesmo assim, a rAsKunitz apresentou uma eficiência em dobrar o tempo necessário para a recalcificação do plasma similar à da hemalina recombinante (0,25 μ M) (Liao et al. 2009) e compatível com a observada para a boophilina nativa (0,1 μ M) (Macedo-Ribeiro et al. 2008). Já o seu mecanismo de ação parece ser comparável com o da amblina, visto que ambas apresentam algumas características importantes em comum, como o caráter básico (amblina tem pI=9,7), diferente do observado em boophilina e hemalina (pI em torno de 4,5). Outro fator em comum é a presença de dois resíduos de cisteína na região carboxi-terminal, que podem ser responsáveis pela formação de mais uma ponte dissulfeto que, por sua vez, poderia interferir sobre as regiões ligantes do exosítio I da trombina. Por fim, rAsKunitz não apresentou capacidade de inibir significativamente a atividade proteolítica da tripsina, como também foi observado para a amblina (Corral-Rodríguez et al. 2009). De forma semelhante aos inibidores de trombina citados anteriormente, rAsKunitz não foi capaz de inibir o fXa. Entretanto, outros inibidores salivares de fXa da família kunitz já foram descritos: amblyomin-X, produzido na saliva de *A. sculptum*, apresenta dois domínios kunitz e é capaz de inibir o fXa, além do “extrinsic tenase complex” (Batista et al. 2010). Se trata de um inibidor não competitivo e seu mecanismo de inibição ocorre pela ligação a um exosítio do fXa. Foi revelado também que ele é um substrato para tripsina e plasmina (Branco et al. 2016). Um outro inibidor, o Ixolaris (Francischetti et al. 2002) de *I. scapularis*, também apresenta dois domínios kunitz-like e apresenta mecanismo de inibição semelhante ao da Amblyomin-X, apesar da diferença no número de cisteínas conservadas nos domínios. A TAP, presente na saliva de *O. moubata* (Waxman et al. 1990), possui apenas um domínio kunitz, tal como a rAskunitz e ainda assim é capaz de inibir o fXa. No entanto, seu mecanismo de ação parece estar ligado à presença de um tripeptídeo (Tyr-Asn-Arg) inexistente na rAskunitz, na região amino terminal, bloqueando o sitio ativo da enzima (Corral-Rodríguez et al. 2009).

A rAs8.9kDa, dentre as três recombinantes testadas foi a que obteve a menor eficiência no ensaio que avalia o tempo de recalcificação do plasma humano citratado. Apesar disso, ela foi capaz de inibir significativamente a capacidade enzimática do fXa, Trombina e Tripsina, mas não parece ser um inibidor específico para nenhuma das serino proteases em questão. Os valores de IC₅₀ observados nos ensaios na presença dessa recombinante foram consideravelmente mais altos que os da rAsBasicTail para a inibição de fXa e tripsina e que o

de rAsKunitz para trombina, sugerindo que seu papel primordial na hematofagia do *A. sculptum* provavelmente não está relacionado à inibição de fatores da cascata de coagulação.

AsBasicTail, como esperado, foi a recombinante com a maior eficácia na inibição da atividade catalítica do fXa, visto que alguns integrantes da família já foram previamente caracterizados com essa atividade (Das et al. 2001, Narasimhan et al. 2002, Ribeiro et al. 2006). Apesar de ser uma proteína consideravelmente maior que a Salp14 ou a Ixonnexin, apresenta características em comum, como a cauda rica em resíduos de lisina e a presença de três pontes dissulfeto, responsáveis por manter sua estrutura secundária. A estrutura similar à da Ixonnexin pode sugerir a presença de atividade fibrinolítica, o que requer novos estudos para comprovação. Apesar do mecanismo de ação não ter sido totalmente elucidado, a interação com o fXa pode estar relacionada com a presença da região carboxi-terminal básica, visto que a TSLPI e a salp9 recombinante, que não possuem essa estrutura, não foram capazes de apresentar atividade anticoagulante (Narasimhan et al. 2002, Schuijt et al. 2011b).

A presença simultânea de atividade anticoagulante e anticomplemento desempenhada pelas recombinantes de *A. sculptum* não parece ser incomum em inibidores de serino proteases produzidos por outros invertebrados. A *AamAV422*, por exemplo, é uma proteína salivar expressa por *A. americanum* capaz de atrasar o tempo de coagulação do plasma, além de interferir na ativação da via clássica do complemento (Mulenga et al. 2013). Adicionalmente, foi observado que a sua expressão gênica também é aumentada ao longo do repasto sanguíneo (Mulenga et al. 2007), de forma parecida com os alvos do nosso trabalho. A EnKT1, por sua vez, proteína do tipo kunitz expressa pelo verme parasito *Eudiplozoon nipponicum* possui atividade contra o fXa e a lise mediada por ativação do complemento (Jedličková et al. 2019). A explicação para a atuação dos inibidores de serino proteases sobre os dois sistemas pode estar relacionada ao fato de ambos estarem intrinsecamente relacionados. Sabe-se que componentes da cascata da coagulação como os fatores Xa e trombina, dentre outros, são capazes de atuar na clivagem dos fatores C3 e C5 do complemento, contribuindo para a sua ativação (Amara et al. 2010). Dessa forma, podemos inferir que as proteínas salivares abordadas nesse estudo podem estar relacionadas a variadas funções na interação parasito-hospedeiro, o que incita a realização de novos estudos de caracterização funcional.

Os ensaios vacinais realizados, demonstraram que os alvos salivares recombinantes rAsKunitz, r8.9kDa, rAsBasicTail e a proteína quimérica construída através de epitopos de alvos intestinais foram promissores como antígenos vacinais contra o *A. sculptum*. Esses resultados são muito importantes, visto que a descoberta de antígenos vacinais específicos para a espécie em questão representa um grande passo em direção ao desenvolvimento de uma

formulação vacinal eficiente no controle do seu parasitismo. Consideramos que a realização dos ensaios vacinais utilizando camundongos ao invés de equinos como hospedeiros não tenha exercido grande influência sobre os resultados observados, sobretudo pelos dados apresentados no estudo conduzido por Franco et al. (2016), em que compararam o perfil alimentar e a atividade anticomplemento do EGS de *A. sculptum* alimentados em camundongos e equinos: o peso médio das fêmeas ingurgitadas e o tempo total de repasto em camundongos foram semelhantes aos valores obtidos em hospedeiros equinos. Adicionalmente, eles concluíram que a o EGS obtidos de fêmeas alimentadas em camundongos e equinos tiveram ação anticomplemento similar. Portanto, esses dados indicam que os genes salivares do presente estudo deverão ser expressos nas glândulas dos carrapatos que se alimentarem nos mais diversos hospedeiros vertebrados.

