

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MARIA JOSÉ DE JESUS SILVA**

**Análise Funcional das Proteínas Salivares de *Amblyomma sculptum*:  
Mecanismos Anti-Hemostáticos e Implicações na Inibição de Coagulação e  
Agregação Plaquetária**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**MARIA JOSÉ DE JESUS SILVA**

**Análise Funcional das Proteínas Salivares de *Amblyomma sculptum*:  
Mecanismos Anti-Hemostáticos e Implicações na Inibição de Coagulação e  
Agregação Plaquetária**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira

Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S586a  
2023  
Silva, Maria José de Jesus, 1979-  
Análise funcional das proteínas salivares de *Amblyomma sculptum*: mecanismos anti-hemostáticos e implicações na inibição de coagulação e agregação plaquetária / Maria José de Jesus Silva. – Viçosa, MG, 2023.  
1 tese eletrônica (67 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.  
Referências bibliográficas: f. 50-67.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.353>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Acari*. 2. Carrapatos como transmissores de doenças.  
3. Sangue - Coagulação. 4. Proteína. 5. Saliva - Microbiologia.  
I. Siqueira, Cláudio Lísias Mafra de, 1965-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 595.42

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


**MARIA JOSÉ DE JESUS SILVA**

**Análise Funcional das Proteínas Salivares de *Amblyomma sculptum*:  
Mecanismos Anti-Hemostáticos e Implicações na Inibição de Coagulação e  
Agregação Plaquetária**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 14 de novembro de 2023.


Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 MARIA JOSE DE JESUS SILVA  
Data: 19/07/2024 15:15:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Maria José de Jesus Silva

Autora

Documento assinado digitalmente  
 CLAUDIO LISIAS MAFRA DE SIQUEIRA  
Data: 22/07/2024 14:37:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Cláudio L. Mafra de Siqueira

Orientador

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu a vida agradeço por tudo.

Ao meu marido Angelo que sempre me apoiou.

Aos meus filhos que sempre me deram alegria de viver nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais que sem eles nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Mafra pela parceria e que me acolheu estando sempre disposto em todos os momentos, me confiando este projeto.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Tiago Mendes que me abriu as portas do laboratório permitindo que aprendesse sempre mais.

Aos colegas do laboratório pela paciência e os momentos de descontração.

Ao Miquéias Fernandes que me ajudou em grande parte deste projeto em momentos de pandemia.

Aos colegas Renato Senra, Luiza Possa e Vinícius Romagnoli pela paciência e ensinamentos do laboratório com um pensamento sempre positivo e bacana de trabalho.

Ao colega Wesley Barros que sempre esteve presente, cursando as disciplinas, durante minha gravidez e apoiando nos resultados finais.

A todas as pessoas do LAPEM e do Laboratório de Biotecnologia Molecular pelo respeito e descontração em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica Aplicada.

Aos secretários do departamento Marco e Eduardo que sempre atentos e dispostos nas resoluções de nossos problemas. Principalmente no período de pandemia.

À Universidade Federal de Viçosa e a CAPES, pelo suporte e estrutura para a realização do trabalho.

## RESUMO

SILVA, Maria José de Jesus, D Sc, Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2023. **Análise Funcional das Proteínas Salivares de *Amblyomma sculptum*: Mecanismos Anti-Hemostáticos e Implicações na Inibição de Coagulação e Agregação Plaquetária.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientador: Tiago de Oliveira Mendes.

Os carrapatos são artrópodes parasitas hematófagos, pertencentes à ordem Acari e distribuídos em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. São conhecidos pela sua capacidade de parasitar diversos hospedeiros vertebrados, tais como: bovinos, equinos, cães, capivaras, aves e o homem. A espécie *A. sculptum* é encontrada no centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí) e sul do estado do Paraná. Também é encontrado em outros países como Bolívia, Paraguai e Argentina. Ele está altamente associado ao clima tropical e ao bioma do Cerrado. Visto o seu grande potencial vetorial de agentes infecciosos, como por exemplo, a bactéria *Rickettsia rickettsii* (causadora da Febre Maculosa Brasileira), este carrapato é considerado de grande importância nas áreas da saúde e médico-veterinária. A hematofagia, é a fase mais arriscada para o carrapato. Ele precisa do hospedeiro vertebrado para crescer e se multiplicar. Nesta etapa, o parasita fica vulnerável e se for percebido, o hospedeiro reagirá e mecanicamente irá matar o parasita. Daí a importância do arsenal molecular da saliva e da glândula salivar deste ácaro. Com suas características “de proteção ao carrapato” demonstra atividade vasodilatadora, anticoagulante, anti-inflamatória e imunossupressora. Exatamente moléculas que impedem a reparação de um tecido lesionado e “engana” o hospedeiro evitando o processo de cicatrização. Assim, nosso objetivo foi identificar moléculas neste carrapato envolvidas na anti-hemostasia. Neste trabalho, identificamos proteínas na saliva e na glândula salivar da espécie *Amblyomma sculptum* após o sequenciamento realizado pelo nosso grupo de pesquisa. As proteínas e suas famílias encontradas são: IRS-2, AamS6, IxscS-1E1, RmS-15 e AAS19, todas da família das serpinas que apresentaram maior quantidade de genes no alinhamento. Proteínas da família Kunitz também foram encontradas: Boophilin, Ir-CPI, Haemangin, Ixolaris e Amblyomin-X. A proteína sialostatin L da família das Cistatinas. A proteína MIF homolog da família das MIF's. A calreticulina da família das calreticulinas. O restante sem classificação de família: BmAp, IXOSP, TIX-

5, THRF, AamAV422. As funções foram: 57% delas atuam na coagulação sanguínea, AamS6, IxscS-1E1, RmS-15, AAS19, Boophilin, Ir-CPI, TIX-5, Ixolaris, BmAP, IXOSP, AamAV422, Calreticulin, Amblyomin-X. Atuando na agregação plaquetária são 22%: IRS-2, AamS6, IxscS-1E1, AAS19, Boophilin. Em Cicatrização/Angiogênese temos 9% com: Haemangin e IRS-2. A proteína da família MIF, age na resposta imune inata. A proteína Sialostatin L da família da cistatina atua na resposta imune adquirida. A proteína THRF age como vasodilatador. Mais estudos são necessários para a confirmação dessas funções.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*, Proteínas Salivares, Mecanismos Anti-Hemostáticos.

## ABSTRACT

SILVA, Maria José de Jesus, D Sc, Universidade Federal de Viçosa, november, 2023. **Funcional Analysis of Salivary Proteins from *Amblyomma sculptum*: Anti-Hemostatic Mechanisms and Implications in Coagulation Inhibition and Platelet Aggregation.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-adviser: Tiago de Oliveira Mendes.

Ticks are hematophagous parasitic arthropods, belonging to the Acari order and distributed in three families: Ixodidae, Argasidae and Nuttalliellidae. They are known for their ability to parasitize various vertebrate hosts, such as: cattle, horses, dogs, capybaras, birds and humans. The species *A. sculptum* is found in the center-west (Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul), Northeast (Pernambuco and Piauí) and south of the state of Paraná. It is also found in other countries such as Bolivia, Paraguay and Argentina. It is highly associated with the tropical climate and the Cerrado biome. Given its great vector potential for infectious agents, such as the bacterium *Rickettsia rickettsii* (which causes Brazilian Spotted Fever), this tick is considered of great importance in the health and veterinary fields. Hematophagy is the most risky phase for the tick. It needs the vertebrate host to grow and multiply. At this stage, the parasite is vulnerable and if it is detected, the host will react and mechanically kill the parasite. Hence the importance of the molecular arsenal of saliva and the salivary gland of this mite. With its “tick protection” characteristics, it demonstrates vasodilatory, anticoagulant, anti-inflammatory and immunosuppressive activity. Exactly molecules that prevent the repair of injured tissue and “deceive” the host by avoiding the healing process. Therefore, our objective was to identify molecules in this tick involved in antihemostasis. In this work, we identified proteins in the saliva and salivary gland of the species *Amblyomma sculptum* after sequencing carried out by our research group. The proteins and their families found are: IRS-2, AamS6, IxscS-1E1, RmS-15 and AAS19, all from the serpin family that presented the largest number of genes in the alignment. Kunitz family proteins were also found: Boophilin, Ir-CPI, Haemangin, Ixolaris and Amblyomin-X. The sialostatin L protein from the Cystatin family. The homologous MIF protein of the MIF family. Calreticulin from the calreticulin family. The remainder without family classification: BmAp, IXOSP, TIX-5, THRF, AamAV422. The functions were: 57% of them act on blood coagulation, AamS6, IxscS-1E1, RmS-15, AAS19, Boophilin, Ir-CPI, TIX-5, Ixolaris, BmAP, IXOSP, AamAV422, Calreticulin, Amblyomin-X. Acting on platelet aggregation are 22%: IRS-2, AamS6, IxscS-1E1, AAS19, Boophilin. In Healing/Angiogenesis we have 9% with: Haemangin and IRS-2. The MIF family protein acts in the innate immune response. The cystatin family protein Sialostatin L acts in the acquired immune response. The THRF protein acts as a vasodilator. More studies are needed to confirm these functions.

Keywords: *Amblyomma sculptum*, Salivary Proteins, Anti-Hemostatic Mechanisms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> <i>Amblyomma sculptum</i> .....	15
<b>Figura 2:</b> Aberturas genitais de fêmeas adultas de <i>A. cajennense</i> e <i>A. sculptum</i> ... 15	15
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida do <i>A. sculptum</i> .....	16
<b>Figura 4:</b> Distribuição geográfica do <i>A. sculptum</i> .....	18
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da aquisição e transmissão de um patógeno por um carrapato. ....	21
<b>Figura 6:</b> Mudança morfológica das plaquetas.....	24
<b>Figura 7:</b> Vias da Coagulação Sanguínea .....	25
<b>Figura 8:</b> Vias do sistema complemento.....	27
<b>Figura 9:</b> Fluxograma do primeiro alinhamento para a identificação das proteínas. 32	32
<b>Figura 10:</b> Fluxograma da metodologia de comparação de proteínas entre espécies. ....	34
<b>Figura 11:</b> Árvore filogenética de proteínas, com função anticoagulante, preditas em <i>A. sculptum</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies e acessos correspondentes do NCBI, escolhidos para a etapa de alinhamento.....	33
<b>Tabela 2:</b> Resumo das proteínas encontradas em <i>A. sculptum</i> .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Identificação de Proteínas.....	35
<b>Gráfico 2:</b> Famílias de proteínas encontradas no proteoma do <i>A. sculptum</i> .....	36
<b>Gráfico 3:</b> Porcentagem de proteínas com mesma função.....	37
<b>Gráfico 4:</b> Diagrama de proteínas comuns em cada espécie.....	38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

sl	sensu lato
ss	sensu stricto
FMB	Febre Maculosa Brasileira
MS	Ministério da Saúde
TNF	fator de necrose tumoral
NGS	sequenciamento de próxima geração
IL	interleucina
Iripin-1	<i>Ixodes ricinus</i> serpin-1
vWF	Fator de Von Willebrand
ADP	difosfato de adenosina;
TSP	trombospondina
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
GP	glicoproteína
RGD	arginina – glicina – ácido aspártico
TF	Fator tecidual
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
TAP	tick anticoagulante peptide
IRS-2	<i>Ixodes ricinus</i> serpin-2
AamS6	<i>Amblyomma americanum</i> serpin-6
IxscS-1E1	<i>Ixodes scapularis</i> serpin
RmS-15	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> serpin-15
AAS19	<i>Amblyomma americanum</i> serpin-19
Ir-CPI	<i>Ixodes ricinus</i> contact phase inhibitor
Amblyomin-X	<i>Amblyomma</i> Factor Xa in inhibitor
BmAp	<i>Boophilus microplus</i> Anticoagulant Protein
IXOSP	<i>Ixodes scapularis</i> salivary serine protease
aa	aminoácidos
RCL	Reactive Center Loop
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
CRTs	Calreticulinas

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 CARRAPATO.....	14
2.1.1 Taxonomia e Classificação do <i>Amblyomma sculptum</i> .....	14
2.1.2 Ciclo de Vida.....	15
2.1.3 Distribuição Geográfica.....	17
2.1.4 Importância Médica e Veterinária .....	19
2.2 O PROCESSO HEMATOFÁGICO .....	20
2.2.1 Vasoconstrição .....	22
2.2.2 Agregação plaquetária (secundário).....	23
2.2.3 Coagulação sanguínea.....	25
2.2.4 Resposta ao sistema complemento .....	26
2.3 TÉCNICAS COMBINADAS.....	28
3. OBJETIVO .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. METODOLOGIA .....	32
4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	32
4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES .....	32
5. RESULTADOS.....	35
5.1 PROTEÍNAS .....	35
5.2 PREVISÃO DAS FUNÇÕES.....	36
5.3 COMPARATIVO.....	37
5.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	38
6. DISCUSSÃO .....	39
7. CONCLUSÃO .....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Amblyomma sculptum*, organismo de estudo deste trabalho, faz parte do complexo *Amblyomma cajennense*, dentro da ordem Ixodida, a que apresenta maior número de espécies, chamados também de carrapatos duros (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006; APANASKEVICH *et al.*, 2019). Ele pode parasitar diversas espécies de vertebrados, incluindo o homem, tendo preferência por capivaras, cavalos e antas (LABRUNA *et al.* 2001; DE PAULA *et al.*, 2022; NAVA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016; KRAWCZAK *et al.*, 2023; NOGUEIRA *et al.*, 2023; FLORES *et al.*, 2023).

Este ácaro apresenta preocupações na saúde pública, na medicina veterinária, na economia e no controle ambiental. Na saúde, devido ao alto nível de transmissão de muitas doenças. Na economia que gera grandes prejuízos econômicos na pecuária e com a necessidade de uso de carrapaticidas para controle dos carrapatos, também existe uma preocupação ambiental (ABREU, 2018; ALVES *et al.*, 2022).

O *Amblyomma sculptum* tem forte ação no parasitismo em humanos, sendo considerado o mais importante transmissor da *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria causadora da febre maculosa Brasileira (FMB), doença de alta mortalidade (MARTINS *et al.*, 2016; LABRUNA *et al.*, 2017; BLANDA *et al.*, 2020).

O ciclo de vida dele é de longa duração e precisa de 3 hospedeiros e tem 4 estágios básicos de vida: ovo, Larva, ninfa e adultos (NEVES, 2016; LABRUNA *et al.*, 2002). Todos os estágios parasitários são geralmente encontrados ao longo do ano, variando de acordo com o fotoperíodo de cada região (DE PAULA *et al.*, 2022). Devido a esta sazonalidade e o alto índice de parasitismo em pessoas, existe uma preocupação para entender cada vez mais os processos bioquímicos e fisiológicos que envolve este carrapato (NATIVIDADE *et al.*, 2021; SZABÓ *et al.*, 2020).

Vários estudos confirmaram a presença do *A. sculptum* na Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina. Sua presença está altamente associada ao clima tropical e ao bioma do Cerrado (DE PAULA, *et al.*, 2022). No Brasil é encontrado no centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí) e sul do estado do Paraná (NAVA *et al.*, 2014; DANTAS-TORRES, 2019).

A hematofagia, que é o processo de alimentação com sangue, é a fase mais arriscada para o carrapato. Tanto a transmissão do patógeno quanto o sucesso da alimentação sanguínea dependem da saliva do carrapato, que é injetada no local de

sua ligação ao hospedeiro para inibir a hemostasia , a inflamação, bem como as respostas imunes inatas e adaptativas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009).

Para a maioria dos patógenos transmitidos pelos carrapatos, a transmissão ao hospedeiro ocorre pela saliva, mostrando a importância das glândulas salivares e da saliva no processo de transmissão. Durante a alimentação, eles alternam a sucção de sangue e a injeção da saliva pelo mesmo canal (ŠIMO *et al.*, 2017).

Os carrapatos têm inúmeras formas para permanecerem discretos e fixados aos seus hospedeiros durante a sua longa refeição. Conseqüentemente, várias moléculas na saliva do carrapato podem impedir a dor e a coceira, inibindo as defesas do hospedeiro e facilitando o fluxo de sangue. Com este fim, a saliva exibe atividade vasodilatadora, anticoagulante, anti-inflamatória e imunossupressora. Exatamente moléculas que impedem a reparação de um tecido lesionado e “engana” o hospedeiro evitando o processo de cicatrização (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002; FRANCISCHETTI, 2010; KAZIMÍROVÁ e ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; CHMELAŘ *et al.*, 2016; HEGAZY *et al.*, 2022).

Quando um carrapato se fixa para realizar a hematofagia, ele gera uma ferida na pele (ou lesão), imediatamente o organismo inicia o processo de correção (a hemostasia) para que não haja perda sanguínea, realizando assim: a vasoconstrição, o tampão plaquetário, a formação de coágulo sanguíneo e o crescimento de tecido fibroso no coágulo para fechamento da lesão (SIMO *et al.*, 2017; GUYTON & HALL, 2017).