Apesar dos vários estudos realizados sobre o desenvolvimento de vacinas ao longo das últimas décadas, sendo a maioria sobre o *R. microplus*, esse é o primeiro trabalho em que foi realizada a seleção e teste de alvos antigênicos específicos contra o *A. sculptum*. A escolha dos alvos, no entanto, foi feita com base em conceitos desenvolvidos em trabalhos anteriores: Proteínas salivares relacionadas ao processo alimentar, que teriam sua atividade bloqueada caso os carrapatos realizassem o repasto em hospedeiro imunizado; Antígenos ocultos, como aqueles presentes na membrana intestinal do carrapato, que levariam à ativação dos componentes do complemento contido no sangue ingerido, gerando lesões no epitélio intestinal. No fim, se espera que parâmetros alimentares e reprodutivos sejam afetados naqueles carrapatos que se alimentarem em hospedeiros imunizados, levando ao controle populacional dos parasitos no ambiente. Outro efeito desejável seria a proteção do hospedeiro contra patógenos (como as *Rickettsia* spp.) veiculadas pelo carrapato, através da redução da capacidade de transmissão, quando alimentado em hospedeiros vacinados (Nuttall et al. 2006, Rego et al. 2019).

Os ensaios vacinais que envolveram as proteínas salivares recombinantes revelaram que os alvos testados apresentaram eficácia satisfatória contra o *A. sculptum*, sobretudo rAs8.9kDa e rAsKunitz. Os resultados obtidos para esses dois alvos são superiores aos observados em outros estudos em que também foram utilizados antígenos salivares, porém contra o parasitismo de *R. microplus*: Maruyama et al. (2017) testaram uma vacina multicomponente que continha quatro proteínas salivares recombinantes (similaridade com *glycine-rich proteins*, inibidores de serino protease, metaloproteases e *IgG binding protein C*) e obtiveram 73,2% de eficácia. Ali et al. (2015) obtiveram 60% ao testarem uma metaloprotease salivar e Andreotti et al. (2012), por sua vez, observaram apenas 32%, ao utilizarem um inibidor de trombina da família kunitz.

No primeiro parâmetro avaliado, a mortalidade, obtivemos uma taxa quase duas vezes maior no grupo imunizado com a 8.9kDa, indicando que grande parte das fêmeas morreu durante o repasto ou antes de realizar a oviposição. No entanto, o efeito protetor foi bem maior contra as ninfas, já que observamos taxas de mortalidade mais altas para as formas imaturas. Esse efeito provavelmente ocorre devido ao bloqueio da atividade anticomplemento mediado pelos anticorpos dos camundongos imunizados. Dessa forma, os componentes ativos do complemento que chegarem ao ambiente intestinal seriam capazes de causar lesões letais ao artrópode. Não se sabe ao certo o motivo da taxa de mortalidade ter sido mais alta nas ninfas, mas a causa pode estar relacionada à expressão dos inibidores do complemento salivares nesse estágio evolutivo. Caso a diversidade de inibidores do complemento seja menor nas formas imaturas, os efeitos do bloqueio seriam mais expressivos que os observados em adultos. O fato do tempo médio necessário para a alimentação das fêmeas e o seu peso após o repasto não terem sido significativamente diferentes em relação ao controle indicam que as fêmeas conseguiram se alimentar satisfatoriamente mesmo que o bloqueio da atividade das proteínas alvo tenha sido realizado, provavelmente graças à presença de outros inibidores com atividades semelhantes expressos ao longo do processo alimentar, que não seriam afetados pelos anticorpos produzidos contra os alvos vacinais. Portanto, uma estratégia previamente utilizada em outros estudos e que poderia aperfeiçoar a eficácia da vacina, seria a utilização de múltiplos antígenos na formulação vacinal (Willadsen 2008), de forma que o bloqueio da atividade das moléculas salivares possa ser mais eficiente ao longo de todo o processo alimentar. Díaz-Martín et al. (2015) observaram que uma formulação vacinal multicomponente, que continha três proteínas salivares antihemostáticas de *O. moubata*, foi mais eficaz no controle do parasito que formulações preparadas a partir dos antígenos, individualmente. Adicionalmente, outra estratégia seria identificar a presença de possíveis epitopos localizados em regiões correspondentes aos sítios ativos das proteínas e testá-los como antígenos vacinais, na tentativa de aumentar o bloqueio de sua atividade enzimática e, conseqüentemente, a eficácia das vacinas. Manzano-Román et al. (2015) verificaram em testes vacinais que epitopos capazes de induzir a produção de anticorpos relativos a regiões responsáveis pela atividade biológica da subolesina foram substancialmente mais eficazes como antígenos que a proteína recombinante inteira.

De forma similar ao demonstrado por Andreotti et al. (2012) na vacinação contra *R. microplus* com um antígeno salivar, não houve diminuição significativa na oviposição das fêmeas ingurgitadas. Entretanto, observamos grande variação na taxa de eclosão dos ovos, em relação ao controle, indicando que a interferência das formulações vacinais testadas no presente

trabalho ocorre, sobretudo, sobre esse parâmetro. Uma possível explicação seria o impacto da alimentação em hospedeiros imunizados sobre a microbiota dos carrapatos. Nesse caso, o sangue ingerido, contendo fatores ativos do complemento, poderia ser capaz de causar uma perturbação na microbiota simbiote dos artrópodes, culminando na redução do *fitness* reprodutivo. Zhong et al. (2007) demonstraram que a oviposição e fertilidade dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *A. americanum* tratadas com antibióticos foram diminuídas significativamente. Machado-Ferreira et al. (2015) avaliaram as bactérias presentes nos ovos de *A. sculptum* e acreditam que essa microbiota pode atuar como uma defesa química e seria, portanto, benéfica para seu desenvolvimento no ambiente.

A vacinação com antígenos ocultos intestinais e com a proteína quimérica também demonstrou eficácia contra o parasitismo de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos. A imunização dos hospedeiros com o extrato de proteínas da membrana intestinal apresentou um resultado modesto de eficácia, revelando que antígenos localizados na membrana podem ser considerados como possíveis alvos no desenvolvimento da vacina. Outros estudos já demonstraram a eficácia do extrato intestinal na imunização de hospedeiros contra outras espécies, como o *I. ricinus*, *R. microplus*, *R. sanguineus* (Wong & Opdebeeck 1989, Jittapalpong et al. 2000, Knorr et al. 2018). Apesar de não ter sido estatisticamente significativa, observamos a diminuição no peso médio da massa de ovos e taxa de eclosão. Esse último parâmetro foi o que mais sofreu variação em relação ao controle, com uma diminuição de aproximadamente 50% no coeficiente de fertilidade dos ovos, indicando que os antígenos intestinais presentes no extrato induziram uma redução no *fitness* reprodutivo das fêmeas.