O objetivo deste estudo é identificação de proteínas da glândula salivar e da saliva com ação anti-hemostática do *A. sculptum*, a partir do genoma sequenciado por BRAGA, 2019. Dada toda a importância e a preocupação com este carrapato, estudos mais profundos é sempre necessária, a fim de descobrir e entender possíveis quais medidas e procedimentos mais eficazes que podem ser tomadas para controle, como alvos para vacinas e novas possibilidades de combate a doenças que afetam tantas vidas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARRAPATO

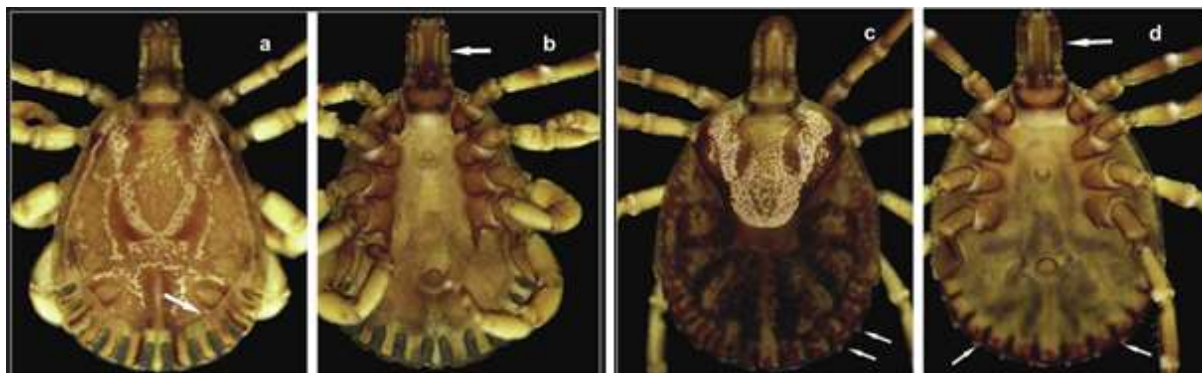
#### 2.1.1 Taxonomia e Classificação do *Amblyomma sculptum*

Os carrapatos são ectoparasitas, que se alimentam de sangue, pertencentes ao filo Arthropoda, incluídos na classe Arachnida e na ordem Ixodida (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/tree/?taxon=6935>). As famílias que fazem parte dessa ordem são: 1) Ixodidae: que são os carrapatos de corpo duro, com maior número de espécies, aproximadamente 700. Eles são chamados assim, porque apresentam escudo rígido quitinoso na superfície dorsal que cobre o corpo inteiro dos machos adultos e metade anterior do dorso das fêmeas, ninfas e larvas (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006); 2) Argasidae: que são os carrapatos de corpo mole. Estes possuem escudo dorsal e uma cutícula dobrada que se expande durante a alimentação, existem aproximadamente 200 espécies; 3) Nuttalliellidae: que é formada por um único carrapato, a espécie *Nuttalliella namaqua*. Este apresenta características morfológicas intermediárias entre as duas primeiras. Ixodidae e Argasidae são amplamente encontrados em vários continentes, enquanto o Nuttalliellidae é encontrado apenas no continente Africano (GUGLIELMONE *et al.*, 2010; MANS *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2018; KWAK *et al.*, 2018; DANTAS-TORRES, 2018; APANASKEVICH *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019; TOMLINSON E APANASKEVICH, 2019; VENZAL *et al.*, 2019).

DANTAS-TORRES (2019) fez um levantamento, de vários autores, de espécies encontradas apenas no Brasil. Das 70 espécies, 47 pertencem à família Ixodidae e 23 à família Argasidae. Dentre os carrapatos pertencentes à família Ixodidae, o gênero *Amblyomma* é o mais representativo, com 32 espécies.

O carrapato *Amblyomma sculptum* (Figura 1), também é conhecido como “carrapato estrela”, “carrapato do cavalo”, “rodoleiro”, e em sua fase larval é chamado de “carrapato-pólvora”, “micuim” ou “vermelhinho” (RODRIGUES *et al.*, 2015). Sendo parte do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato (sl) (ou complexo *Amblyomma cajennense*), agrupa mais cinco espécies diferentes (*A. cajennense* sensu stricto (ss), *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. tonelliae*). Antes de 2014, eram considerados só uma espécie, chamada *Amblyomma cajennense* apenas. Com a realização de uma mudança taxonômica, feita por análises moleculares e

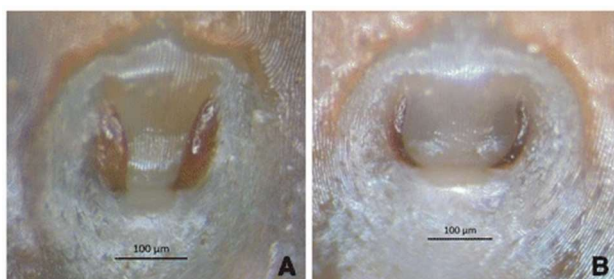
morfológicas, demonstrou-se eles estão relacionados a diferentes áreas biogeográficas (BEATI *et al.*, 2013; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2014; NAVA *et al.*, 2014; COTES-PERDOMO *et al.*, 2023).



**Figura 1:** *Amblyomma sculptum*.

**a:** dorsal do macho (aumento 32x). **b:** ventral masculino (mag. 32x). **c:** dorsal feminino (mag. 32x). **d:** ventral feminino (mag. 32x). As setas indicam o sulco marginal completo no macho (a), festões com tubérculos quitinosos na fêmea (c e d) e o longo rostro em ambos os sexos (Fonte: DANTAS-TORRES, 2019).

Deste complexo, apenas o *A. cajennense* ss e o *A. sculptum* foram encontrados no Brasil. Os machos destas espécies foram distinguidos por análise genética e molecular, já que, em algumas áreas, podem ocorrer em simpatria (sobreposição geográfica). No entanto, as fêmeas apresentam uma diferença morfológica em sua abertura genital, no *A. cajennense* ss a abertura tem a forma de “V”, enquanto no *A. sculptum* tem a forma de “U”. Isto é melhor visualizado na figura 2 (NAVA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016; DANTAS-TORRES, 2019).



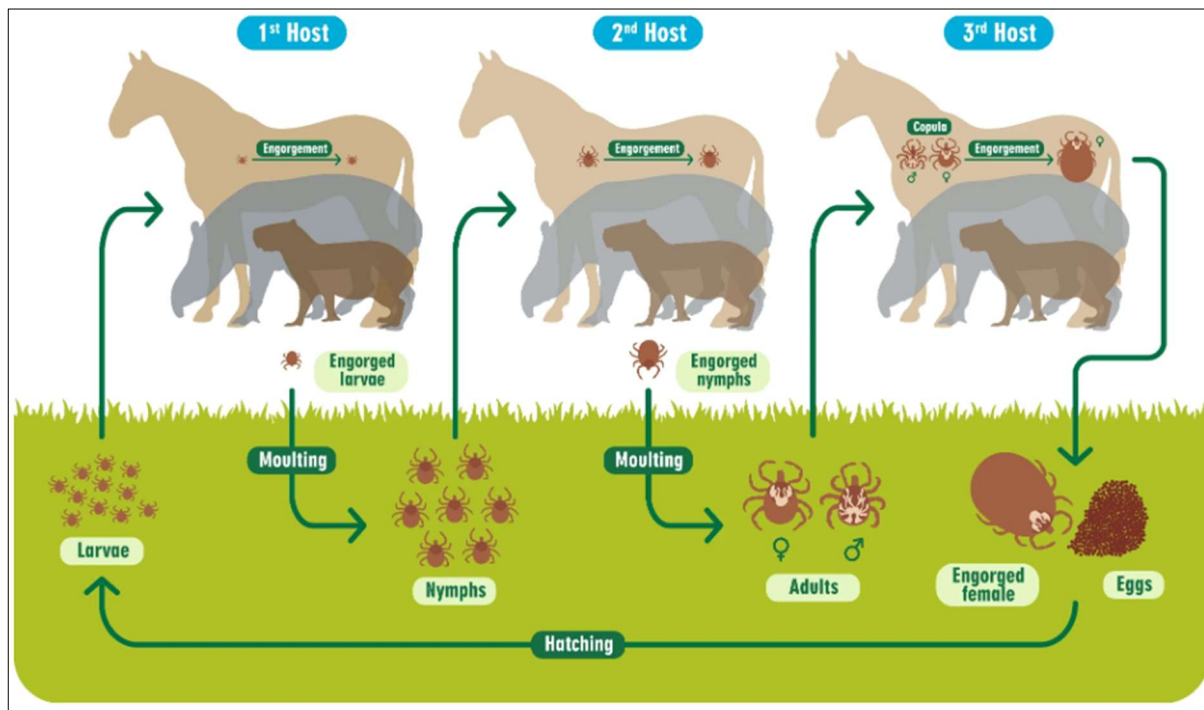
**Figura 2:** Aberturas genitais de fêmeas adultas de *A. cajennense* e *A. sculptum*.

**A:** “V” em *Amblyomma cajennense* (*sensu stricto*), exemplar de Governador Jorge Teixeira, Rondônia, Brasil; **B:** Forma de “U” em *Amblyomma sculptum*, espécime de Pirassununga, São Paulo, Brasil (Fonte: MARTINS *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Ciclo de Vida

O *A. sculptum* pode parasitar diversas espécies de vertebrados como bovinos, equinos, cães, capivaras, aves, roedores e o homem (MARTINS *et al.*, 2016; KRAWCZAK *et al.*, 2023; NOGUEIRA *et al.*, 2023; FLORES *et al.*, 2023). A preferência geral desta espécie, em todos os estágios parasitários, são capivaras, cavalos e antas (LABRUNA *et al.* 2001; DE PAULA *et al.*, 2022; NAVA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016).

Um ciclo de vida (figura 3) completo deste carrapato precisa de 3 hospedeiros (Trioxeno) e 4 estágios básicos de vida: ovo, Larva, ninfa e adultos (NEVES, 2016; LABRUNA *et al.*, 2002).



**Figura 3:** Ciclo de vida do *A. sculptum*.  
(Fonte: DE PAULA *et al.*, 2022)

Este ciclo começa quando uma fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro e vai para o solo em busca de abrigo, para realizar a postura de 4.000 a 18.000 ovos, morrendo a seguir. Em aproximadamente 25 dias, os ovos eclodem e nascem as larvas que sobem na vegetação e, formando aglomerados, ficam à espera de seu primeiro hospedeiro. Ao encontrar um hospedeiro, buscam um local adequado, fixam-se e iniciam a hematofagia. Em seguida, as larvas descem para as frestas no solo e passam pela etapa de muda, tornando-se ninfas. Elas sobem para a superfície da vegetação à espera do segundo hospedeiro. Ao encontrá-lo, fazem a sucção sanguínea e caem novamente no solo, onde mudam para adultos machos e fêmeas, e novamente sobem a vegetação para aguardar um terceiro hospedeiro, no qual copularão e se alimentarão. As fêmeas completamente ingurgitadas caem para o solo, colocam seus ovos e morrem. Assim, fecham um ciclo de vida. Esta espécie apresenta um ciclo de uma geração por ano (DE PAULA *et al.*, 2022). Os machos permanecem no hospedeiro por toda a vida em busca de fêmeas para acasalar. Cada repasto sanguíneo, entre os estágios de desenvolvimento, dura entre 5 e 12 dias, em

média. Já as mudas (ecdise) podem durar entre 20 e 30 dias, dependendo do clima (NEVES, 2016).

O ciclo biológico é de longa duração, apresentando sazonalidade ou fotoperíodo (NEVES, 2016). Todos os três estágios parasitários são geralmente encontrados ao longo do ano, levando em consideração as preferências sazonais, dependendo das características climáticas e latitudes de cada região (fotoperíodos diferentes de cada local). Por exemplo, todos os estudos nas regiões sul, sudeste e centro-oeste foram de áreas caracterizadas por um inverno frio e seco e um verão quente e chuvoso. Assim, o período de diapausa (tempo em que as larvas e ninfas, permanecem em repouso no solo sem alimentação, até que fatores climáticos e sazonais favoráveis, ativem essas larvas para a busca por hospedeiros) desse carrapato ocorrem nos períodos de outono e inverno, enquanto os adultos ocorrem com maior frequência nos meses mais quentes do ano, referentes à primavera e verão (RODRIGUES, *et al.*, 2015; LABRUNA, 2018; DE PAULA *et al.*, 2022). Devido a esta sazonalidade, SZABÓ e colaboradores em 2020 numa pesquisa de 2 anos, mostrou que entre os estágios de vida desta espécie, a ninfa é a fase mais abundante, sendo a mais encontrada nas picadas em humanos dos 439 carrapatos estudados em uma reserva do cerrado brasileiro.

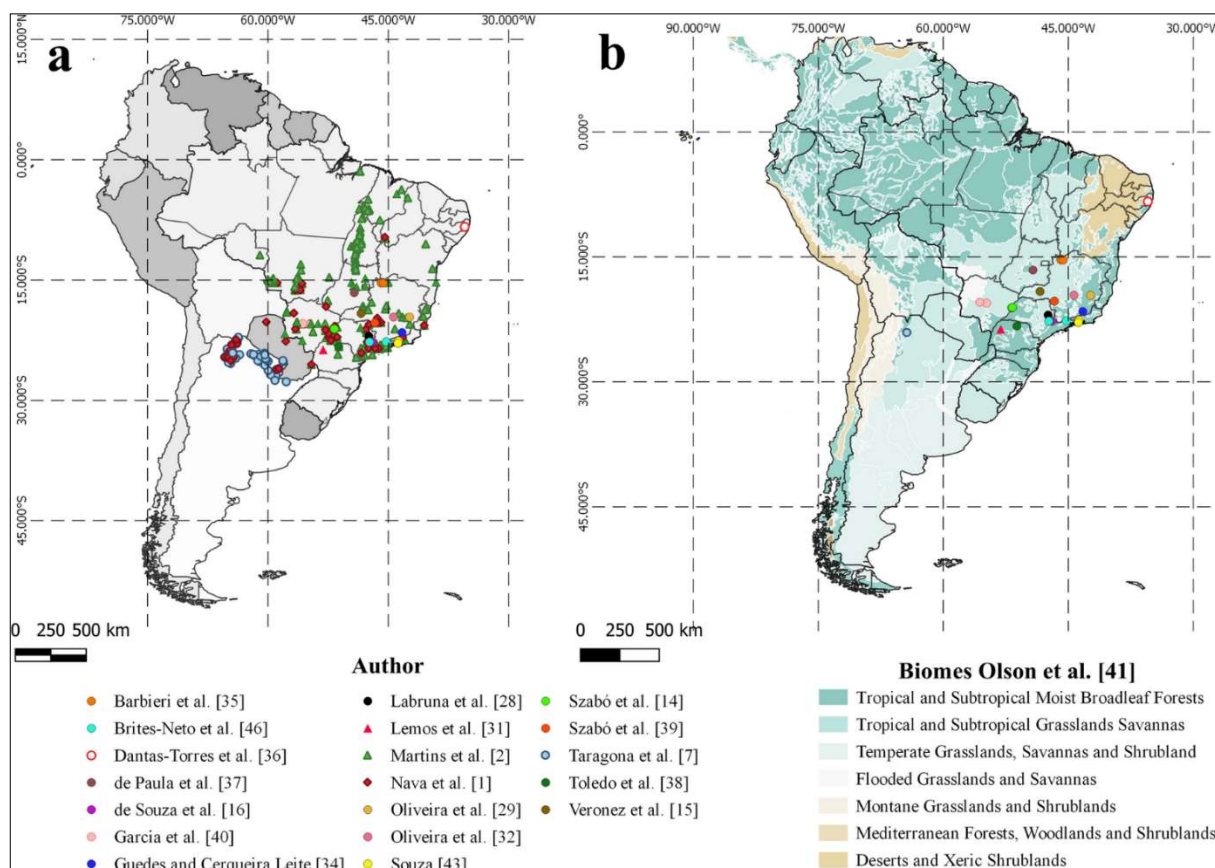
O alto índice de parasitismo deste ácaro, observado em pessoas, é aumentado também porque ele apresenta como principais características de comportamento, sendo agressivo na procura ativa pelo hospedeiro com “emboscada” e alta capacidade de deslocamento (NATIVIDADE *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Distribuição Geográfica

Vários estudos foram reunidos confirmando a presença do *A. sculptum* na Bolívia, Brasil, Paraguai e Argentina como mostrado no mapa da figura 4. Ele está altamente associado ao clima tropical e ao bioma do Cerrado. É importante destacar que seis (35,3%) dos estudos citados foram próximos ou são de áreas com casos notificados ou confirmados de riquetsiose humana, ou com circulação confirmada de *Rickettsia* spp. Além disso, entre os 16 estudos realizados no Brasil, 12 (75%; publicados entre 1990 e 2022) concentraram-se na região sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo), onde a maioria dos casos de FMB foi relatada, com taxas de letalidade de aproximadamente 50%. Por outro lado, quatro

(23,5%) dos estudos mais recentes foram publicados entre 2018 e 2022 em áreas que não haviam sido estudadas anteriormente, como as regiões nordeste e centro-oeste do Brasil e o único estudo na Argentina (DE PAULA, *et al.*, 2022).

A espécie *A. sculptum* é encontrada também no centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí) e sul do estado do Paraná (NAVA *et al.*, 2014).



**Figura 4:** Distribuição geográfica do *A. sculptum*.

**a:** Locais de ocorrência do *Amblyomma sculptum*, na América do Sul. **b:** Locais de estudos dinâmicos sazonais realizados entre 1990 e 2022, com ênfase nos tipos de biomas para cada local. (Fonte: DE PAULA, *et al.*, 2022).

Dada a importância, muitos autores tentam prever qual seriam os futuros locais de maior frequência desse carrapato, levando em conta estudos de previsões de mudanças climáticas e a adaptabilidade ao clima. Como por exemplo, o desmatamento e mudanças climáticas que podem levar a expansão do *A. sculptum* para o norte do Brasil. Com isso também, a expansão de outras doenças transmitidas por carrapatos (GUGLIELMONE *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2016). Oliveira e colaboradores compararam, em 2017, os dados da época e futuros prevendo que as áreas adequadas para populações dessa espécie diminuiriam e se deslocariam mais para o sul do Brasil. Porém, essas previsões devem ser consideradas com muita

cautela, por considerar previsões de adaptação de populações de vetores a novos climas e condições de aquecimento que permanecem desconhecidas, conduzindo a situações irreais e contra dizes, principalmente para grandes áreas (DE PAULA, *et al.*, 2022).

#### 2.1.4 Importância Médica e Veterinária

O carrapato *A. sculptum* apresenta forte ação no parasitismo em humanos, sendo considerado o mais importante transmissor da *Rickettsia rickettsii* (MARTINS *et al.*, 2016; LABRUNA *et al.*, 2017). Uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória de crescimento lento (BLANDA *et al.*, 2020), causadora da febre maculosa Brasileira (FMB), doença de alta mortalidade, considerada pelo Ministério da Saúde (MS) como agravo de notificação compulsória, desde 2002 (Brasil/MS, 2023).

Em 2020, o Ministério da Saúde emitiu a “PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020”, onde estabelece que todo caso de febre maculosa é de notificação obrigatória às autoridades locais de saúde: “Deve-se iniciar a investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação, avaliando a necessidade de adoção de medidas de controle pertinentes” (<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa>), isto é necessário devido à grande periculosidade da doença.

De 2007 a 2015, foram notificados no Brasil 1.245 casos confirmados de riquetsiose maculosa (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Destes, 411 resultaram em morte, a maioria do sudeste do Brasil, onde a mortalidade chegou a 55%. Apesar de ser o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, no Brasil, estudos recentes indicam que o papel vetorial do *A. sculptum* pode variar de região para região (BITENCOURTH *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

O Ministério da Saúde mantém uma tabela de casos notificados no Brasil (<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa/situacao-epidemiologica/casos-confirmados-de-febre-maculosa-brasil-grandes-regioes-e-unidades-federadas-infeccao-2007-2023/view>) entre 2007 e o dia 14 de junho de 2023, tivemos 2.821 casos confirmados de FMB.

O *A. sculptum* também apresenta preocupações na medicina veterinária gerando prejuízos econômicos na pecuária. Com a alimentação de vários dias eles causam danos permanentes ao couro dos animais, como também anemia, irritação

cutânea, instalação de miíases (infecção parasitária gerada por larvas de moscas), diminuição na produção de leite, perda de peso, redução da natalidade, diminuição da quantidade do leite e gastos com carrapaticidas (ABREU, 2018; ALVES *et al.*, 2022).

Várias doenças podem ser transmitidas aos animais por carrapatos de diferentes espécies como: Babesiose - causada por um protozoário da espécie *Babesia ssp*; ehrlichiose e anaplasmoses - pelas bactérias *Ehrlichia ssp* e *Anaplasma ssp.*, respectivamente, ambas apresentando sintomas muito semelhantes, dificultando o diagnóstico; Borrelioses – Ocasionadas por bactérias do gênero *Borrelia*; além de várias outras doenças transmitidas por vírus, a maioria da grande família de arbovírus *Flaviviridae*. Estas doenças ocorrem entre muitos mamíferos, como humanos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos, suínos, gatos e cães, na maioria dos casos sendo fatais (JERZAK *et al.*, 2023; KULAGINA *et al.*, 2023; MASSARD E FONSECA, 2004; MARTINS *et al.*, 2020;).

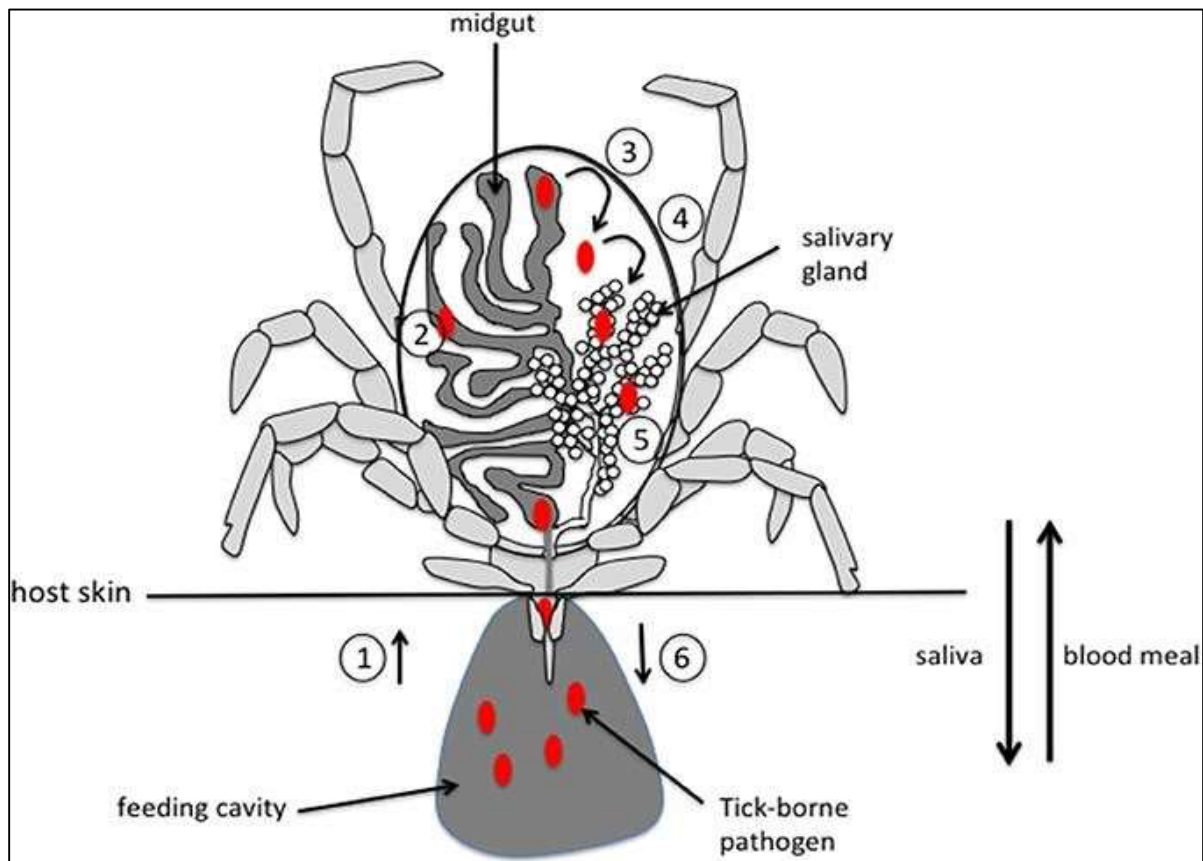
Devido a estes fatores na saúde pública e animal é imprescindível que busquemos sempre mais informações destes vetores que causam tantos estragos. Estudos mais profundos de cada espécie é necessária, a fim de descobrir e entender possíveis alvos para vacinas e novas possibilidades de combate a doenças que afetam tantas vidas.

## 2.2 O PROCESSO HEMATOFÁGICO

A hematofagia, que é o processo de alimentação com sangue, é a fase mais arriscada para o carrapato. É neste momento, que para a obtenção de sangue, estes ácaros precisam localizar o hospedeiro vertebrado, sua fonte alimentar. Nesta etapa, o parasita fica vulnerável na vegetação à espera do momento da “emboscada” ao hospedeiro. Assim que sobe no hospedeiro, busca um local adequado e favorável para penetrar suas peças bucais sem ser percebido. Caso haja a percepção do hospedeiro, este reagirá mecanicamente podendo levar à morte do parasita (ROSSIGNOL *et al.*, 1985; RAMOS *et al.*, 2017). Tanto a transmissão do patógeno quanto o sucesso da alimentação sanguínea dependem da saliva do carrapato, que é injetada no local de sua ligação ao hospedeiro para inibir a hemostasia, a inflamação, bem como as respostas imunes inatas e adaptativas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009). À medida que o carrapato se prepara para inserir seu hipóstomo através

da pele do hospedeiro, a contração dos ductos salivares inicia o fluxo de saliva para a ponta do aparelho bucal. A saliva é bombeada para o local de alimentação antes que qualquer sangue seja consumido e, posteriormente, o carrapato passa por ciclos alternados de alimentação e salivação, que são críticos para a sobrevivência (STONE *et al.*, 1983).

Para a maioria dos patógenos transmitidos por carrapatos, a transmissão ao hospedeiro vertebrado ocorre pela saliva (figura 5), mostrando a importância das glândulas salivares e da saliva no processo de transmissão. Durante a alimentação, os carrapatos injetam saliva e absorvem a refeição de maneira alternada através do mesmo canal. Eles são alimentadores de poças (bolsões hemorrágicos), ingurgitando todos os fluidos que são exsudados na poça hemorrágica gerada pela picada (ŠIMO *et al.*, 2017).



**Figura 5:** Representação esquemática da aquisição e transmissão de um patógeno por um carrapato. Os patógenos são ingeridos pelo carrapato junto com a refeição de sangue durante a picada. (2) Patógenos invadem o intestino médio e, dependendo da espécie, permanecem no intestino até a próxima alimentação ou cruzam imediatamente o epitélio do trato digestivo (3) para invadir o corpo do carrapato. (4) Os patógenos se movem para as glândulas salivares atravessando o epitélio e invadindo os ácinos (5). (6) Os patógenos são injetados em um novo hospedeiro durante a alimentação, juntamente com a saliva que neutraliza a hemostasia, a inflamação e as respostas imunes do hospedeiro, facilitando a infecção por patógenos no hospedeiro. Observe que, para maior clareza, apenas metade do trato digestivo e uma única glândula salivar são representadas (Fonte: ŠIMO *et al.*, 2017).

Os carrapatos têm inúmeras formas para permanecer discretos e fixados aos seus hospedeiros durante a sua longa refeição. Conseqüentemente, várias moléculas na saliva do carrapato podem impedir a dor e a coceira, inibindo as defesas do hospedeiro e facilitando o fluxo de sangue. Com este fim, muitos são os relatos na literatura sobre a composição salivar e a variação na expressão de seus componentes em artrópodes hematófagos (ARCÀ AND RIBEIRO, 2018; SIMO *et al.*, 2017; HEGAZY *et al.*, 2022). A saliva exibe atividade vasodilatadora, anticoagulante, anti-inflamatória e imunossupressora. Exatamente moléculas que impedem a reparação de um tecido lesionado e “engana” o hospedeiro evitando o processo de cicatrização (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002; MANS, 2011; FRANCISCHETTI, 2010; KAZIMÍROVÁ e ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013; VALDÉS, 2014; CHMELAŘ *et al.*, 2016).

Quando um carrapato se fixa para realizar a hematofagia, ele gera uma ferida na pele (ou lesão), imediatamente o organismo inicia o processo de correção (a hemostasia) para que não haja perda sanguínea, realizando assim: a vasoconstrição, o tampão plaquetário, a formação de coágulo sanguíneo e o crescimento de tecido fibroso no coágulo para fechamento da lesão (SIMO *et al.*, 2017; GUYTON & HALL, 2017). Assim, as células que ficam próximas do local da fixação do carrapato, como queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, macrófagos e células dentríticas, iniciam a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (HEINZE *et al.*, 2012). As citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-1 $\beta$  estimulam a expressão de moléculas de adesão celular na superfície das células endoteliais (MAKO *et al.*, 2010). Já as quimiocinas ajudam na adesão firme dos leucócitos às células endoteliais e também criam um gradiente de concentração no espaço extracelular que direciona as células do sistema imunológico inato (como neutrófilos e monócitos) para o local de alimentação do carrapato (GRIFFITH *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Vasoconstrição

A vasoconstrição é a contração da musculatura lisa da própria parede vascular da lesão, para diminuir o fluxo sanguíneo, que é gerada de espasmo local, impulso nervoso pelas plaquetas. Porém, para pequenos vasos a maior parte dessa vasoconstrição é gerada pelas plaquetas com a liberação do tromboxano A<sub>2</sub> (GUYTON & HALL, 2017).

Em contraste com a vasoconstrição os carrapatos liberam em sua saliva compostos que geram a vasodilatação facilitando a alimentação sanguínea. Um exemplo disso, é a serpina chamada Iripin-1 (*Ixodes ricinus serpin-1*) detectada nas glândulas salivares do carrapato *Ixodes ricinus*. Esta proteína inibe a plasmina, a calicreína, a matriptase e a tripsina. Estas proteases estão envolvidas na resposta inflamatória modulando a vasodilatação, a permeabilidade vascular, a migração de células imunes e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (CHLASTÁKOVÁ *et al.*, 2023).

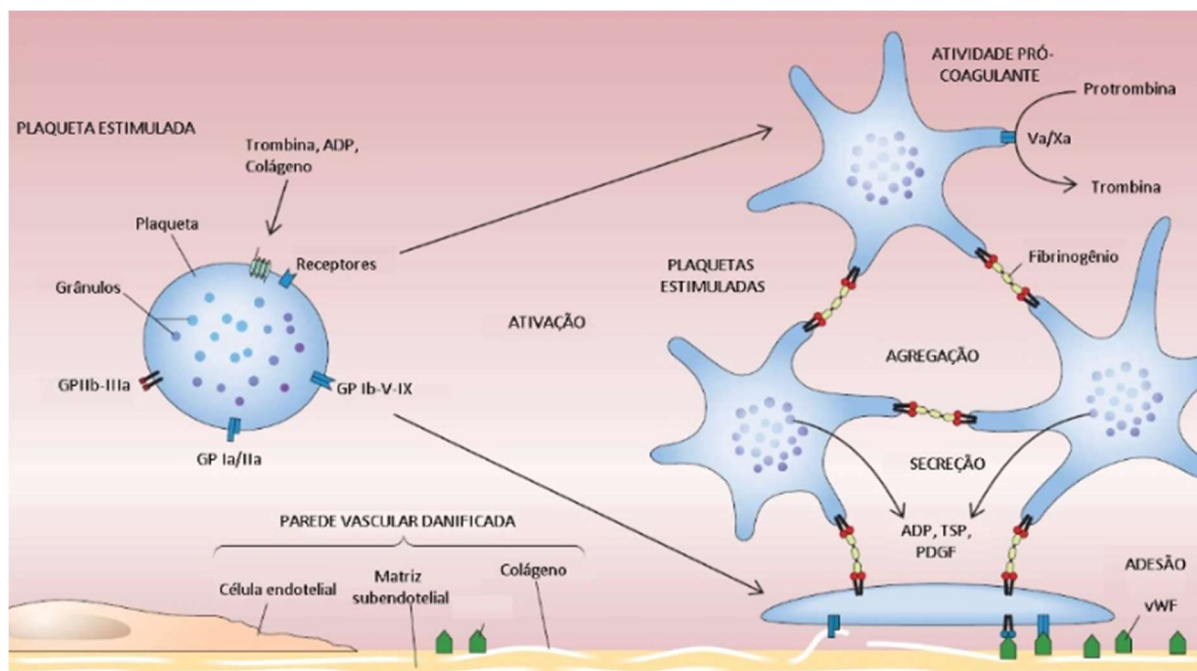
A vasoconstrição ocorre após a liberação de vários compostos como leucotrienos pelos mastócitos, endotelinas pelo endotélio local, serotonina e tromboxano pelas plaquetas ativadas e outras proteínas sanguíneas como a angiotensina I (JMEL *et al.*, 2023).

### 2.2.2 Agregação plaquetária (secundário)

Como primeira linha de defesa, a agregação plaquetária deve impedir a hemorragia, formando um tampão de plaquetas para obstruir a lesão vascular. Formadas por fragmentos de células da medula óssea, as plaquetas são discos arredondados de 1 a 4 micrômetros de diâmetro. Resumidamente, quando as plaquetas entram em contato com o colágeno da parede vascular, sua forma arredondada modifica para pseudópodos alongados irregulares. Proteínas internas contraem-se liberando grânulos com fatores ativos que ficam pegajosos e aderem ao colágeno dos tecidos e à proteína, chamada Fator de Von Willebrand (vWF), vazando do plasma para o tecido lesionado. Elas secretam grande quantidade de ADP e suas enzimas formam o tromboxano A<sub>2</sub>. As plaquetas são ativadas pelo ADP e o tromboxano, com cada plaqueta se ligando a outra e formando uma rede (GUYTON & HALL, 2017). Os estímulos fisiológicos plaquetários quando há uma lesão, são a trombina, o colágeno, o ADP e a adrenalina, sendo os dois primeiros os mais fortes (LEUNG, 2012).

O tampão plaquetário se forma com a ligação do fibrinogênio no complexo GPIIb-IIIa (receptor nas plaquetas), como apresentado na figura 6. A GPIIb-IIIa também é chamada de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e é membro de uma superfamília de receptores de proteínas de adesão, as integrinas, formada por um complexo de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . O receptor GPIIb-IIIa é o mais abundante na superfície das plaquetas. Ele se liga ao

fibrinogênio, que serve de ponte, apenas quando as plaquetas sofrem alteração conformacional. Por outro lado, o vWF ligado à matriz subendotelial pode se ligar à porção extracelular do complexo GPIIb-IIIa e ativá-la. A porção citosólica (ou citoplasmática) do complexo GPIIb-IIIa então ativado, se liga ao citoesqueleto plaquetário e a dispersão das plaquetas e retração do coágulo (LEUNG, 2012).