Os antígenos intestinais rAsMucin e rAsLAMP não foram eficazes quando utilizados individualmente como antígenos vacinais, enquanto o rAsAPP apresentou um valor baixo de eficácia. Uma das possíveis explicações teria relação com a estrutura das proteínas intestinais: A busca por possíveis regiões glicosiladas revelou que rAsMucin, rAsLAMP e rAsAPP provavelmente possuem várias regiões de N e O-glicosilação em sua forma nativa. No entanto, como os peptídeos recombinantes foram produzidos em sistema procarioto, podem não ter sofrido várias modificações pós-traducionais existentes na proteína nativa. Nesse caso, especulamos que os anticorpos gerados contra as recombinantes podem não ter reconhecido propriamente as proteínas nativas no ambiente intestinal, inviabilizando a ativação do complemento no local. De La Fuente et al. (2006) reforçou a importância da presença das glicosilações nas proteínas recombinantes utilizadas como antígenos vacinais, que podem levar ao aumento de sua eficácia como antígenos vacinais. Uma alternativa para que se possa tentar obter proteínas recombinantes com estruturas e modificações pós-traducionais mais fiéis às

nativas seria a utilização de um sistema de expressão eucarioto. A *Pichia pastoris* pode ser uma boa opção, já que foi amplamente utilizada na expressão de antígenos utilizados na preparação de vacinas de uso comercial contra carrapatos (revisado por Canales et al. (2010)). Outra possível causa para o baixo desempenho pode estar relacionada com os níveis de expressão dos alvos durante o processo alimentar. Caso as proteínas de membrana não fossem secretadas em grande quantidade no momento em que o sangue com os anticorpos chegou ao lúmen intestinal, os danos ao epitélio não teriam sido suficientemente significativos para que observássemos os efeitos da imunização. Dessa forma, se faz necessária uma extensa avaliação mialômica, ao longo das fases do processo alimentar de fêmeas e formas imaturas, para a escolha de alvos vacinais antigênicos que estejam expostos na fase de ingurgitamento.

A proteína recombinante quimérica obteve uma boa eficácia nos ensaios vacinais. Na análise dos diferentes parâmetros avaliados em fêmeas alimentadas em camundongos imunizados, observamos que o maior efeito ocorreu sobre a fertilidade dos ovos, de forma parecida com os dados obtidos na vacinação com a recombinantes salivares. Outras proteínas quiméricas já foram produzidas e testadas como antígenos vacinais contra carrapatos: Peconick et al. (2008a) desenvolveram uma proteína quimérica montada a partir de epitopos antigênicos da Bm86 conservados em populações de carrapatos de diferentes regiões do Brasil e da América do Sul; Canales et al. (2009) desenvolveram uma proteína quimérica contendo peptídeos antigênicos da BM95 de *R. microplus* e a região N-terminal da MSP1a de *Anaplasma marginale*, obtendo 65,5% de eficácia contra a infestação de *R. microplus* em coelhos, resultado superior ao obtido com a Gavac no mesmo ensaio; A proteína quimérica Q38, montada a partir de epitopos antigênicos da Subolesina/Akirina se mostrou eficaz no controle de *I. ricinus* e *Dermacentor reticulatus* (Prudencio et al. 2010, Contreras & de la Fuente 2016). Entretanto, a proteína desenvolvida por nós se difere por apresentar epitopos de sete proteínas intestinais diferentes. Dessa forma, se espera que o hospedeiro imunizado produza anticorpos contra grande parte delas, repercutindo no aumento do reconhecimento de antígenos no ambiente intestinal do carrapato. Apesar do resultado satisfatório, ainda não sabemos ao certo quais são os epitopos que mais contribuíram para o nível de eficácia obtido. Portanto, acreditamos que a quimera pode ser aprimorada através da análise dos anticorpos produzidos em animais imunizados com o antígeno em questão, o que nos permitiria identificar quais são os epitopos que apresentam maior imunogenicidade.

A utilização das proteínas recombinantes salivares e intestinais, além da quimera, em ensaios vacinais revelou que várias delas podem ser consideradas alvos promissores na produção de uma futura formulação vacinal a ser utilizada contra o carrapato estrela. Os

resultados evidenciaram o efeito das vacinas sobre diversos parâmetros alimentares e reprodutivos do carrapato, sobretudo na viabilidade dos ovos gerados pelas fêmeas e na mortalidade das ninfas. Os dados obtidos são encorajadores para que novos testes sejam realizados com os antígenos, principalmente para avaliação de sua eficácia em diferentes espécies de hospedeiros e também para que se possa verificar uma possível interferência sobre a transmissão da *R. rickettsii* pelos vetores. Adicionalmente, testes com formulações compostas por combinações antigênicas diferentes, poderiam ser realizados a fim de obter níveis de eficácia ainda maiores nos ensaios vacinais, o que seria mais um passo em busca de uma vacina comercial contra o *A. sculptum*.

7. CONCLUSÕES

AsKunitz, As8.9kDa e AsBasicTail são expressos nas glândulas salivares de *A. sculptum* durante os estágios evolutivos de larva, ninfa e adultos, além de apresentarem regulação gênica positiva durante o processo hematofágico. As proteínas referentes às três sequências, produzidas de forma recombinante, são capazes de inibir o sistema do complemento e a cascata de coagulação, evidenciando a sua importância para o sucesso no processo alimentar do artrópode. Adicionalmente as proteínas recombinantes salivares, juntamente com a recombinante quimérica construída a partir de epitopos para células B de proteínas da membrana intestinal apresentaram níveis de eficácia de até 92,89% contra o parasitismo causado por *A. sculptum* em camundongos, se revelando como alvos promissores para o desenvolvimento de uma formulação vacinal a ser utilizada no controle do carrapato.

8. REFERÊNCIAS

- Adams RLC, Bird RJ 2009. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 14: 462–470.
- Alarcon-Chaidez FJ, Sun J, Wikel SK 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 48–71.
- Ali A, Fernando Parizi L, Garcia Guizzo M, Tirloni L, Seixas A, Silva Vaz I da, Termignoni C 2015. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. *Vet. Parasitol.* 207: 107–114.
- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, la Fuente J de 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res* 106: 471–479.
- Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Brückner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M 2010. Molecular Intercommunication between the Complement and Coagulation Systems. *J. Immunol.* 185: 5628–5636.
- Anderson JM, Sonenshine DE, Valenzuela JG 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9: 552.
- Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leivas Leite FP, Pérez de León AA 2012. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 30: 6678–6685.
- Assumpção TC, Mizurini DM, Ma D, Monteiro RQ, Ahlstedt S, Reyes M, Kotsyfakis M, Mather TN, Andersen JF, Lukszo J, Ribeiro JMC, Francischetti IMB 2018. Ixonnexin from Tick Saliva Promotes Fibrinolysis by Interacting with Plasminogen and Tissue-Type Plasminogen Activator, and Prevents Arterial Thrombosis. *Sci. Rep.* 8:4806.
- Barros VC, Assumpcao JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araujo RN, Pereira MH, Gontijo NF 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4: e6047.
- Batista IF, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Barros-Batesti DM, Labruna MB, Leao LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo IL 2008. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* 51: 823–834.

- Batista IF, Ramos OH, Ventura JS, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM 2010. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys* 493: 151–156.
- Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone AA, Caceres AG, Guzman-Cornejo CM, Leon R, Durden LA, Faccini JL 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 13: 267.
- Benelli G, Pavela R, Canale A, Mehlhorn H 2016. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? *Parasitol. Res.* 115: 2545–2560.
- Bitencourth K, Amorim M, Oliveira S V. de, Caetano RL, Voloch CM, Gazêta GS 2017. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. *Med. Vet. Entomol.* 31: 427–437.
- Black WC, Kondratieff BC 2005. Evolution of arthropod disease vectors. In: Marquardt WC (Ed.), *Biol. Dis. vectors*, Elsevier Academic Press, p. 785.
- Borges LMF, Oliveira PR, Lisboa CLM, Ribeiro MFB 2002. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 104: 265–273.
- Bouchard KR, Wikel SK 2005. Care, Maintenance, and Experimental Infestation of Ticks in the Laboratory Setting. In: Marquardt WC (Ed.), *Biol. Dis. Vectors*, Elsevier, San Diego, pp. 705–712.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Branco VG, Iqbal A, Alvarez-Flores MP, Sciani JM, Andrade SA de, Iwai LK, Serrano SMT, Chudzinski-Tavassi AM 2016. Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1864: 1428–1435.
- Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, Falcón V, Rodríguez M, la Fuente J De 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac(TM) against cattle tick. *Vaccine* 15: 414–422.
- Canales M, Labruna MB, Soares JF, Prudencio CR, la Fuente J de 2009. Protective efficacy of bacterial membranes containing surface-exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. *Vaccine* 27: 7244–7248.
- Canales M, Moreno-Cid JA, Almazán C, Villar M, la Fuente J de 2010. Bioprocess design and economics of recombinant BM86/BM95 antigen production for anti-tick vaccines.

- Biochem. Eng. J.* 52: 79–90.
- Cançado PHD, Catto JB, Soares CO, Miranda P de AB, Souza TF de, Piranda EM 2012. Controle parasitário de bovinos de corte em sistemas de integração. In: *Sist. Integr. lavoura-pecuária-floresta a produção sustentável*, Brasília, pp. 177–187.
- Castro JJ De 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71: 77–97.
- Champagne DE 2004. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4: 375–396.
- Chen CB, Wallis R 2004. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem.* 279: 58–65.
- Chmelař J, Kotál J, Kovaříková A, Kotsyfakis M 2019. The Use of Tick Salivary Proteins as Novel Therapeutics. *Front. Physiol.* 10.
- Contreras M, la Fuente J de 2016. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine* 34: 3010–3013.
- Corral-Rodríguez MÁ, Macedo-Ribeiro S, Barbosa Pereira PJ, Fuentes-Prior P 2009. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 579–595.
- Costa FB, Gerardi M, Binder L de C, Benatti HR, Serpa MC de A, Lopes B, Luz HR, Ferraz KMPMB, Labruna MB 2019. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil. *J. Med. Entomol.* 20: 1–4.
- Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin JP, Chiappino I, Gillet L, Fays K de, Decrem Y, Lebouille G, Godfroid E, Bollen A, Pastoret PP, Gern L, Sharp PM, Vanderplasschen A 2007. *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol* 16: 155–166.
- Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor FS, Fikrig E 2001. Salp25D, an *Ixodes scapularis* Antioxidant, Is 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands. *J. Infect. Dis.* 184: 1056–1064.
- Díaz-Martín V, Manzano-Román R, Oleaga A, Pérez-Sánchez R 2015. New salivary anti-haemostatics containing protective epitopes from *Ornithodoros moubata* ticks: Assessment of their individual and combined vaccine efficacy. *Vet. Parasitol.* 212: 336–349.
- Dunkelberger JR, Song W 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune

- responses. *Cell Res.* 20: 34–50.
- Esteves E, Maruyama SR, Kawahara R, Fujita A, Martins LA, Righi AA, Costa FB, Palmisano G, Labruna MB, Sá-Nunes A, Ribeiro JMC, Fogaça AC 2017. Analysis of the Salivary Gland Transcriptome of Unfed and Partially Fed *Amblyomma sculptum* Ticks and Descriptive Proteome of the Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Estrada-Peña A, Tarragona EL, Vesco U, Meneghi D De, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone A a, Nava S 2014. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *Int. J. Parasitol.* 44: 1081–1089.
- Fankhauser N, Mäser P 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics* 21: 1846–1852.
- Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V 2015. Von willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood* 125: 1034–1037.
- Ferreira VP, Fazito Vale V, Pangburn MK, Abdeladhim M, Ferreira Mendes-Sousa A, Coutinho-Abreu I V., Rasouli M, Brandt EA, Meneses C, Lima KF, Nascimento Araújo R, Horácio Pereira M, Kotsyfakis M, Oliveira F, Kamhawi S, Ribeiro JMC, Gontijo NF, Collin N, Valenzuela JG 2016. SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Sci. Rep.* 6: 19300.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M 2014. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42: D222–D230.
- Francischetti IMB, Pham VM, Mans BJ, Andersen JF, Mather TN, Lane RS, Ribeiro JMC 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1142–1161.
- Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci. (Landmark Ed.* 14: 2051–2088.
- Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: Identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99: 3602–3612.
- Franco PF, Silva NCS, Fazito do Vale V, Abreu JF, Santos VC, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, Sant’Anna MRV, Gomes APS, Araujo RN 2016. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 164: 91–96.