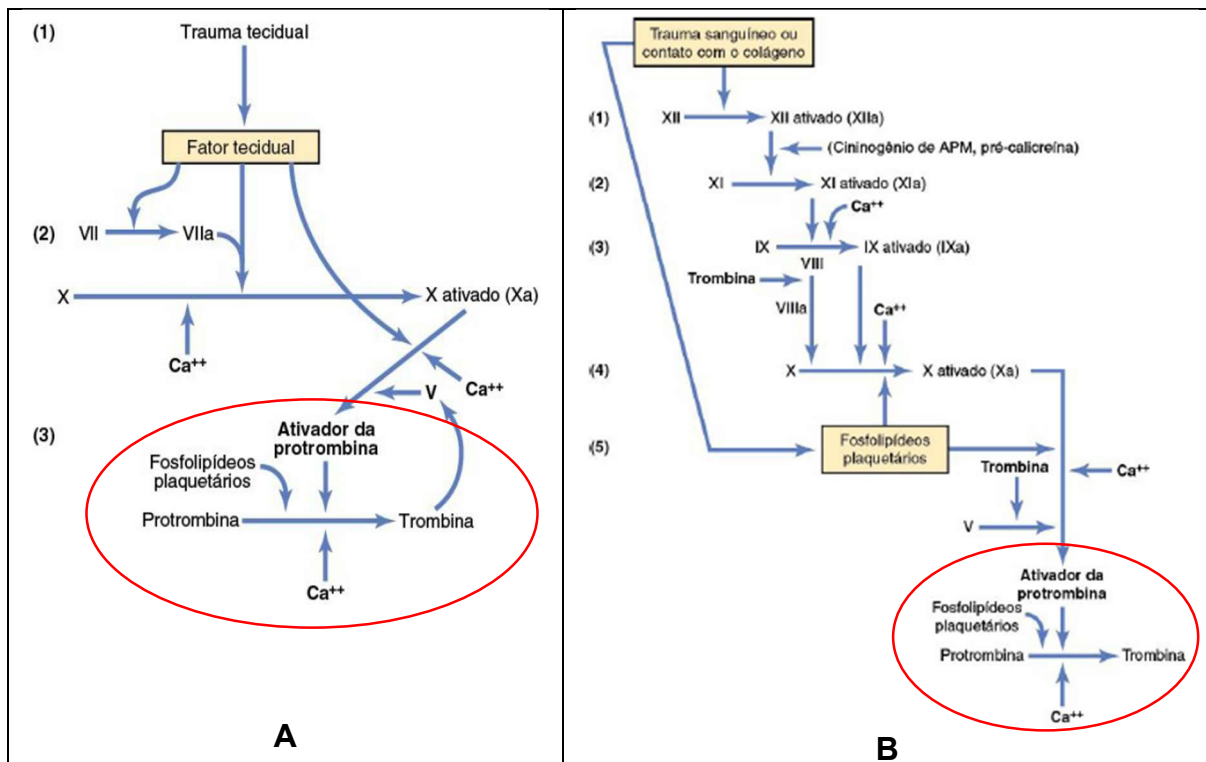
**Figura 6:** Mudança morfológica das plaquetas.

ADP = difosfato de adenosina; GP = glicoproteína; PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas; TSP = trombospondina; vWF = fator de Von Willebrand (Fonte: LEUNG, 2012).

Desintegrina é uma família, onde grande parte das proteínas, apresentam o motivo RGD (arginina – glicina – ácido aspártico) capazes de se ligar às integrinas das plaquetas e são encontradas em várias espécies de carrapatos. Este tripeptídeo RGD compete com a ligação do fibrinogênio ao receptor plaquetário  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , evitando assim a formação a agregação plaquetária (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2012; JMEL *et al.*, 2023). Alguns exemplos dessas proteínas são: variabilina da espécie *Dermacentor variabilis* (WANG *et al.*, 1996), savignigrina da espécie *Ornithodoros savignyi* (Mans *et al.*, 2002), monogrina da espécie *Argas monolakensis* (MANS *et al.*, 2008), disagregina da espécie *Ornithodoros moubata* (KARCZEWSKI *et al.*, 1994; KARCZEWSKI E CONNOLLY, 1997) e ixodegrina da espécie *Ixodes scapularis* (FRANCISCHETTI *et al.*, 2005; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; CHMELAR *et al.*, 2012).

### 2.2.3 Coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é uma cascata de reações interligadas com vários mecanismos e regulação (figura 7). Para uma melhor compreensão, a coagulação é dividida em duas vias, a intrínseca e a extrínseca que chegam a uma via comum. Porém, as duas vias irão ocorrer de forma simultânea e vão ser desencadeadas com a ocorrência de trauma ou lesão (BATISTA *et al.*, 2010; GUYTON & HALL, 2017; JMEL *et al.*, 2023).



**Figura 7:** Vias da Coagulação Sanguínea  
**A:**Via Extrínseca e **B:** Via Intrínseca (GUYTON & HALL, 2017).

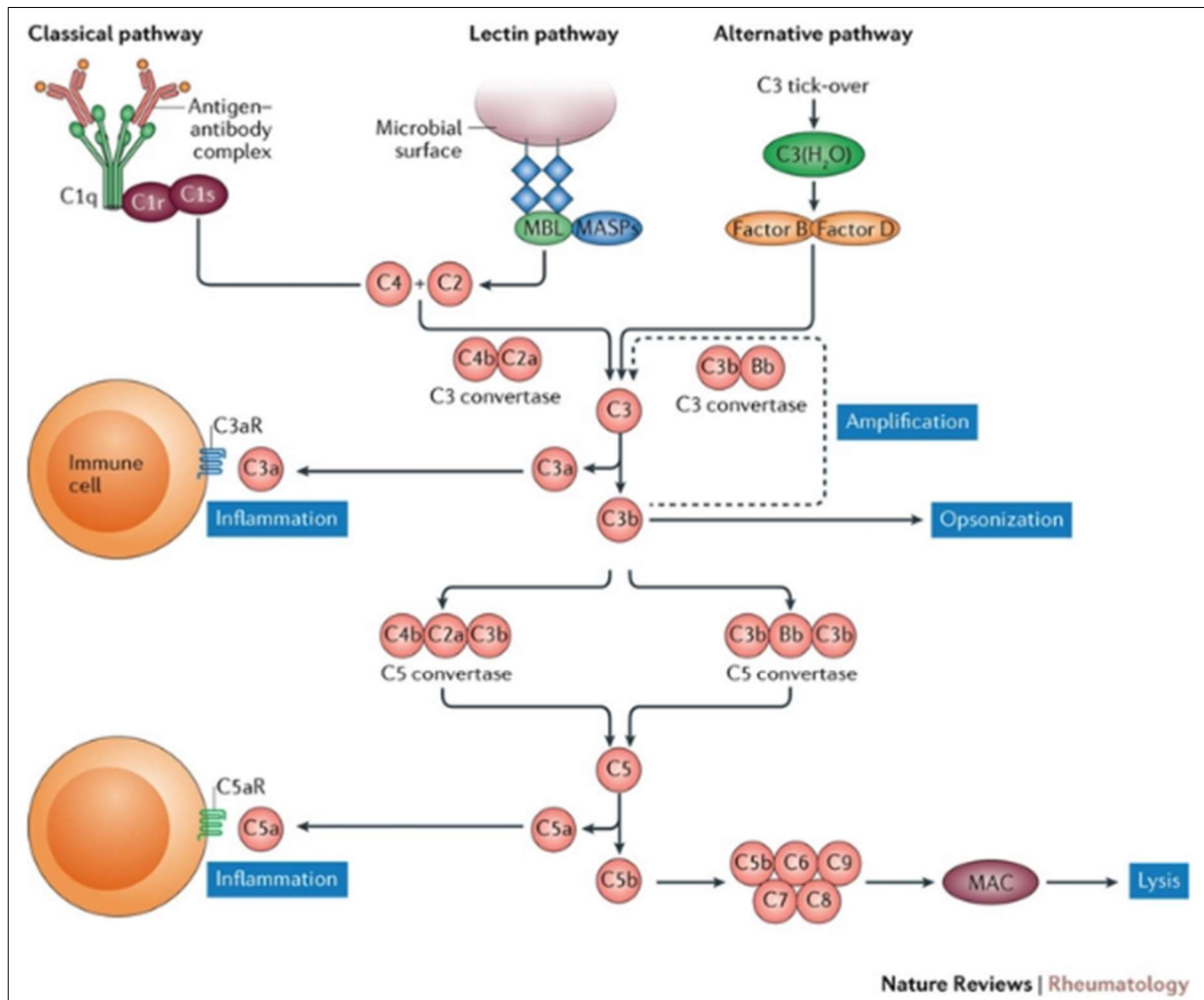
Na via extrínseca, com a lesão na parede do vaso ou dos tecidos próximos, o sangue é exposto e o fator VII é ativado, formando o Fator VIIa. O complexo lipoproteico liberado pelos tecidos (Fator tecidual - TF) se combina com o Fator VIIa. O complexo (TF:VIIa), em presença de íons cálcio e zimogênios, atua sobre o Fator X, para catalisar a formação da protease Fator Xa. Nesse trecho inicia a via comum que está circulada em vermelho nas duas figuras acima. O Fator Xa, na presença do Fator V e íons cálcio, catalisa a conversão de protrombina em trombina. Assim, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina. Na via intrínseca quando o trauma atinge as próprias células sanguíneas ou quando o sangue entra em contato com o colágeno, ocorre a ativação do Fator XII. O Fator XIIa realiza a ativação do Fator XI,

que junto com o cálcio causa a ativação do Fator IX. O Fator IXa termina se unindo ao Fator VIII e juntos ativam fatores plaquetários e o Fator X. Aqui, inicia a via comum, circulada de vermelho, onde o Fator Xa, na presença do Fator V e íons cálcio, catalisa a conversão de protrombina em trombina. Assim, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina (BATISTA *et al.*, 2010; GUYTON & HALL, 2017; JMEL *et al.*, 2023).

O fator Xa e a trombina que participam da via comum, são enzimas importantes que afetam as vias de coagulação, devido a isso frequentemente esses inibidores de serinoproteases são encontrados em animais hematófagos (DAVIE *et al.*, 1991). Um anticoagulante encontrado em 1990 em um extrato de corpo inteiro do carrapato *Ornithodoros moubata*, o peptídeo TAP (tick anticoagulante peptide) mostrou alta especificidade para o Fator X (FX) e homologia com inibidores do tipo Kunitz (WAXMAN, *et al.*, 1990). Em outro estudo, *A. cajennense*, apresenta uma proteína chamada Amblyomin-X, com domínio Kunitz que inibe o FXa, impedindo a cascata de coagulação (BRANCO *et al.*, 2016).

#### 2.2.4 Resposta ao sistema complemento

Vários sistemas do organismo são gerados por efeito cascata, um deles é a cascata de coagulação já mostrado anteriormente. O sistema complemento também possui uma cascata de reações enzimáticas, figura 8, que são desencadeadas por mais de 30 proteínas plasmáticas diferentes reagindo entre si com a função de reconhecimento, opsonização ou lise de elementos estranhos como patógenos ou células apoptóticas do próprio hospedeiro, induzindo uma série de respostas inflamatórias que ajudam a combater infecções (DUNKELBERGER e SONG, 2010; JANEWAY Jr *et al.*, 2001; SIM e LAICH, 2000; SIM e DODDS, 1997). Logo, este sistema participa de vários processos biológicos: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos, vasoconstrição, contração da musculatura lisa, liberação de histamina dos mastócitos e basófilos e de espécies ativas de oxigênio pelos leucócitos, vasoconstrição, aumento da permeabilidade dos vasos, agregação plaquetária e citólise (ITURRY-YAMAMOTO & PORTINHO, 2001).



**Figura 8:** Vias do sistema complemento.

Este sistema apresenta três vias de ativação que dependem de diferentes moléculas para sua iniciação: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa. A maioria de seus componentes são nomeados com a letra C seguido de um número. Já na via alternativa temos a nomeação por fator seguido de uma letra (JANEWAY Jr *et al.*, 2001).

Diversos inibidores produzidos por carrapatos já foram identificados e caracterizados. *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus*, vetores importantes de *Borrelia burgdorferi*, produzem inibidores salivares pertencentes à família Isac, atuantes sobre a via alternativa do sistema complemento (VALENZUELA *et al.*, 2000; DAIX *et al.*, 2007; TYSON *et al.*, 2008). Estudos com o extrato de glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* demonstraram possuir atividade anticomplemento, inibindo a via clássica deste sistema (FRANCO *et al.*, 2016). E em 2021, o mesmo grupo de pesquisa, encontrou sequências de três proteínas salivares de *A. sculptum* que inibiu a hemólise das vias clássica e alternativa do sistema complemento. Das três proteínas uma tem domínio inibidor de tripsina pancreática bovina, chamada AsKunitz e as outras duas são pertencentes às famílias de 8,9kDa e cauda básica, chamadas As8,9kDa e AsBasicTail (COSTA *et al.*, 2021).

### 2.3 TÉCNICAS COMBINADAS

Em 2016, houve a publicação do primeiro genoma nuclear sequenciado e montado de 2,1 Gbp, do carrapato *Ixodes scapularis* (GULIA-NUSS *et al.*, 2016). Por ter um grande tamanho e muitas repetições do genoma, este projeto mostrou ser desafiador. Porém, como a única montagem disponível para um carrapato, o genoma deste ácaro com várias características interessantes, se tornou uma referência para análises genômicas comparativas (DE LA FUENTE *et al.*, 2016).

Em um trabalho dos colegas do nosso laboratório, foi realizado o sequenciamento do mitogenoma de *Amblyomma sculptum*, fornecendo informações importantes para a compreensão das relações evolutivas entre espécies do complexo *A. cajennense*. A análise comparativa de seis espécies de referência do gênero *Amblyomma* revelou a presença de um gene, relacionado ao metabolismo energético, que pode ser explorado como marcador molecular para diferenciar espécies do gênero *Amblyomma cajennense* (DE LIMA *et al.*, 2017).

Por cada vacina produzida e comercializada, existem trabalhos científicos de compostos presentes nos carrapatos desempenhando importantes funções biológicas com proteínas salivares e intestinais especificamente desenvolvidas para se adaptarem à hematofagia (DE LA FUENTE E MERINO, 2013; SIMO *et al.*, 2017; AOUNALLAH *et al.*, 2020). Vários trabalhos com “ômicas” ligadas a tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS) e refinamento dos dados com ferramentas de bioinformática são usadas para explorar as proteínas das glândulas salivares/saliva e intestino médio de várias espécies de carrapatos, obtendo sialomas e mialomas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2015; LEWIS *et al.*, 2015; BARROS, 2016; MOREIRA *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2020; AOUNALLAH *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2020; COTES-PERDOMO *et al.*, 2023). Em *A. sculptum*, os estudos dos sialoproteoma e sialotranscriptoma (BATISTA *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2014; ESTEVES *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2017) favoreceram um melhor entendimento das relações evolutivas e filogenéticas para muitos grupos de organismos incluindo nossa espécie de estudo (METZKER, 2010; MARDIS, 2011, SMITH, 2015).

As moléculas produzidas pelas glândulas salivares de *A. sculptum* foram descritas ao longo dos anos, por diferentes transcriptomas. Em ESTEVES *et al.*, 2017 foi comparado o sialotranscriptoma dessa espécie não alimentada e alimentada por 72h em coelhos. Já, em outro estudo, foi realizado sialotranscriptoma comparativo de

três espécies *Amblyomma triste*, *A. cajennense* e *A. parvum* alimentados (GARCIA et al., 2014). Mesmo com todas as informações geradas por estes trabalhos, não são muitas as caracterizações funcionais das proteínas em *A. sculptum*.

O estudo realizado por COSTA *et al.*, 2021, caracterizou funcionalmente três proteínas salivares de *A. sculptum*: AsKunitz, As8,9kDa e AsBasicTail. As As8,9kDa e AsBasicTail inibiram a atividade enzimática do FXa, trombina e tripsina, enquanto rAsKunitz inibiu apenas a trombina. Elas também são inibidoras da via clássica do sistema complemento, e foram avaliadas quanto a antígenos vacinais. O alvo deste estudo, *A. sculptum*, apresenta também uma proteína, Amblyomin-X, com domínio Kunitz que inibe o fator Xa, impedindo a cascata de coagulação. (MARIA *et al.*, 2019).

Alguns dos papéis biológicos da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* em células cancerígenas foram elucidados no estudo de SIMONS, *et al.*, 2011: a inibição do Fator Xa e da trombina; ação na agregação plaquetária; e efeitos citotóxicos preliminares em linhagens de células tumorais. A saliva bruta foi capaz de induzir a morte celular em linhagens dessas células cancerígenas. Existem outros trabalhos com saliva de *A. sculptum* em células tumorais como em SOUZA *et al.*, 2018.

O trabalho desenvolvido por BATISTA *et al.*, 2008, caracterizou o transcriptoma da glândula salivar de *A. cajennense* adulto. A biblioteca de cDNA, revelou principalmente transcritos relacionados a processos hemostáticos, especialmente proteases e seus inibidores direcionados a coagulação sanguínea. Foram encontrados cinco tipos de possíveis inibidores de serina protease e outros componentes que podem atuar sobre o sistema imunológico do hospedeiro ou atuar como defensas (contra microrganismos infectantes).

O objetivo deste estudo é determinar e analisar as funções das proteínas salivares de *A. sculptum*, geradas pelo trabalho de sequenciamento do genoma por BRAGA, 2019, aluno do nosso grupo de pesquisa. BRAGA sequenciou o genoma a partir de um DNA extraído e liofilizado que foi enviado para a empresa GenOne Biotechnologies. Após a preparação de uma biblioteca na plataforma Illumina NovaSeq, as sequências foram analisadas no software FastQC e processadas nos softwares Trimmomatic e AfterQC para remover sequências de adaptadores e regiões sequenciadas com baixa acurácia. Em seguida, o genoma foi montado no software CLC Genomics Workbench. Os relatórios descritivos foram obtidos usando o software

Assembly Stats. A montagem selecionada foi submetida a pesquisas de similaridade e comparada com as sequências do banco de dados Nucleotide (nt), para identificar possíveis contaminantes e retirá-los. Após esse processamento, a montagem correspondeu a um total de 529.781 sequências, com um tamanho total de 1,35 Gb e um valor de N50 de 2645nt. Esses dados correspondem ao primeiro *Draft* genoma de *Amblyomma sculptum* sequenciado. A montagem foi submetida a análises de elementos transponíveis, sequências repetitivas, predição e anotação dos genes. Os resultados foram comparados com os genomas depositados no GenBank das espécies, *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus microplus*, apresentando muitas semelhanças e comprovando coerência na montagem. Estas espécies foram escolhidas devido seu tamanho. Como a espécie *Ixodes scapularis* apresenta 2,10 Gb (ULLMANN *et al.*, 2003) e o *Rhipicephalus microplus* tem 1,95 Gb (CANESTRINI.,1888). Acreditava-se que o genoma do *A. sculptum* possua um tamanho próximo ao dos carrapatos já sequenciados, o que é um genoma relativamente grande para um artrópode (PALMER& BLACK., 1997).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificação de proteínas da glândula salivar e saliva com ação anti-hemostática do *A. sculptum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Busca de moléculas com função anti-hemostática já estudadas em várias espécies de carrapatos.
- Realizar um alinhamento do genoma (BRAGA, 2019) contra as moléculas já estudadas de outros carrapatos presentes nos Bancos de Dados.
- Realizar um alinhamento comparativo.
- Caracterização das moléculas encontradas quanto à sua função.
- Análise filogenética.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Iniciou-se buscando proteínas da glândula salivar e saliva de várias espécies de carrapatos, com função anti-hemostática, já conhecidas e estudadas nos bancos de dados NCBI e UNIPROT. Foram compiladas informações, em uma planilha Excel® (Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA), de cada proteína: nome da proteína, espécie de carrapato, referência, código de acesso e uma pasta com o arquivo FASTA. Em seguida, foi realizado um primeiro alinhamento, deste arquivo FASTA contra os dados de proteoma. Estes dados do proteoma foram obtidos do sequenciamento do *Amblyomma Sculptum* feito por BRAGA, 2019. (ŠIMO, 2017; CHRISTINE, 2007). Para este passo, a ferramenta foi o BLASTp do software Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). Os parâmetros foram e-value < 10e-5; Identidade > 30% e Cobertura > 70%. Como resumido na figura 9.

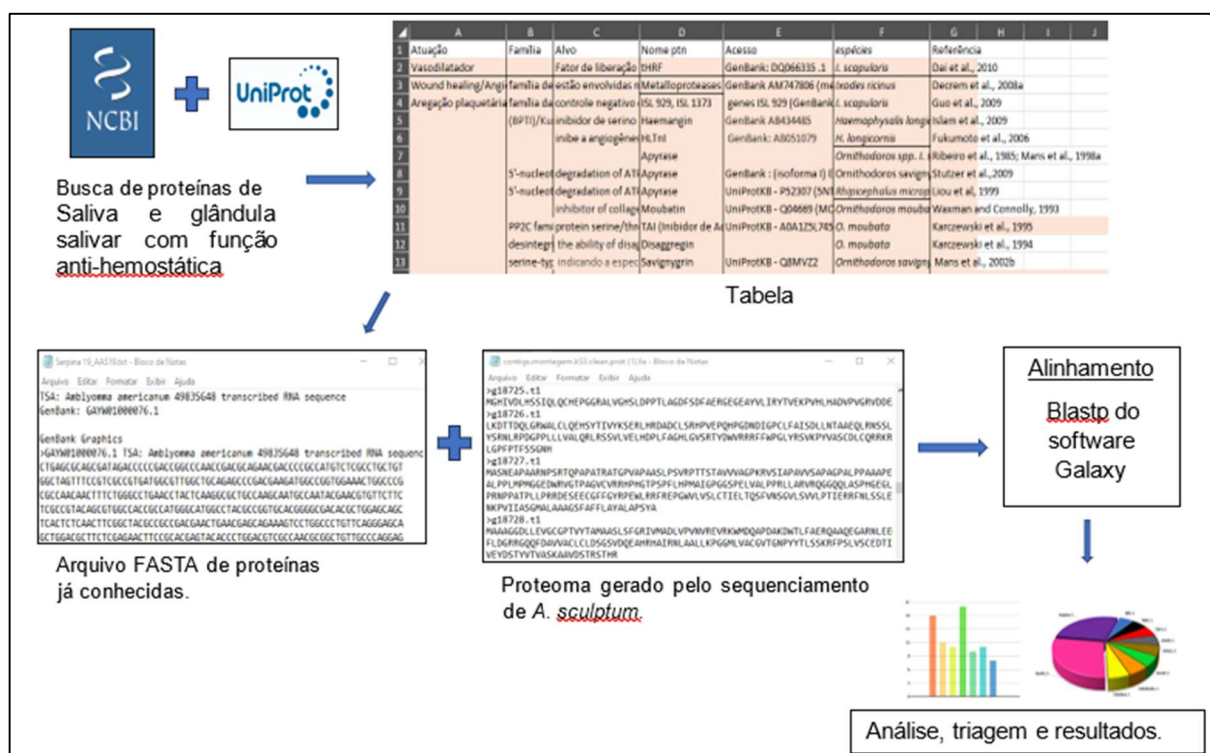


Figura 9: Fluxograma do primeiro alinhamento para a identificação das proteínas.

### 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES

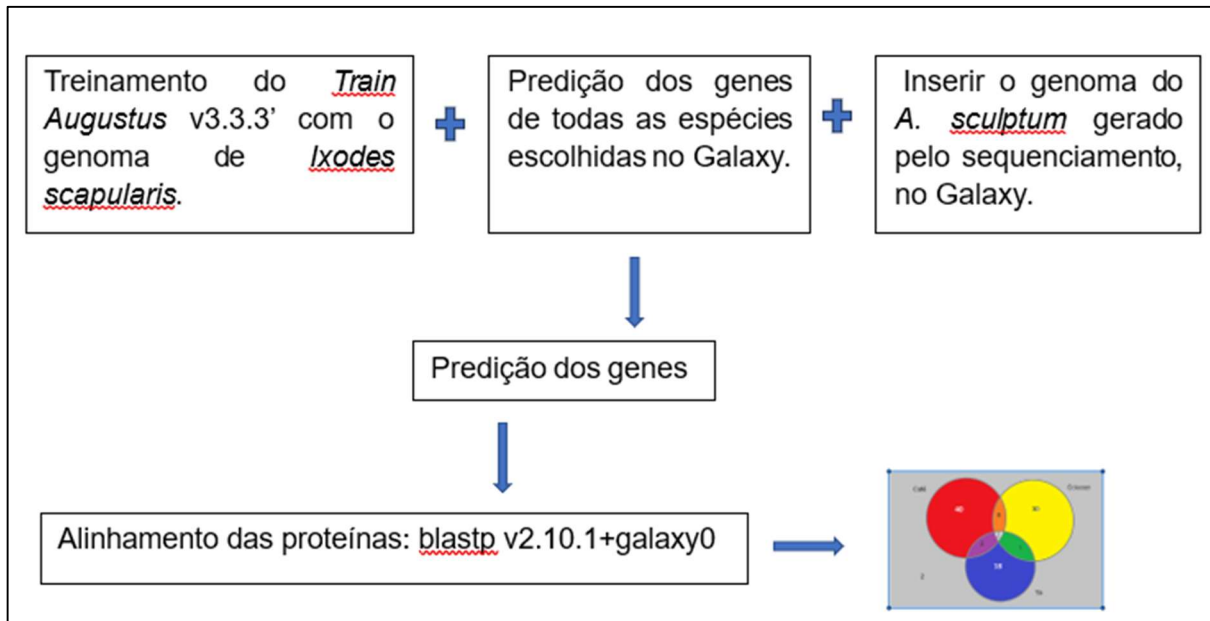
O software “Galaxy/eu” além de suas múltiplas funções, permite a manipulação de arquivos genômicos para diferentes finalidades. Aqui, foi utilizado para alinhar os genomas das diferentes espécies com os melhores dados depositados no NCBI de

cada uma delas. Inicialmente, a ferramenta ‘*Train Augustus v3.3.3*’ foi treinada (STANKE & WAACK, 2003) no software Galaxy/EU (AFGAN *et al.*, 2018), com a anotação de *Ixodes scapularis*, por ser a melhor notação, obtida no Refseq de acesso GCF\_016920785.1 (O’LEARY *et al.*, 2016). Com este modelo de treinamento finalizado, iniciou a predição de genes com o Augustus v3.3.3 e os genomas da tabela 1, no Galaxy. Os parâmetros escolhidos foram: “--strand=both --noInFrameStop=false --gff3=on --uniqueGenelD=true --protein=on --codingseq=off --introns=off --stop=off --stop=off --cds=on --singlestrand=true --UTR=off --genemodel=complete”.

Espécie	Acesso Refseq
<i>Hyalomma asiaticum</i>	GCA_013339685.1
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	GCA_013339765.1
<i>Ixodes ricinus</i>	GCA_000973045.2
<i>Rhipicephalus annulatus</i>	GCA_013436015.1
<i>Ornithodoros moubata</i>	GCA_905119575.1
<i>Ixodes scapularis</i>	GCF_016920785.1
<i>Ixodes persulcatus</i>	GCA_013358835.1
<i>Rhipicephalus microplus</i>	GCF_013339725.1
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	GCF_013339695.1
<i>Amblyomma sculptum</i>	Arquivo do sequenciamento (BRAGA, 2019)

**Tabela 3:** Espécies e acessos correspondentes do NCBI, escolhidos para a etapa de alinhamento.

Em seguida, alinhamos as proteínas de interesse nos proteomas preditos com o blastp v2.10.1+galaxy0 (CAMACHO *et al.*, 2009) com os parâmetros ‘*evaluate 10e-5*’. Por último, extraímos uma tabela com os hits de identidade > 30% e de cobertura > 70%, filtrados do output do blastp com um script em python3. A tabela obtida foi filtrada e reorganizada, com um script em R plotamos o gráfico no UpSet (<https://upset.app/>). Esquemáticamente mostramos estes passos na figura 10.



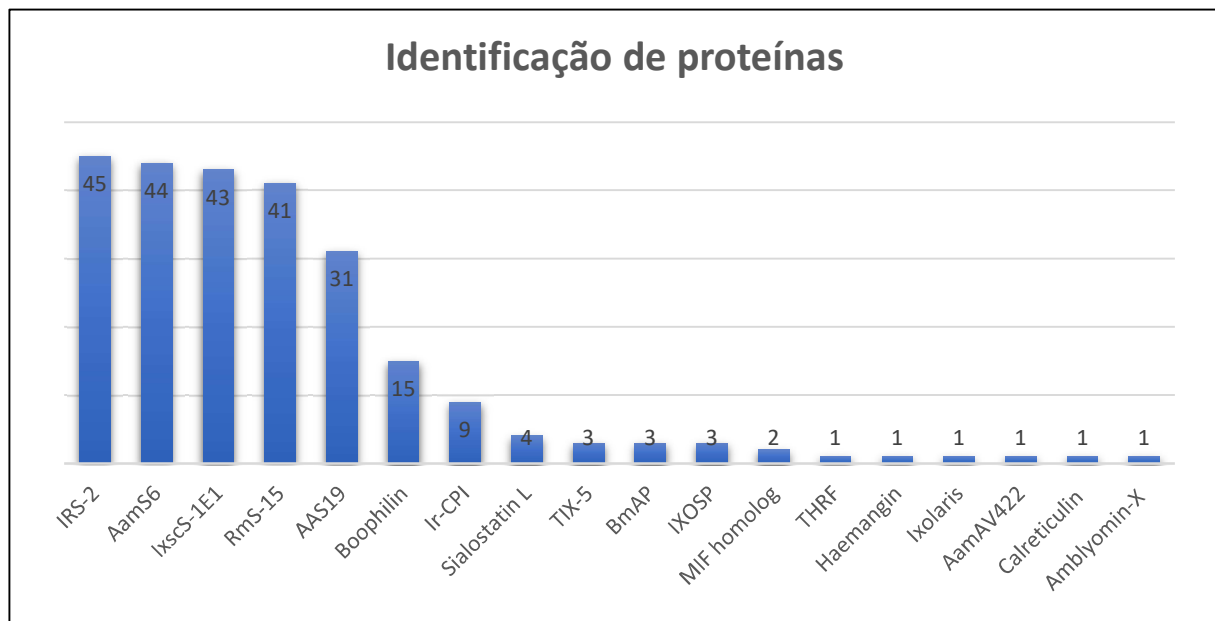
**Figura 10:** Fluxograma da metodologia de comparação de proteínas entre espécies.

A análise filogenética é muitas vezes utilizada para inferir as relações entre sequências. Com este objetivo, a ferramenta do software Mega 11 (versão 11.0.11 de 2022) uniu as sequências depositadas no banco de dados e as sequências do nosso organismo *Amblyomma sculptum*. O primeiro passo foi alinhar as sequências com parâmetros default do clustalW. Em seguida, a árvore filogenética foi construída com os parâmetros: Statistical Method, Maximum Likelihood; Phylogeny, Bootstrap method; Bootstrap Replications, 1000; Substitutions Type, Amino acid; Model/Method, JTT model; Rates among Sites, Uniform Rates; Gaps, Partion deletion; Site Coverage Cutoff, 90%; ML Heuristic Method, NNI; Initial Tree for ML, Make initial automatically (Default – NJ/BioNJ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PROTEÍNAS

Como resultado do primeiro alinhamento foram encontrados no proteoma do *Amblyomma sculptum* as proteínas do gráfico 1. Nela, está a quantidade de genes diferentes que identificou cada proteína. As cinco primeiras proteínas foram aquelas que apresentaram maior número de sequências semelhantes e todas são da família das serpinas.

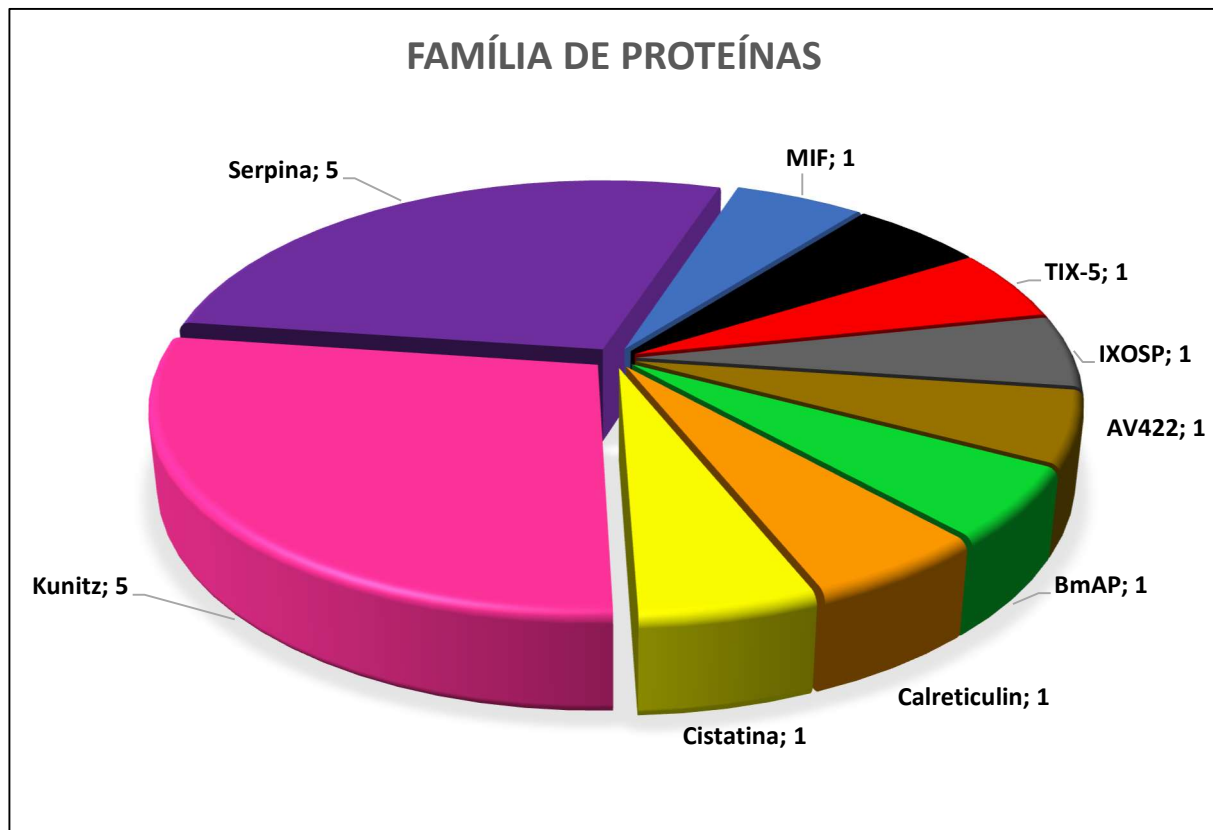


**Gráfico 1:** Identificação de Proteínas.

Gráfico da quantidade de genes diferentes para cada proteína identificada.