- Furie B 2009. Pathogenesis of thrombosis. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*: 255–258.
- Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J 2011. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *J. Insect Physiol.* 57: 339–343.
- Garcia-Garcia JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodriguez M, Joglar M, Machado H, Gonzalez IL, Valdes M, Mendez L, la Fuente J de 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18: 2275–2287.
- Garcia GR, Gardinassi LG, Ribeiro JM, Anatriello E, Ferreira BR, Moreira HNS, Mafra C, Martins MM, Szabó MPJ, Miranda-Santos IKF de, Maruyama SR 2014. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasit. Vectors* 7: 430.
- George JE 2000. Present and Future Technologies for Tick Control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916: 583–588.
- Guerrero FD, Miller RJ, Perez de Leon AA 2012. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int J Parasitol* 42: 421–427.
- Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MPJ, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña A 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. Appl. Acarol.* 40: 83–100.
- Gupta R, Jung E, Brunak S 2004. NetNGlyc: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.
- Heijden KM Van Der, Szabó MPJ, Egami MI, Pereira MC, Matushima ER 2005. Histopathology of tick-bite lesions in naturally infested capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.*
- Ibelli AMG, Kim TK, Hill CC, Lewis LA, Bakshi M, Miller S, Porter L, Mulenga A 2014. A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int. J. Parasitol.* 44: 369–379.
- Iqbal A, Goldfeder MB, Marques-Porto R, Asif H, Souza JG De, Faria F, Chudzinski-Tavassi AM 2017. Revisiting antithrombotic therapeutics; Sculptin, a novel specific, competitive, reversible, scissile and tight binding inhibitor of thrombin. *Sci. Rep.* 7.
- Jedličková L, Dvořák J, Hrachovinová I, Ulrychová L, Kašný M, Mikeš L 2019. A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement in vitro. *Int. J. Parasitol.* 49: 337–346.

- Jittapalapong S, Stich RW, Gordon JC, Wittum TE, Barriga OO 2000. Performance of Female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Fed on Dogs Exposed to Multiple Infestations or Immunization with Tick Salivary Gland or Midgut Tissues. *J. Med. Entomol.* 37: 601–611.
- Jongejan F, Uilenberg G 1994. Ticks and control methods. *Rev. Sci. Tech. l'OIE* 13: 1201–1226.
- Jore MM, Johnson S, Sheppard D, Barber NM, Li YI, Nunn MA, Elmlund H, Lea SM 2016. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23: 378–386.
- Karim S, Ribeiro JMC 2015. An insight into the sialome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, with a glimpse on its time dependent gene expression. *PLoS One* 10: e0131292.
- Karim S, Singh P, Ribeiro JMC 2011. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* 6.
- Kemp DH, Pearson RD, Gough JM, Willadsen P 1989. Vaccination against *Boophilus microplus*: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.* 7: 43–58.
- Kim TK, Radulovic Z, Mulenga A 2016. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7: 405–414.
- Knorr S, Anguita J, Cortazar JT, Hajdusek O, Kopáček P, Trentelman JJ, Kershaw O, Hovius JW, Nijhof AM 2018. Preliminary Evaluation of Tick Protein Extracts and Recombinant Ferritin 2 as Anti-tick Vaccines Targeting *Ixodes ricinus* in Cattle. *Front. Physiol.* 9: 1696.
- Kocan KM, Blouin E, la Fuente J de 2011. RNA Interference in Ticks. *J. Vis. Exp.* 47.
- Koh CY, Kini RM 2009. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thromb. Haemost.* 102: 437–453.
- Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, Andersen JF, Francischetti IMB, Chavakis T, Kopecký J, Pedra JHF, Kotsyfakis M, Chmelař J 2015. Modulation of host immunity by tick saliva. *J. Proteomics* 128: 58–68.
- Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282: 29256–29263.
- Kotsyfakis M, Kopáček P, Franta Z, Pedra JHF, Ribeiro JMC 2015a. Deep Sequencing Analysis of the *Ixodes ricinus* Haemocytome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003909.
- Kotsyfakis M, Schwarz A, Erhart J, Ribeiro JMC 2015b. Tissue- and time-dependent

- transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Sci. Rep.* 5: 9103.
- la Fuente J de, Almazan C, Canales M, Perez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Heal. Res Rev* 8: 23–28.
- La Fuente J De, Canales M, Kocan KM 2006. The importance of protein glycosylation in development of novel tick vaccine strategies. *Parasite Immunol.* 28: 687–688.
- La Fuente J De, Contreras M 2015. Tick vaccines: Current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14: 1367–1376.
- la Fuente J de, Manzano-Roman R, Naranjo V, Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Canales M, Almazán C, Galindo RC, Step DL, Villar M 2010. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 28: 1786–1795.
- Labruna MB 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166: 156–166.
- Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, Waal DT De, Gennari SM 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*
- Lai R, Takeuchi H, Jonczy J, Rees HH, Turner PC 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene* 342: 243–249.
- Liao M, Zhou J, Gong H, Boldbaatar D, Shirafuji R, Battur B, Nishikawa Y, Fujisaki K 2009. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.* 55: 165–174.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lopes RB, Alves SB, Padulla LFL, Pérez CA 2007. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16: 27–31.
- Lopes CM, Leite RC, Labruna MB, Oliveira PR de, Borges LM, Rodrigues ZB, Carvalho HA de, Freitas CM de, Vieira Junior CR 1998. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 347–351.
- Lopes CM, Oliveira PR, Haddad JP, Domingues LN, Pinheiro RR, Borges LM, Labruna MB, Leite RC 2008. Biological parameters of ticks (*Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787)

- under field and laboratory conditions in Pedro Leopoldo, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 17 Suppl 1: 14–17.
- Macedo-Ribeiro S, Almeida C, Calisto BM, Friedrich T, Mentele R, Stürzebecher J, Fuentes-Prior P, Pereira PJB 2008. Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* 3: e1624.
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS, Soares CAG 2015. Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genet. Mol. Biol.* 38: 477–483.
- Mans BJ, Neitz AWH 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1–17.
- Manzano-Román R, Díaz-Martín V, Oleaga A, Pérez-Sánchez R 2015. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine* 33: 1046–1055.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucl. Acids Res.* 33: D192–D196.
- Martins TF 2014. Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil.
- Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, Terassini FA, Camargo LMA, Peterka CRL, C Pacheco R De, Dias RA, Nunes PH, Marcili A, Scofield A, Campos AK, Horta MC, Guilloux AGA, Benatti HR, Ramirez DG, Barros-Battesti DM, Labruna MB 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors* 9.
- Martins LA, Galletti MFB de M, Ribeiro JM, Fujita A, Costa FB, Labruna MB, Daffre S, Fogaça AC 2017. The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Brandão LG, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Horackova J, Veríssimo CJ, Katiki LM, Banin TM, Zangirolamo AF, Gardinassi LG, Ferreira BR, Miranda-Santos IKF De 2017. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasites and Vectors* 10.
- Merino O, Alberdi P, Perez de la Lastra JM, la Fuente J de 2013. Tick vaccines and the control