Com o agrupamento destas proteínas em famílias obteve-se o gráfico 2. Cada proteína está com o código do Genbank e suas famílias, quando houver. São elas: IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin-2 / DQ915843.2), AamS6 (*Amblyomma americanum* serpin-6 / EU072731.1), IxscS-1E1 (*Ixodes scapularis* serpin / KF990169.1), RmS-15 (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* serpin-15 / KP872681.1) e AAS19 (*Amblyomma americanum* serpin-19 / GAYW01000076) todas da família das serpinas e apresentaram maior quantidade de genes diferentes nesse alinhamento. Cinco das proteínas são família Kunitz: Boophilin (AJ304446), Ir-CPI (*Ixodes ricinus* contact phase inhibitor / AJ269641), Haemangin (AB434485), Ixolaris (AAK83022.1) e Amblyomin-X (*Amblyomma* Factor Xa in inhibitor / AY563168.1). A proteína sialostatin L (AAM93646.1) é da família das Cistatinas. A proteína MIF homolog (Macrophage Migration Inhibitory Factor / AF126688) é da família das MIF's. A

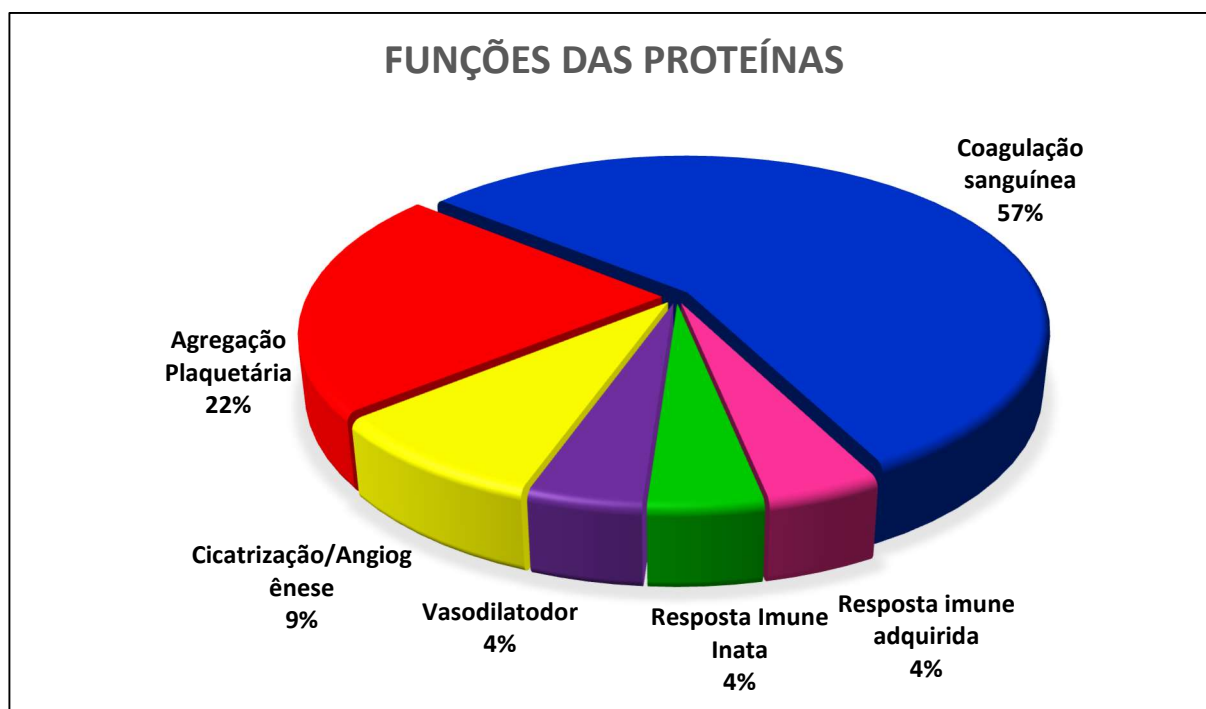
calreticulin (AAC79094.1) é da família das calreticulinas. O restante, BmAp (*Boophilus microplus* Anticoagulant Protein / FJ655904.1), IXOSP (*Ixodes scapularis* salivary serine protease / AAY66740.1), TIX-5 (AEE89467.1), THRF (DQ066335.1), AamAV422 (KC222016.1) não apresentaram uma classificação de família. Portanto, mantivemos seu próprio nome.



**Gráfico 2:** Famílias de proteínas encontradas no proteoma do *A. sculptum*. Cinco proteínas da família das serpinas, 5 proteínas da família Kunitz, 2 proteínas da família calreticulina, 1 proteína da família das Cistatinas, 1 proteína da família BmAP, 1 proteína MIF semelhante da família das citocinas, 1 proteína TIX-5, 1 proteína da família da THRF.

## 5.2 PREVISÃO DAS FUNÇÕES

Analisando as funções com as proteínas encontradas, temos que 57% delas atuam na coagulação sanguínea: AamS6, IxscS-1E1, RmS-15, AAS19, Boophilin, Ir-CPI, TIX-5, Ixolaris, BmAP, IXOSP, AamAV422, Calreticulin, Amblyomin-X. Atuando na agregação plaquetária são 22%: IRS-2, AamS6, IxscS-1E1, AAS19, Boophilin. Em Cicatrização/Angiogênese temos 9% com: Haemangin e IRS-2. A proteína da família MIF, age na resposta imune inata. A proteína Sialostatin L da família da cistatina atua na resposta imune adquirida. A proteína THRF age como vasodilatador. Assim, o gráfico 3 apresenta a relação da porcentagem de proteínas com mesmas funções.



**Gráfico 3:** Porcentagem de proteínas com mesma função.

78% das proteínas têm a função de coagulação sanguínea, 6% são vasodilatadores, 6% são da resposta imune inata, 5% da resposta imune adquirida e 5% são proteínas com função de cicatrização/ angiogênese.

### 5.3 COMPARATIVO

A representação da comparação das proteínas presentes em cada espécie pode ser vista no gráfico 4, realizado em <https://upset.app/>. Cada barra laranja no canto inferior esquerdo, corresponde a quantidade de proteínas presentes em uma mesma espécie. Por exemplo, a espécie *Hyalomma asiaticum* apresenta maior número de proteínas e a espécie *Ixodes ricinus* tem menor número. As colunas azuis na parte superior mostram a quantidade de proteínas comuns entre as espécies - interseção. Cada bolinha verde representa a presença de proteína. Portanto, a maior coluna representa um conjunto de 10 proteínas diferentes, que são comuns em todas as 9 espécies. Uma bolinha verde isolada representa uma proteína que só está naquela espécie como em *Ixodes persulcatus*.

As cinco últimas espécies (*Hyalomma asiaticum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus annulatus* e *Haemaphysalis longicornis*) estão bem relacionadas entre si, pois possuem muitas proteínas em comum. Todas as proteínas presentes no *Amblyomma sculptum* aparecem também em outras espécies. Nenhuma proteína aparece apenas no *Amblyomma*. As 10 proteínas comuns na maior interseção são: AamS6, 2 calreticulins, Ir-CPI, IRS-2, IxscS-1E1, RmS-15, Serpin19, SialostatinL/L2 e TCTP/THRF.

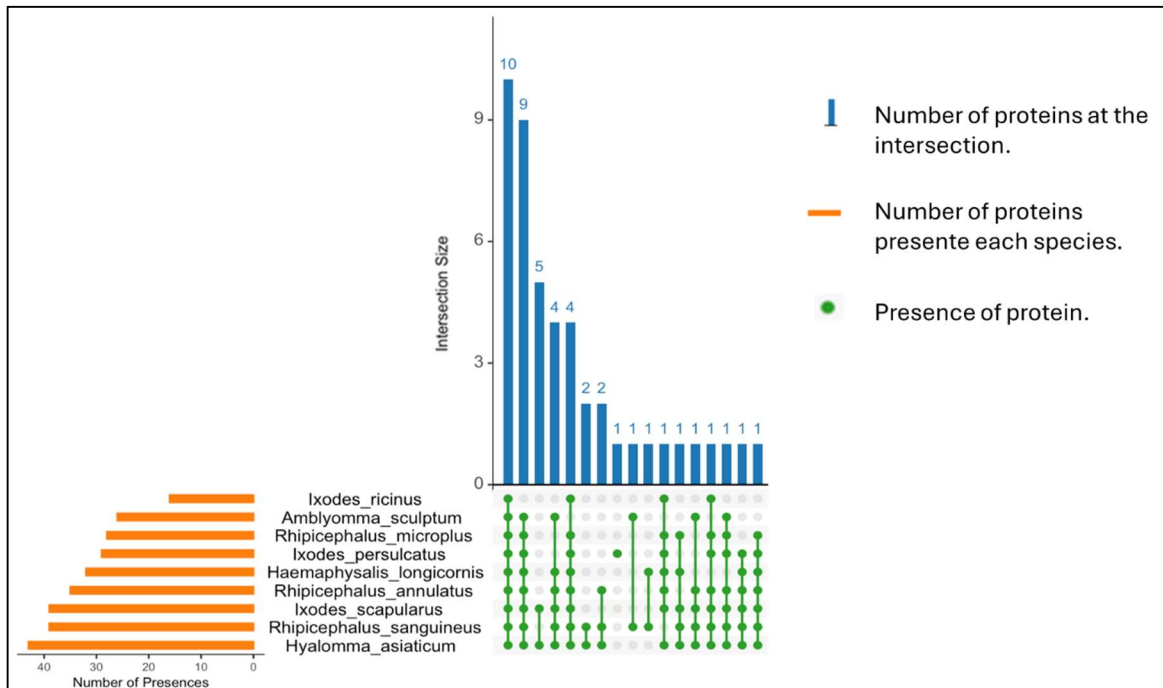


Gráfico 4: Diagrama de proteínas comuns em cada espécie.

#### 5.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA

A seguir na figura 11, está a árvore filogenética que corresponde às proteínas anticoagulantes. Nela, cada espécie está representada de uma cor diferente nos cladogramas (como mostra a legenda). Em cada clado, foi mostrado apenas o nome das proteínas preditas do *Amblyomma sculptum* (em vermelho).

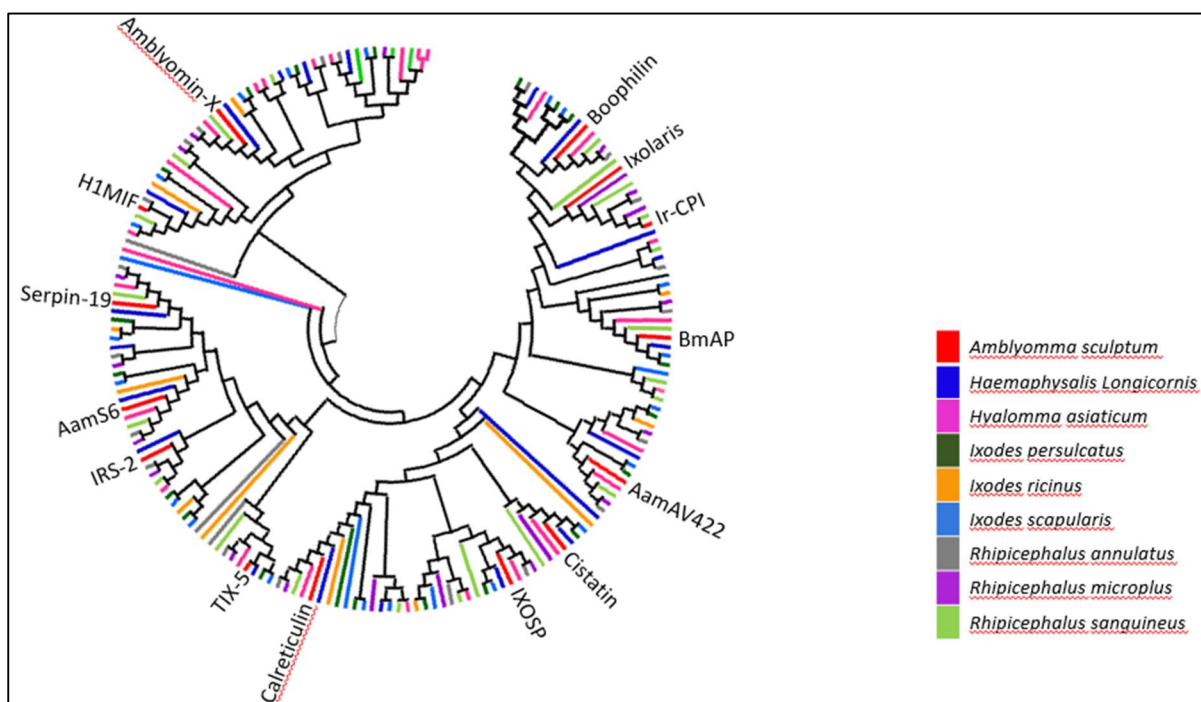


Figura 11: Árvore filogenética de proteínas, com função anticoagulante, preditas em *A. sculptum*.

## 6. DISCUSSÃO

Muitas são as proteínas encontradas nas salivas e nas glândulas salivares de várias espécies de carrapatos (CHMELAR *et al.*, 2012; SIMO *et al.*, 2017; AOUNALLAH *et al.*, 2020). Estas moléculas são necessárias para burlar o sistema imunológico do hospedeiro e permitir a permanência do carrapato se alimentando por dias de bolsões de sangue geradas pelas feridas causadas pelas peças bucais destes parasitas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2005; KAZIMIROVÁ *et al.*, 2013; ARCÁ *et al.*, 2018; JMEL *et al.*, 2023). As proteínas descritas a partir de agora, foram aquelas encontradas em *Amblyomma sculptum* após o primeiro alinhamento.

As serpinas compõem a maior superfamília com capacidade de inibir serino proteases e estão envolvidas na regulação de muitos processos fisiológicos importantes, incluindo agregação plaquetária, coagulação sanguínea, cascata do complemento, fibrinólise, angiogênese, inflamação e remodelação tecidual (MKAOUAR *et al.*, 2019; MULENGA, *et al.*, 2007). Elas são moléculas com tamanho molecular de 40 a 60 kDa (KELLY-ROBINSON *et al.*, 2021). Sua estrutura terciária consiste em três folhas  $\beta$  (A, B, C), oito a nove hélices  $\alpha$  e uma alça central reativa (RCL - Reactive Center Loop) de aproximadamente 17 resíduos e está localizado entre a folha  $\beta$ A e a folha  $\beta$ C (DUNSTONE & WHISSTOCK, 2011; HUNTINGTON *et al.*, 2011; VAN GENT *et al.*, 2003). O processo de inibição da serpina é irreversível e leva ao “suicídio” do substrato, ou seja, inativação da serpina e da protease alvo (HUNTINGTON *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2011). No início ocorre o reconhecimento pela protease do resíduo na posição P1 do RCL, depois a formação de um complexo entre a protease e a serpina. Em seguida, o RCL é clivado, insere-se no centro da folha  $\beta$ A formando uma cadeia extra, e a protease ligada covalentemente é translocada para a extremidade oposta da molécula da serpina (KHAN *et al.*, 2011; MARIJANOVIC *et al.*, 2019; KELLY-ROBINSON *et al.*, 2021). Originalmente as serpinas são inibidoras de serino proteases. Porém, as serpinas com inibidores de classe cruzada funcionam contra serina e cisteína proteases (MULENGA *et al.*, 2013b) e podem ser chamadas de ‘inibidores de captura’ porque formam complexos e destroem sua protease alvo (GETTINS, 2002). Nos inibidores de classe cruzada o aa da posição P1 é normalmente uma ‘Ser’ ou um aa neutro, que gera um comportamento diferente de inibição (MULENGA *et al.*, 2013b). O resultado disso é

uma redução da atividade enzimática das proteases de maneira dependente da dose (SCHECHTER & PLOTNICK, 2004).

A serpina IRS-2 tem 397 aminoácidos (aa) e 44,478 kDa (UniProt Q06B74) (KOVÁROVÁ *et al.*, 2010). Em um modelo de inflamação em camundongos, mostrou esta proteína inibindo duas serino proteases, a catepsina G e a quimase, e em excesso molar, a trombina (CHMELAR *et al.*, 2011). A trombina é um dos ativadores mais fortes da agregação plaquetária, junto com o colágeno e o ADP (LEUNG, 2012). A catepsina G é produzida pelos neutrófilos ativados, onde é armazenada em grânulos e está envolvida na sinalização celular da inflamação e na ativação plaquetária que leva à sua agregação e formação de coágulos (ZARBOCK *et al.*, 2007). A quimase é produzida quase exclusivamente por mastócitos nas mucosas e nos tecidos conjuntivos e processa várias substâncias pró-inflamatórias (SCHIEMANN *et al.*, 2006). Portanto, IRS-2 bloqueia a agregação plaquetária induzida pela catepsina G e pela trombina e tem dupla ação tanto na inflamação quanto na cicatrização de feridas (figura 10) (CHMELAR *et al.*, 2011).

AamS6 tem 396 aa, tamanho (rAamS6) de aproximadamente 42 kDa (CHALAIRE *et al.*, 2011) e foi chamada inicialmente de “Lospin 6” da espécie *Amblyomma americanum* (MULENGA, *et al.*, 2007). Agora, esta serpina foi identificada no *Amblyomma sculptum*. Ela é um inibidor de classe cruzada de proteases de serina e cisteína. Em um experimento a AamS6 diminuiu o tempo de coagulação e reduziu a agregação plaquetária. A rAamS6 reduziu a velocidade de reação das proteases tripsina, quimiotripsina, elastase, papaína e quimase (MULENGA *et al.*, 2013b). Além da catepsina G e a quimase, estudos demonstram que a elastase também é mediador da inflamação em locais com lesão (KORKMAZ *et al.*, 2008; HEUTINCK *et al.*, 2010; KESSENBROCK *et al.*, 2011). Proteases de cisteína, que tem a cisteína na posição do sítio catalítico, semelhantes à papaína estão associadas a mediadores celulares de inflamação, macrófagos e neutrófilos (JEVNIKAR *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012; VENDRAMINI-COSTA & CARVALHO, 2012).

IxscS-1E1 é uma serpina de 392 aa, aproximadamente 45 kDa (IxscS-1E1 recombinante). A serpina salivar do carrapato de *Ixodes scapularis* (IxscS-1E1) foi caracterizada inibindo trombina, tripsina, catepsina G e fator Xa. IxscS-1E1 preveniu

a agregação plaquetária e atrasou a coagulação plasmática de maneira responsiva à dose (IBELLI, *et al.*, 2014).

A proteína AAS-19 de 420 aa. Esta serpina é expressa na maioria dos tecidos deste carrapato, sendo inibidor de atividade enzimática de tripsina, plasmina. Esta serpina também inibiu a agregação plaquetária induzida pela trombina, inibindo a coagulação através de cinco dos oito fatores desta cascata: FXa e FXIa, fortemente, FIIa (trombina), FIXa e FXIIa, moderadamente (KIM *et al.*, 2015).

RmS-15 com 403 aa, foi encontrada no carrapato microplus (TIRLONI *et al.*, 2014). Esta proteína foi caracterizada como uma proteína anti-hemostática e com ensaios enzimáticos inibitórios de trombina (RODRIGUEZ-VALLE *et al.*, 2015). Houve atraso da coagulação sanguínea de forma dependente da dose (XU *et al.*, 2016).

As proteínas Kunitz, assim como as serpinas, são muito abundantes na saliva dos carrapatos e, em geral, inibem serino proteases semelhantes à tripsina (RANASINGHE & MCMANUS, 2013). Os compostos desta superfamília, tem pelo menos um domínio característico com  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  antiparalelas compactadas por três ligações dissulfeto (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002). Este domínio pode se repetir várias vezes, podendo ter único motivo, chamado monolaris, ou motivo duplo chamado bilaris, ou até com cinco motivos, chamado de penthalaris, que já foram encontrados na saliva de carrapatos (RIBEIRO *et al.*, 2006). Essas proteínas são moléculas pequenas de 18 a 24 kDa de peso molecular. Um único domínio Kunitz com 60 aa pesa cerca de 7 kDa e tem 2 cadeias  $\beta$  antiparalelas e uma ou duas  $\alpha$ -hélices (MARTINS *et al.*, 2020). Nesta estrutura existem seis cisteínas formando três pontes dissulfeto estabilizando-a, uma delas estabiliza os domínios de ligação (DE MAGALHÃES *et al.*, 2018). Esses inibidores do tipo Kunitz, em geral, são inibidores competitivos que se ligam reversivelmente ao sítio ativo de maneira semelhante ao substrato (GOMES *et al.*, 2011). A alça de ligação à protease formada pelo domínio do tipo Kunitz executa a inibição da protease ligando-se firmemente, mas não covalentemente, ao sítio ativo da serina protease. A região mais exposta da alça abriga a posição P1, que é o sítio reativo e o determinante crítico da especificidade de reconhecimento do inibidor (RANASINGHE & MCMANUS, 2013; DE MAGALHÃES *et al.*, 2018). A enzima é assim bloqueada sem quaisquer alterações conformacionais, e o inibidor de Kunitz forma uma folha  $\beta$  antiparalela entre a enzima e o inibidor, onde numerosas interações não covalentes garantem uma ligação forte

(RANASINGHE & MCMANUS, 2013). A alça central reativa (RCL) dos inibidores do tipo Kunitz é estruturalmente adaptada a um amplo painel de proteases, o que explica por que vários inibidores salivares do tipo Kunitz de carrapatos têm múltiplos alvos (SHAMSI *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns inibidores do tipo Kunitz derivados de carrapatos direcionados à trombina não seguem o mecanismo canônico de inibição da protease. Em vez disso, seus resíduos N-terminais se ligam à fenda do sítio ativo da trombina, enquanto seus módulos C-terminais interagem com o exossítio básico I da protease (CORRAL-RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Boophilin é uma proteína de 142 aa, 15,5 kDa (Uniprot: Q8WPI3) e dois domínios kunitz que inibe a trombina, tripsina e plasmina (RIBEIRO *et al.*, 2008). Notavelmente, ela tem como alvo FXIa, calicreína e enzimas neutrófilos elastase e catepsina G, que desempenham um papel direto ou indireto na cascata de coagulação. A boofilina também anula a agregação plaquetária pela catepsina G e plasmina e atenua a clivagem do inibidor da via do fator tecidual pela elastase (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2016).

Uma proteína com um domínio Kunitz expressa pelas glândulas salivares do carrapato *Ixodes ricinus* chamada Ir-CPI inibiu a via intrínseca da coagulação e, em muito menor grau, a fibrinólise *in vitro*. Ela também pode inibir a ativação recíproca de FXII, pré-calicreína e FXI no plasma humano, ligando-se especificamente a esses três fatores quando eles são ativados (DECREM *et al.*, 2009).

A Kunitz Haemangin é uma proteína da glândula salivar de *Haemaphysalis longicornis*. A hemangina inibe a tripsina, a quimotripsina e a plasmina e interrompe a angiogênese e a cicatrização de feridas por meio da inibição da proliferação de células endoteliais vasculares e da indução de apoptose (ISLAM *et al.*, 2009).

Ixolaris tem 165 aa tem 10 cisteínas e 2 domínios do tipo Kunitz, seu recombinante apresentou aproximadamente 15,7 kDa de tamanho molecular. Ela foi encontrada no sequenciamento da glândula salivar de *Ixodes scapularis*. Esta proteína é um anticoagulante, que interfere no Fator Xa ou Fator X, ligando ao exossítio de ligação à heparina FXa (FRANCISCHETTI *et al.*, 2002).

Amblyomin-X uma proteína Kunitz de 129 aa foi relatada no carrapato *Amblyomma cajennense*. Sua forma recombinante de aproximadamente 13,5 kDa contém sete resíduos Cys, inibiu o Fator Xa (FXa) e prolongou o tempo de coagulação sanguínea (BATISTA *et al.*, 2010). O fragmento de 1-57 chamado domínio Kunitz,

contém os primeiros seis resíduos de cisteína, formando uma estrutura com duas  $\alpha$ -hélices e duas folhas  $\beta$  mantidas juntas por três pontes dissulfeto (Cys7-Cys58, Cys33-Cys54, Cys18-Cys41). O outro domínio C-terminal corresponde ao fragmento 58-106 (MORAIS *et al.*, 2023).

As cistatinas é uma superfamília de inibidores reversíveis e de forte ligação que interagem com cisteína proteases e legumainas semelhantes à papaína (ABRAHAMSON *et al.*, 2003). As cistatinas são classificadas, de acordo com certos motivos de sequência e o número de domínios de cistatina conservados, em quatro subfamílias: as cistatinas do tipo 1 (stefinas), as cistatinas do tipo 2, as cistatinas do tipo 3 (cininogênios) e as cistatinas do tipo 4 são as proteínas semelhantes (fetuínas, proteínas ricas em histidina) (RAWLINGS E BARRETT, 1990). Outra classificação mais recente atribui a cada peptidase, ou família de inibidores de peptidase, um número de identificação único no sistema de classificação MEROPS que é amplamente aceito na sociedade proteolítica (RAWLINGS *et al.*, 2010). De acordo com o banco de dados MEROPS, as cistatinas pertencem à família I25, e esta família é dividida nas subfamílias I25A (stefinas), I25B (cistatinas e cinógenos tipo 2) e I25C (fetuínas, proteínas ricas em histidina) (SCHWARZ *et al.*, 2012).

A sialostatin L pertence à família das Cistatinas, do tipo 2 ou peptidase MEROPS I25B, com 133 aa e 11,9 kDa de tamanho molecular (NCBI AAM93646.1; SCHWARZ *et al.*, 2012). Entre os inibidores de cisteína protease secretados por carrapatos, a Sialostatina L (SL) das glândulas salivares de *I. scapularis* foi a primeira cistatina tipo 2 encontrada em carrapatos por um estudo de sialotranscriptoma (VALENZUELA *et al.*, 2002). O nome SL deriva de sua capacidade de inibir a catepsina L, que também inibe a catepsina S (KOTSYFAKIS *et al.*, 2006). Portanto, essa proteína apresenta um papel antiinflamatório e inibe a proliferação de linfócitos T citotóxicos, com propriedades imunossupressoras do hospedeiro, inibe a maturação das células dendríticas. Tudo isso contribui para o sucesso da alimentação e transmissão de patógenos (KOTSYFAKIS *et al.*, 2006).

O MIF biologicamente ativa existe como um homotrímero com dimensões de 35 Å × 50 Å × 50 Å, formando uma estrutura  $\alpha\beta$  com  $\alpha$  hélices circundando folhas  $\beta$  que se enrolam completamente para formar um barril com extremidades abertas formando um canal de solvente, por meio do qual cada monômero consiste em um motivo  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$  c(SUN *et al.*, 1996). Esta “dobra proteica” define a superfamília

estrutural MIF. O sítio ativo da tautomerase dentro da proteína MIF está situado na interface entre pares de subunidades (revestidas pelos resíduos de aminoácidos 1, 33-34 e 64-66) e o sítio geral de ligação ao substrato é altamente conservado entre os homólogos de MIF (SPARKES *et al.*, 2017).

A proteína MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) apresenta 116 aa e foi encontrada na espécie *Amblyomma americanum* (GenBank: AAG28339.1; JAWORSKI *et al.*, 2001; BOWEN *et al.*, 2010) e *Haemaphysalis longicornis* (UMEMIYA *et al.*, 2007). Em ambos os estudos, descobriu-se que o MIF de carrapato é tão ativo quanto o MIF humano em sua capacidade de inibir macrófagos. Com *A. americanum*, temos alguns dados que sugerem que o MIF do carrapato é secretado no hospedeiro e pode estar envolvido na produção de inflamação no local de alimentação do carrapato (JAWORSKI *et al.*, 2009).

As calreticulinas (CRTs) são proteínas de ligação ao cálcio que foram encontradas em vários organismos vertebrados e invertebrados (PORRETTA *et al.*, 2016). A CRTs de mamíferos contém três domínios conservados: um domínio N globular (resíduos 18-186), um domínio P intermediário com dois conjuntos de três repetições conservadas (resíduos 187-286) e um domínio C é ácido com um trecho hidrofóbico curto (resíduos 287-310), sendo principalmente ácido e se liga ao  $\text{Ca}^{+2}$  com alta capacidade e baixa afinidade, contribuindo em 50% do armazenamento e tamponamento deste íon dentro do retículo endoplasmático (resíduos 287-417) (SMITH & KOCH, 1989; ESPERANTE *et al.*, 2023). Diferentes análises mostram resultados contrastantes em relação a estruturas da CRTs, mudando com relação a capacidade de íons ( $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ ) flexibilidade do domínio P e outros detalhes como o dobramento do domínio C (TAN *et al.*, 2006; ELLGAARD *et al.*, 2002). As CRTs são proteínas híbridas com regiões ordenadas e desordenadas e não possui uma estrutura 3D completa e bem caracterizada que pode adquirir conformações diferentes em animais diferentes, em condições fisiológicas diferentes dependendo do microambiente celular (MICHALAK *et al.*, 2009; WIJEYESAKERE *et al.*, 2011; SHIVAROV *et al.*, 2014; VARRICCHIO *et al.*, 2017; MIGLIACCIO & UVERSKY, 2018). Mesmo as CRTs tendo estruturas diferentes entre os organismos, alguns grupos são característicos e altamente conservados. Isso se confirma em um estudo da CRT em quatro espécies diferentes de carrapatos. Foi clonado e sequenciado 4 cDNAs completos de: *Dermacentor variabilis*, *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes*

*scapularis* e *Rhipicephalus sanguineus*. Suas sequências de aminoácidos compartilharam identidades elevadas (entre 77 e 98%). As principais características observadas nas 4 sequências incluem: 3 domínios principais, uma sequência peptídica sinal no início da região de codificação, 2 tripletos de regiões conservadas, locais de cisteína que fornecem pontes dissulfeto para dobramento N-terminal e um sinal de localização nuclear (XU *et al.*, 2004).

Uma proteína chamada calreticulín (denominada Calr ou CRT) com 410 aa (GenBank: AAC79094.1) foi encontrada em *Amblyomma americanum* desempenhando um papel modulador na hemostasia do hospedeiro através da ligação de íons cálcio que são necessários como cofatores de enzimas da coagulação sanguínea (JAWORSKI *et al.*, 1995). Porém, em outro trabalho a CRT da glândula salivar de *Amblyomma americanum* não está envolvido na mediação das funções anti-hemostasia e anti-complemento do carrapato. A alta conservação de aminoácidos entre as proteínas CRTs de carrapatos sugere que as funções ainda não totalmente resolvidas em carrapatos são conservadas em todas as espécies de carrapatos. Como foi utilizado uma forma recombinante (rCRT), que pode ter funções diferentes em relação à forma nativa, isso pode explicar o resultado aparentemente contraditório. Mas dada a variedade de funções que CRT desempenha, não seria irracional pensar que ela tenha outro papel nas glândulas salivares. Talvez ela esteja associada à regulação de funções mais importantes do carrapato e, portanto, são necessários experimentos de acompanhamento para compreender o (s) papel (is) da CRT na fisiologia da alimentação do carrapato (KIM *et al.*, 2015). A maioria dos estudos estão voltados para a probabilidade de geração de anticorpos após imunização com a recombinante da CRT. Como em um estudo que foi realizado a administração da rCRT de duas espécies *R. Microplus* e *H. Longicornis* a bovinos. O soro extraído do animal inoculado reagiu contra as duas formas recombinantes das duas espécies de carrapatos e vice-versa. Outra descoberta interessante, é que os soros dos bovinos vacinados também reconheceram a forma nativa de qualquer uma das espécies, demonstrando que, pelo menos para *R. Microplus* e *H. Longicornis*, a forma recombinante de CRT pode ser utilizada em uma imunização, em vez da forma nativa para gerar imunidade com eficácia semelhante (PARIZI *et al.*, 2009).

Uma proteína de 391 aa (GenBank: ACP21315.1) e 60 kDa, chamada BmAp foi identificada na saliva do carrapato *Boophilus microplus* como um anticoagulante

que inibe a trombina sobre o fibrinogênio, impedindo a formação de fibrina (HORN *et al.*, 2000).

A IXOSP é uma serino protease compatível com enzimas semelhante a tripsina que tem 29,9 kDa de peso molecular e 273 aa (AAY66740.1), encontrada no sialoma de *Ixodes scapularis*. Ela ativou um potente anticoagulante a Proteína C, mas não teve atividade contra a fibrinólise (PICHU *et al.*, 2014). As serina proteases modulam a hemostasia através da conversão da proteína C em proteína C ativada (APC) (ESMON, 2002). APC é um potente anticoagulante através da clivagem de FVa e FVIIIa, dois cofatores para protrombinase e complexos Xnase intrínsecos, que amplificam e consolidam a cascata de coagulação sanguínea (ROBERTS *et al.*, 2010).

A proteína TIX-5 inicialmente chamada de “salivary protein antigen P23” de *Ixodes scapularis* apresenta 222 aa (GenBank: AEE89467.1) e é um inibidor específico do Fator FXa em direção a FV, interferindo na coagulação sanguínea (SCHUIJT *et al.*, 2013).

O fator de liberação de histamina (tHRF) tem 173 aa e foi encontrada na espécie *Ixodes scapularis* (GenBank DQ066335/ protein GenBank: AAY66972.1; DAI *et al.*, 2010). O tHRF é uma proteína de múltipla função conservada evolutivamente (BOMMER *et al.*, 2004), também é uma nova citocina que provoca a liberação de histamina por mecanismos dependentes de IgE e independentes de IgE de basófilos e mastócitos de mamíferos (MCDONALD *et al.*, 1995). A histamina é um mediador de resposta à coceira, promovendo o recrutamento de células pró-inflamatórias para o local da picada do carrapato – e essa resposta imunológica evita a fixação do carrapato na pele do hospedeiro (KEMP *et al.*, 1980; PAINE *et al.*, 1983). O aumento da concentração de histamina pode modular a permeabilidade vascular, induzir a vasodilatação para aumentar o fluxo sanguíneo no local de alimentação do carrapato e facilitar o ingurgitamento do carrapato (DAI *et al.*, 2010; CHLASTÁKOVÁ *et al.*, 2023).