- of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 30.
- Monteiro CM de O, Matos R da S, Araújo LX, Perinotto WM de S, Bittencourt VREP, Dolinski C, Prata MC de A 2014. First report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* on partially engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Biol. Control* 69: 78–81.
- Moreira HNS, Barcelos RM, Vidigal PMP, Klein RC, Montandon CE, Maciel TEF, Carrizo JFA, Costa de Lima PH, Soares AC, Martins MM, Mafra C 2017. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. *Parasitol. Int.* 66: 64–73.
- Moura-Martinião NO, Machado-Ferreira E, Gazêta GS, Soares CAG 2017. Relative transcription of autophagy-related genes in *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus microplus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 73: 401–428.
- Mulenga A, Blandon M, Khumthong R 2007. The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. *Exp. Appl. Acarol.* 41: 267–287.
- Mulenga A, Kim T, Ibelli AMG 2013. *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect Mol. Biol.* 22: 306–319.
- Mulenga A, Sugino M, Nakajima M, Sugimoto C, Onuma M 2001. Tick-Encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 1063–1069.
- Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, Cappello M, Fikrig E 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* 11: 641–650.
- Narasimhan S, Perez O, Mootien S, DePonte K, Koski RA, Fikrig E, Ledizet M 2013. Characterization of Ixophilin, A Thrombin Inhibitor from the Gut of *Ixodes scapularis*. *PLoS One.*
- Nascimento DAG, Vieira RF da C, Vieira TSWJ, Toledo R dos S, Tamekuni K, Santos NJR dos, Gonçalves DD, Vieira ML, Biondo AW, Vidotto O 2016. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 25.
- Nava S, Beati L, Labruna MB, Caceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* 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*, and *Amblyomma sculptum*. *Ticks Tick Borne Dis.*

- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci.* 14: 2857–2877.
- Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RW de A 2016. *Parasitologia Humana*. Atheneu.
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28: 155–163.
- Oliveira PR, Borges LMF, Leite RC, Freitas CMV 2003. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Med. Vet. Entomol.*
- Oliveira SV de, Guimarães JN, Reckziegel GC, Neves BM da C, Araújo-Vilges KM de, Fonseca LX, Pinna FV, Pereira SVC, Caldas EP de, Gazeta GS, Gurgel-Gonçalves R 2016. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22.
- Paim RMM 2010. Avaliação funcional de anticoagulantes intestinais durante o processo alimentar dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae).
- Pajuaba Neto AA, Ramos V do N, Martins MM, Osava CF, Pascoal J de O, Suzin A, Yokosawa J, Szabó MPJ 2018. Influence of microhabitat use and behavior of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma dubitatum* nymphs (Acari: Ixodidae) on human risk for tick exposure, with notes on Rickettsia infection. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9: 67–71.
- Parizi LF, Ali A, Tirloni L, Oldiges DP, Sabadin GA, Coutinho ML, Seixas A, Logullo C, Termignoni C, Silva Vaz I da 2018. Peptidase inhibitors in tick physiology. *Med. Vet. Entomol.* 32: 129–144.
- Parizi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Ida Jr. S 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 1–7.
- Parizi LF, Reck Jr. J, Oldiges DP, Guizzo MG, Seixas A, Logullo C, Oliveira PL de, Termignoni C, Martins JR, Vaz Ida Jr. S 2012. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine* 30: 6912–6917.
- Patarroyo JH, Portela RW, Castro RO De, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Mendes MA 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 88: 163–172.
- Peconick AP, Sossai S, Girão FA, Rodrigues MQRB, Souza e Silva CH, Guzman Q F, Patarroyo V AM, Vargas MI, Patarroyo JH 2008a. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic

- determinants in different strains from South America. *Exp. Parasitol.* 119: 37–43.
- Peconick AP, Sossai S, Medeiros CL, Carvalho GD, Vargas MI, Patarroyo JH 2008b. [Molecular analysis of the antigenic sequence (SBm7462®) from Bm86 of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and similarity with *Rhipicephalus sanguineus* and *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Brazil J Vet Parasitol* 17: 18–23.
- Perner J, Kropáčková S, Kopáček P, Ribeiro JMC 2018. Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12: e0006410.
- Petersen TN, Brunak S, Heijne G von, Nielsen H 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8: 785–786.
- Polo G, Mera Acosta C, Labruna MB, Ferreira F 2017. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11.
- Prudencio CR, Pérez de la Lastra JM, Canales M, Villar M, la Fuente J de 2010. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 28: 5398–5406.
- Queirogas VL, Claro K Del, Nascimento ART, Szabó MPJ 2012. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: Ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. *Exp. Appl. Acarol.* 57: 75–82.
- Ramos V do N, Osava CF, Piovezan U, Szabó MPJ 2017. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8: 506–510.
- Rego ROM, Trentelman JJA, Anguita J, Nijhof AM, Sprong H, Klempa B, Hajdusek O, Tomás-Cortázar J, Azagi T, Strnad M, Knorr S, Sima R, Jalovecka M, Fumačová Havlíková S, Ličková M, Sláviková M, Kopacek P, Grubhoffer L, Hovius JW 2019. Counterattacking the tick bite: Towards a rational design of anti-tick vaccines targeting pathogen transmission. *Parasites and Vectors* 12.
- Ribeiro JMC, Alarcon-Chaidez F, Ivo IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK 2006. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 111–129.
- Ribeiro JMC, Slovák M, Francischetti IMB 2017. An insight into the sialome of *Hyalomma excavatum*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8: 201–207.
- Roberts JA 1968. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J Parasitol* 54: 667–673.
- Rodríguez-Valle M, Guerrero FD 2018. Anti-tick vaccines in the omics era. *Front Biosci (Elite*

Ed) 10: 122–136.

- Rodríguez-Valle M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Lorenzo Luaces L, Rubiera R, Cordovés C, Sánchez PA, Ramos E, Soto A, Canales M, Palenzuela D, Triguero A, Leonart R, Herrera L, la Fuente J de 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57: 339–349.
- Rodríguez-Valle M, Taoufik A, Valdés M, Montero C, Ibrahim H, Hassan SM, Jongejan F, la Fuente J de 2012. Efficacy of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. *Vaccine* 30: 3453–3458.
- Rojas R, Marini MA, Coutinho MTZ 1999. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 315–322.
- Rossignol PA, Ribeiro JM, Jungery M, Turell MJ, Spielman A, Bailey CL 1985. Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: evidence for vector-parasite mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7725–7727.
- Rozen S, Skaletsky H 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols. Bioinforma. methods Protoc.* 132: 365–386.
- Saha S, Raghava GPS 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 65: 40–48.
- Santos IKFDM, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Castro M De, Costa JN, Costa AM, Silva ER Da, Rego Neto OB, Rocha C, Daffre S, Ferreira BR, Silva JS Da, Szabó MP, Bechara GH 2004. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: The transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026: 242–246.
- Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A 2009. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol* 33: 5–13.
- Schuijt TJ, Coumou J, Narasimhan S, Dai J, Deponte K, Wouters D, Brouwer M, Oei A, Roelofs JJTH, Dam AP Van, Poll T Van Der, Van't Veer C, Hovius JW, Fikrig E 2011a. A tick mannose-binding lectin inhibits the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe* 10: 136–146.
- Schuijt TJ, Narasimhan S, Daffre S, DePonte K, Hovius JWR, van't Veer C, Poll T van der, Bakhtiari K, Meijers JCM, Boder ET, Dam AP van, Fikrig E 2011b. Identification and characterization of *Ixodes scapularis* antigens that elicit tick immunity using yeast surface display. *PLoS One* 6: e15926.

- Sebastian PS, Tarragona EL, Bottero MNS, Mangold AJ, Mackenstedt U, Nava S 2017. Bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.* 71: 87–96.
- Sievers F, Higgins DG 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 27: 135–145.
- Silva NCS, Vale VF, Franco PF, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, Sant'Anna MR V., Rodrigues DS, Lima WS, Fux B, Araujo RN 2016. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasit. Vectors* 9.
- Sim RB, Dodds AW 1997. The complement system: an introduction. In: Dodds R. B. AW & S (Ed.), *Complement a Pract. approach*, University Press, Oxford, pp. 1–18.
- Sim RB, Laich A 2000. Serine proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 545–550.
- Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI 2017. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 281.
- Soares CAG, Lima CMR, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol. Biol.* 14: 443–452.
- Soares JF, Soares HS, Barbieri AM, Labruna MB 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Med Vet Entomol* 26: 139–151.
- Sonenshine DE 1991. The mouthparts and foregut: Capitulum. Pharynx and Esophagus. In: Sonenshine DE (Ed.), *Biol. Ticks*, Oxford University Press, New York, pp. 119–140.
- Sonnhammer ELL, Heijne G von, Krogh A 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings* 6: 175–182.
- Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SS, Borba RC, Labruna MB 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol* 161: 116–121.
- Stentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Paul Bennett E, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32: 1478–1488.
- Stephens ZD, Lee SY, Faghri F, Campbell RH, Zhai C, Efron MJ, Iyer R, Schatz MC, Sinha S,

- Robinson GE 2015. Big data: Astronomical or genomics? *PLoS Biol.* 13: e1002195.
- Szabó MPJ, Martins MM, Castro MB de, Pacheco RC, Tolesano-Pascoli GV, Santos KT dos, Martins TF, Souza LGA de, May-Junior JA, Yokosawa J, Labruna MB 2018. Ticks (Acari: Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas Gerais, Brazil: species, abundance, ecological and seasonal aspects with notes on rickettsial infection. *Exp. Appl. Acarol.*
- Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Taeye SW de, Kreuk L, Dam AP van, Hovius JW, Schuijt TJ 2013. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: It takes three to tango. *Trends Parasitol.* 29: 119–128.
- Tyson K, Elkins C, Patterson H, Fikrig E, Silva A de 2007. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol Biol* 16: 469–479.
- Tyson KR, Elkins C, Silva AM de 2008. A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *J Immunol* 180: 3964–3968.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM 2000. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 275: 18717–18723.
- Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol* 205: 2843–2864.
- Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH 2013. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol. Rev.* 93: 327–358.
- Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP 1990. Tick Anticoagulant Peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science (80-)*. 248: 593–596.
- Wikel SK, Allen JR 1977. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology* 32: 457–465.
- Willadsen P 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129 Suppl: S367-87.
- Willadsen P 2008. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.* 24: 164–167.
- Willadsen P, Riding GA, McKenna R V, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 143: 1346–1351.
- Wong JY, Opdebeeck JP 1989. Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology* 66: 149–155.

- Xu XL, Cheng TY, Yang H, Liao ZH 2016. De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 38: 62–72.
- Zhong J, Jasinskas A, Barbour AG 2007. Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLoS One* 2: e405.

ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 103/2017

Título do projeto: Identificação de moléculas imunogênicas expressas na glândula salivar e intestino do carrapato *Amblyomma sculptum* e avaliação de seu potencial como antígenos vacinais

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Ricardo Nascimento Araujo

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022
Belo Horizonte, 27/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

AsKunitz (sequenciamento) x GBBK01000794.1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
AsKunitz	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
GBBK01000794.1	ATGAAGACGCCAACCTGCTTTCTATGCGCCCTACTATGTCTCATGGTAGTATTAGTGCAAGGG						TATAACGGCCCAATT		
Consensus						TATAACGGCCCAATT		
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
AsKunitz	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
GBBK01000794.1	TTGCTATGCARAAGCGAAGGAGGGACAATGCGGGCACGACGGCCTTCATCGAAGATGGTACTTTGATGCGAGATACG								
Consensus	TTGCTATGCARAAGCGAAGGAGGGACAATGCGGGCACGACGGCCTTCATCGAAGATGGTACTTTGATGCGAGATACG								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
AsKunitz	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
GBBK01000794.1	GGTACTGCGGTCCCTTCTGTGGGGCGGATGTGGCGGAATAATAACAACCTTTCCCACTGTACACTCTGCATGACTGTT								
Consensus	GGTACTGCGGTCCCTTCTGTGGGGCGGATGTGGCGGAATAATAACAACCTTTCCCACTGTACACTCTGCATGACTGTT								
	241	250	260	270	280	290	297		
AsKunitz	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
GBBK01000794.1	TGTTCCGATCACCGGATCCCGAAGGCGCTGCCGCAATATTCTCAACGCCCCATGA								
Consensus	TGTTCCGATCACCGGATCCCGAAGGCGCTGCCGCAATATTCTCAACGCCCCATGA								

rAsKunitz x GBBK01000794.1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
rAsKunitz	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
GBBK01000794.1	MGHHHHHNL		YFQGHMAS		YKRPKFCYAKAKEGQCGHERPSIERHYFDARYGYCGPFL		LGGCGGNNNFPNCTLC		HTVCS
Consensus		YKRPKFCYAKAKEGQCGHERPSIERHYFDARYGYCGPFL		LGGCGGNNNFPNCTLC		HTVCS
	81	90	96						
rAsKunitz	-----+-----								
GBBK01000794.1	DHS			DPEGACRNILNAP					
Consensus	DHS			DPEGACRNILNAP					

AsBasicTail (sequenciamento) x GBBK01000509.1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1							TATGATATTGCCGTGGTTGCCCTCC			
Consensus	ATGGTCCTTCTCCTGTTCTGAGCATCTTCTGCTTAATGAGGTGCACGGAGAT						TATGATATTGCCGTGGTTGCCCTCC			
	81	90	100	110	120	130	140	150	160	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	CAAGGATGCGCAGGGCAGTGTCTGTTGAGATTGCARTTATTACTGCAACCACACTCACGAAGTTATTACGTAACGGAA									
Consensus	CAAGGATGCGCAGGGCAATGTCTGTTGAGATTGCARTTATTACTGCAACCACACTCACGAAGTTATTACGTAACGGAA									
	161	170	180	190	200	210	220	230	240	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	CAAGATGCAGATTACACACATTCAGGTGTGACAGAGGGCGTCTGTATTGACCTACTTGGAATGGAGGGATGCCACCCT									
Consensus	CAAGATGCAGATTACACACATTCAGGTGTGACAGAGGGCGTCTGTATTGACCTACTTGGAATGGAGGGATGCCACCCT									
	241	250	260	270	280	290	300	310	320	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	CCAARTGATACTTTTGCAGGGAGGTTTCATGAATTTTGGGCGAAGGATAACACCACCCTACCACCGGCACCCAGGAAC									
Consensus	CCAARTGATACTTTTGCAGGGAGGTTTCATGAATTTTGGGCGAAGGATAACACCACCCTACCACCGGCACCCAGGAAC									
	321	330	340	350	360	370	380	390	400	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	AAAACCTACTACCGTCGCCACTACCACCCTACGCAAGCTCTACAACGACCAARTCTAAAGCACGAAGAGCCAAAGA									
Consensus	AAAACCTACTACCGTCGCCACTACCACCCTACGCAAGCTCTACAACGACCAARTCTAAAGCACGAAGAGCCAAAGA									
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	
AsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	AGACAAAGAGACAAAGAGACCAAGACAAGAGACCAAGAGCGTCCAAAAAAACAGACCAGACGTCACCAAGCCT									
Consensus	AGACAAAGAGACAAAGAGACCAAGACAAGAGACCAAGAGCGTCCAAAAAAACAGACCAGACGTCACCAAGCCT									
	481	490	500	510	517					
rAsBasicTail	----- ----- ----- ----- -----									
GBBK01000509.1	ACCACGGAGTTTTCATGG					ACCACGGAGTTTTCATGGTAAATCCTGGGCGAATAA				
Consensus	ACCACGGAGTTTTCATGG								

rAsBasicTail x GBBK01000509.1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
rAsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
GBBK01000509.1	MGHHHHHHENLYFQGHMASYDIVRGCPPKDAQGSVYEDCNYYCNHTHEGYVNGTRCKITHIPGVTEGVCIDLLGMEGCH								
ConsensusdYDIVRGCPPKDAQGnVYEDCNYYCNHTHEGYVNGTRCKITHIPGVTEGVCIDLLGMEGCH								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
rAsBasicTail	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----								
GBBK01000509.1	PPNDFARRFMKFWKDNTPPTTGTQETKPTTVATTTTQSSTTTKSKSTKKPKKTKKTRPKTKRPKTSKKNKTSTSK								
Consensus	PPNDFARRFMKFWaKDNTPPTTGTQETKPTTVATTTTQSSTTTKSKSTKKPKKTKKTRPKTKRPKTSKKnrrprppk								
	161	177							
rAsBasicTail	----- -----								
GBBK01000509.1	PTTEFSW		LPRSFHGKILGE						
Consensus	lpreFhg							

ANEXO III

Proteína Transmembrana

MGALGISTIAPWVFPLLLWAVHRASCMTIGETAPPSAAVGQHGGALGRPSL
DSAPLLLEVVEVVTGSYDADQRQPPEMMVTNTTTLTLPPGPAKSVNPF
LLVALVVSALLVLLLGFAVTRKTDPGDPEDAPRQPRDGSAASRHNGAFE
QDTEGGTDGSGYPSLPPSYEDVIKVPWTIWAATQOGAFTQGTGATPPPSYE
DARRTFPFPE

CDS proteína Transmembrana

ATGGGTGCACTAGGCATCTCTACAATTGCTCCCTGGGTGTTTCCCCTTCTCCT
GTGGGCTGTGCATCGGGCGTCGTGCATGACCATAGGCGAGACGGCGCC
ACCGTCTGCCGCGGTGGGCCAACATGGCGGGCGCCCTAGGACGGCC
TTCACTGGACTCGGCGCCCCTGCTGCTGGAAGTGGTGGAGGTCGT
GACGGGTTCTTACGACGCCGATCAGCGCCAGCCGCCAGAGATGAT
GGTGACCAATACGACCACGCTAACTCTGCCTCCAGGCCCCGCGAAA
TCGGTGAATCCGTTCCCTGTTGGTAGCCCTGGTCGTCAGCGCTCTTCTAG
TCTTGCTGTTGGGATTCGCCTACGTGACGCGTAAGACGGACCCTGGAGA
CCCCGAGGACGCCCCGAGGCAGCCGCGGGACGGCAGCGCCGCGTCGCG
GCACAACGGTGCCTTCGAGCAGGACACCGAAGGAGGCACAGACGGGTC
CGGGTACCCGTCGCTGCCACCGTCCTACGAAGACGTCATCAAGGTTCCC
TGGACCATCTGGGCGGCGACTCAACAGGGAGCCTTACCCAGGGCACT
GGCGCCACGCCCCCTCCTTCGTACGAAGACGCCCGGAGGACATTCCCTT
TCCCTGAGTGA

*Itálico = peptídeo sinal. **Negrito = Região externa. *** Sublinhado = Região transmembrana.

ANEXO IV



06/09/2019 870190088388
17:54



29409161907385923

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 018609 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/09/2019 às 17:54, Petição 870190088388

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH - NIH

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ:

Nacionalidade: Norte Americana

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: 9000 Rockville Pike, Bethesda

Cidade: Maryland

Estado:

CEP:

País: ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21949888000183

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Avenida José Cândido da Silveira, nº 1500, Bairro Horto

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31035-536

País: BRASIL

Telefone: (31) 340 93932

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROTEÍNAS RECOMBINANTES, COMPOSIÇÕES VACINAIS PARA CONTROLE DE AMBLYLOMMA SCULPTUM E USOS

Resumo: A presente tecnologia trata de proteínas recombinantes, definidas pelas SEQ ID N° 1 a 4, baseadas em sequências de proteínas salivares e intestinais de *Amblyomma sculptum* e composições vacinais compreendendo tais sequências para o controle da infestação por *A. sculptum*.

Figura a publicar: 8