A proteína AV422 apresenta 231 aa e não teve uma classificação de sua família (NCBI AGH08176.1). Ela foi encontrada em *Amblyomma americanum* e sua estrutura pertence a um novo grupo de proteínas de artrópodes que é caracterizado por 14 resíduos de aminoácidos de cisteína: C<sup>23</sup>-X<sub>7/9</sub>-C<sup>33</sup>-X<sub>23/24</sub>-C<sup>58</sup>-X<sub>8</sub>-C<sup>67</sup>-X<sub>7</sub>-C<sup>75</sup>-X<sub>23</sub>-C<sup>99</sup>-X<sub>15</sub>-C<sup>115</sup>-X<sub>10</sub>-C<sup>126</sup>-X<sub>24/25/33</sub>-C<sup>150</sup>-C<sup>151</sup>-X<sub>7</sub>-C<sup>159</sup>-X<sub>8</sub>-C<sup>168</sup>-

X<sub>23/24</sub>-C<sup>192</sup>-X<sub>9/10</sub>-C<sup>202</sup>, que formam sete ligações dissulfeto. Esta proteína está aparentemente envolvida na mediação das funções anti-hemostasia e anti-complemento do carrapato, pois seu recombinante (r *Aam* AV422) atrasou o tempo de coagulação plasmática de maneira responsiva, preveniu a agregação plaquetária e teve redução na produção de complexos terminais do complemento. O silenciamento do RNA de interferência (RNAi) causou uma redução significativa nos pesos de ingurgitamento de carrapatos (MULENGA *et al.*, 2013a). AV422 e seus homólogos foram relatados em proteomas salivares de *A. americanum* e *I. scapularis* (KIM *et al.*, 2016, LEWIS *et al.*, 2015, RADULOVIĆ *et al.*, 2014), *Rhipicephalus microplus* (TIRLONI *et al.*, 2014) e *Haemaphysalis longicornis* (TIRLONI *et al.*, 2015) e *Ixodes ricinus* (MIHALJICA *et al.*, 2017).

As informações deste item estão resumidas na Tabela 2 mostrada a seguir.

Tabela 4: Resumo das proteínas encontradas em *A. sculptum*.

Proteínas	ID de Acesso	AA	Massa (kDa)	Família	Espécie	Inibidor Molecular	Ação
<b>IRS-2</b>	UniProt-Q06B74 NCBI-ABI94056.2	397	44,478	Serpinas	<i>Ixodes ricinus</i>	Catepsina G, Quimase e Trombina	Agregação Plaquetária, Inflamação e Cicatrização
<b>AamS6</b>	NCBI-ABS87358	396	42	Serpinas	<i>Amblyomma americanum</i>	Tripsina, Quimiotripsina, Elastase, Quimase e Papaína	Agregação Plaquetária e Coagulação
<b>IxscS-1E1</b>	NCBI-AID54718	392	45	Serpinas	<i>Ixodes scapularis</i>	Trombina, Tripsina, catepsina G e FXa	Agregação Plaquetária e Coagulação
<b>RmS-15</b>	NCBI-AJS15228	403	-	Serpinas	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Trombina	Coagulação
<b>AAS19</b>	NCBI-JAI08902	420	-	Serpinas	<i>Amblyomma americanum</i>	Trombina, Tripsina, Plasmina, FXa, FXIa, FIIa, FIXa e FXIIa	Agregação Plaquetária e Coagulação
<b>Boophilin</b>	UniProt-Q8WPI3 NCBI-CAC82582	142	15,5	Kunitz	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Trombina, Tripsina, Plasmina, FXIa, Calicreína, Elastase e Catepsina G	Agregação Plaquetária e Coagulação
<b>Ir-CPI</b>	UniProt-Q9GPI5 NCBI-CAB55816	86	9,727	Kunitz	<i>Ixodes ricinus</i>	FXII, FXI e Pré-calicreína	Coagulação
<b>Haemangin</b>	NCBI-BAG82647	120	-	Kunitz	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Tripsina, Quimiotripsina e Plasmina	Angiogênese e Cicatrização
<b>Ixolaris</b>	NCBI-AAK83022	165	15,7	Kunitz	<i>Ixodes scapularis</i>	FXa e FX	Coagulação
<b>Amblyomin-X</b>	NCBI-AY563168	129	13,5	Kunitz	<i>Amblyomma cajennense</i>	FXa	Coagulação
<b>Sialostatin L</b>	NCBI-AAM93646	133	11,9	Cistatinas ou MEROPS 125B	<i>Ixodes scapularis</i>	Catepsina L e Catepsina S	Inflamação e Células Dendríticas
<b>MIF</b>	NCBI-AAG28339	116	-	MIF's	<i>Amblyomma americanum</i> e <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Macrófagos	Inflamação
<b>Calreticulin</b>	NCBI-AAC79094	410	-	Calreticulinas	<i>Amblyomma americanum</i>	-	Coagulação
<b>BmAp</b>	NCBI-ACP21315	391	60	-	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Trombina	Coagulação
<b>IXOSP</b>	NCBI-AAY66740	273	29,9	-	<i>Ixodes scapularis</i>	Proteína C, FVa e FVIIIa	Coagulação
<b>TIX-5</b>	NCBI-AEE89467	222	-	-	<i>Ixodes scapularis</i>	FXa, FV	Coagulação
<b>THRF</b>	NCBI-AAY66972	173	-	-	<i>Ixodes scapularis</i>	Liberação de Histamina	Vasodilação e Inflamação
<b>AamAV422</b>	NCBI-AGH08176	231	-	-	<i>Amblyomma americanum</i> e <i>Ixodes scapularis</i>	Fatores Terminais do Sistema Complemento	Agregação Plaquetária, Coagulação e Sistema Complemento

## 7. CONCLUSÃO

Foi realizado o alinhamento do sequenciamento da espécie *Amblyomma sculptum*, realizado anteriormente, contra banco de dados de proteínas da glândula salivar e da saliva de várias espécies já estudadas. Encontramos 18 sequencias alinhadas de proteínas. A maioria destas proteínas são das famílias: serpinas e kunitz. As serpinas encontradas afetaram principalmente a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária. Já as Kunitz tiveram foco de atuação na coagulação. Portanto, a maior parte delas atuaram na coagulação com 57%. A filogenia mostrou que as proteínas foram conservadas em diferentes espécies e espera-se que suas funções sejam as mesmas no *Amblyomma*. Para a confirmação disso é necessários estudos específicos para cada uma delas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, M., Alvarez-Fernandez, M., & Nathanson, C. M.; Cystatins. In Biochemical society symposia. Vol. 70, pp. 179-199; Portland Press Limited, 2003.
- ABREU, J. F.; Identificação e caracterização funcional de um inibidor da via clássica do sistema complemento expresso na glândula salivar do carrapato *Amblyomma sculptum*. 2018. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas>>.
- AFGAN, E.; Baker, D.; Bér´, B.; Batut, B.; Van Den Beek, M.; Bouvier, D.; Cech, M.; Chilton, J.; Clements, D.; Coraor, N.; *et al.*; The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46: 537–544, 2018.
- ALVES, J. G.; Rodrigues, L. T.; Ferreira, L. F.; Cardoso, C. L.; Koga, D. H.; Curi, M. M.; Miífase afetando a cavidade bucal: relato de caso. Faculdade de odontologia de Bauru, USP. 2022.
- ANDRADE, B. B.; Teixeira, C. R.; Barral, A.; Barral-Neto, M.; Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad. Bras. Cienc.*; 77: 665-93. 2005.
- AOUNALLAH, H.; Bensaoud, C.; M’ghirbi, Y.; Faria, F.; Chmelar, J.; Kotsyfakis, M.; Tick salivary compounds for targeted immunomodulatory therapy. *Frontiers Immunology*. Volume 11, 2020.
- ARCÀ, B.; Ribeiro, J. M. C.; Saliva of hematophagous insects: a multifaceted toolkit. *Current opinion in insect science*, volume 29, pages 102-109, 2018.
- ASSUMPÇÃO, T. C; Ma, D.; Mizurini, D. M.; Kini, R. M.; Ribeiro, J. M. C.; Kotsyfakis, M.; Monteiro, R. Q.; Francischetti, I. M. B.; *In Vitro* Mode of Action and Anti-thrombotic Activity of Boophilin, a Multifunctional Kunitz Protease Inhibitor from the Midgut of a Tick Vector of Babesiosis, *Rhipicephalus microplus*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004298. 2016.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H.; Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 223 p., 2006.
- BARROS, E.; Análise proteômica de glândulas salivares do carrapato *Amblyomma sculptum*.; 42 f. Universidade Federal de Viçosa, 2016. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9367>>.

- BATISTA, I. F.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; Faria, F.; Simons, S. M.; Barros-Batesti, D. M.; Labruna, M. B.; ... & Junqueira-de-Azevedo, I. L.; Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*, 51(5), 823-834. 2008.
- BATISTA, I. F.C.; Ramos, O. H. P.; Ventura, J. S.; Junqueira-de-Azevedo, I. L. M.; Ho, P. L.; Chudzinski-Tavassi, A. M. e colaboradores; A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 493, n. 2, p. 151–156, 2010.
- BEATI, LORENZA e colab.; *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13, n. 1, 9 Dez 2013.
- BITENCOURTH, K.; Amorin, M.; Oliveira, S. V. De; Caetano, R. L.; Voloch, C. M.; Gazêta, G. S.; *Amblyomma sculptum*: Genetic diversity and rickettsias in the Brazilian cerrado biome. *Medical and Veterinary Entomology*. Volume 31, Issue 4, Pages 427-437, 2017.
- BLAIMER, B. B.; Brady, S. G.; Schultz, T. R.; Lloyd, M. W.; Fisher, B. L. & Ward, P. S.; Phylogenomic methods outperform traditional multi-locus approaches in resolving deep evolutionary history: a case study of formicine ants. *BMC evolutionary biology*, Volume 15, Pages 1-14, 2015.
- BLANDA, V.; D'Agostino, R.; Giudice, E.; Randazzo, K.; La Russa, F.; Villari, S.; Vullo, S.; Torina, A.; New real-time PCRs to differentiate *Rickettsia spp.* And *Rickettsia conorii*. *Molecules*. Volume 25, page 4431. 2020.
- BOMMER, U. A; Thiele, B. J.; The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 36: 379–385. 2004.
- BOWEN, C. J.; Jaworski, D. C.; Wasala, N. B.; Coons, L. B.; Macrophage migration inhibitory factor expression and protein localization in *Amblyomma americanum* (Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*; 50:343-52. 2010.
- BRAGA J. P. Vianna. Sequenciamento, Montagem e Caracterização do Genoma Nuclear do Carrapato *Amblyomma Sculptum*. Monografia apresentada ao departamento de bioquímica e biologia molecular da UFV. 2019 (Dados não publicados).
- BRANCO, Vania G. e colab.; Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2016.

- CAMACHO, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos J.; Bealer, K.; Madden, T. L.; BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, Article number: 421. 2009.
- CAVALCANTE, R. R.; Pereira, M. H.; Gontijo, N. F.; Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 87–93, 2003.
- CHALAIRE, K. C.; Kim, T. K.; Garcia-Rodriguez, H.; Mulenga, A.; *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) tick salivary gland serine protease inhibitor (serpin) 6 is secreted into tick saliva during tick feeding. *Journal Exp. Biol.*, 214 (4): 665-673. 2011.
- CHLASTÁKOVÁ, A.; Kascáková, B.; Kotál, J.; Langhansová; Kotsyfakis, M.; Smatanová, I. K.; Tirloni, L.; Chmelar, J.; Iripin-1, uma nova serpina antiinflamatória para carrapatos, inibe o recrutamento de leucócitos *in vivo* enquanto altera os níveis de quimiocinas e moléculas de adesão. *Frente. Immunol.*, Volume 14, 2023.
- CHMELAR, J.; Calvo, E.; Pedra, J. H. F.; Francischetti, I. M. B.; Kotsyfakis, M.; Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*. Volume 75, Issue 13, pages 3842-3854. 2012.
- CHMELAR, J.; Kotál, J.; Kopecký, J.; Pedra, J. H.; & Kotsyfakis, M.; All for one and one for all on the tick–host battlefield. *Trends in parasitology*, Volume 32(5), Pages 368-377. 2016.
- CHMELAR, J.; Oliveira, C. J.; Rezacova, P.; Francischetti, I. M.; Kovarova, Z.; Pejler, G.; *et al.*; A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736–744. 2011.
- CORRAL-RODRIGUEZ, M. A.; Macedo-Ribeiro, S.; Barbosa Pereira, P. J.; Fuentes-Prior, P.; Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*; 39, 579–595. 2009.
- COSTA, G. C. A.; Ribeiro, I. C. T.; Melo-Junior, O.; Gontijo, N. F.; Sant’Anna, M. R.; Pereira, M. H.; ... & Araujo, R. N.; *Amblyomma sculptum* salivary protease inhibitors as potential anti-tick vaccines. *Frontiers in immunology*, 11, 611104. 2021.
- COTES-PERDOMO, A. P.; Nava, S.; Castro, L. R.; Rivera-Paéz, F. A.; Cortés-Vecino, J. A.; Uribe, J. E.; Phylogenetic relationships of the *Amblyomma cajennense* complex (Acari: Ixodidae) at mitogenomic resolution. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(3), 102125. 2023.

- DAI, J.; Narasimhan, S.; Zhang, L.; Liu, L.; Wang, P.; Fikrig, E.; Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001205. 2010.
- DANTAS-TORRES, F.; Martins, T. F.; Muñoz-leal, S.; Onofrio, V. C.; Barros-battesti, D. M.; Ticks (*Ixodida: Argasidae, Ixodidae*) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 10, Issue 6, October. 2019.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W.; The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 1991.
- DECREM, Y.; Rath, G.; Blasioli, V.; Cauchie, P.; Robert, S.; Beaufays, J.; Frère, J. M.; Feron, O.; Dogné, J. M.; Dessy, C.; Vanhamme, L.; Godfroid, E.; Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(11), pages 2381-2395. 2009.
- DE LA FUENTE, J.; Waterhouse, R. M.; Sonenshine, D. E.; Roe, R. M.; Ribeiro, J. M.; Sattelle, D. B.; Hill, C. A.; Tick genome assembled: new opportunities for research on tick-host-pathogen interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, Volume 6, 103. 2016.
- DE LA FUENTE, J.; Merino, O.; Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine*, Volume 31, Issue 50, Pages 5923-5929. 2013.
- DE LIMA, P. H. C.; Barcelos, R. M.; Klein, R. C.; Vidigal, P. M. P.; Montandon, C. E.; Fabres-Klein, M. H.; ... & Mafra, C.; Sequencing and comparative analysis of the *Amblyomma sculptum* mitogenome. *Veterinary parasitology*, 247, 121-128. 2017.
- DE MAGALHÃES, M. T. Q.; Mambelli, F. S.; Santos, B. P. O.; Morais, S. B.; Oliveira, S. C.; Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: Their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microbes Infect.*; 20, 606–609. 2018.
- DE PAULA, L.G.F.; do Nascimento, R.M.; Franco, A. O.; Szabó, M. P. J.; Labruna, M. B.; Monteiro, C.; Krawczak, F. S.; Seasonal dynamics of *Amblyomma sculptum*: a review. *Parasites & Vectors*, volume 15, Page 193, 2022.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C.; Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20, pages 34–50, 2010.
- DUNSTONE, M. A. & WHISSTOCK, J. C.; Crystallography of serpins and serpin complexes. *Methods Enzymol.* 501:63-87, 2011.

- ELLGAARD, L.; Bettendorff, P.; Braun, D.; Herrmann, T.; Fiorito, F.; Jelesarov, I.; et al.; NMR structures of 36 and 73-residue fragments of the calreticulin p-domain. *J. Mol. Biol.*; 322(4): 773-84. 2002.
- ESMON, C. T.; New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins. *The Journal of experimental medicine*, 196(5), 561-564. 2002.
- ESPERANTE, D.; Flisser, A.; Mendlovic, F.; The many faces of parasite calreticulin. *Front. Immunol.*; Vol. 14. 2023.
- ESTEVEZ, E.; Maruyama, S. R.; Kawahara, R.; Fujita, A.; Martins, L. A.; Righi, A. A.; et al.; Analysis of the salivary gland transcriptome of unfed and partially Fed *Amblyomma sculptum* ticks and descriptive proteome of saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*; 7:476. 2017.
- ESTRADA-PEÑA, A.; e colab.; Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, v. 44, n. 14, p. 1081–1089, 2014.
- FLORES, F. S.; Saracho-bottero, M. N.; Tarragona E. L.; Sebastian P. S.; Copa G. N.; Guardia L.; Mangold A. J.; Venzal, J. M.; Nava, Santiago. Ticks (Acari: *Ixodidae*, *Argasidae*) associated with wild birds in Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Volume 14, Issue 3, 2023.
- FRANCISCHETTI, I. M.B. e colab.; 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*, 2002.
- FRANCISCHETTI, I. M.B.; e colab.; The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005.
- FRANCISCHETTI, I. M.; Sa-Nunes, A.; Mans, B. J.; Santos, I. M.; Ribeiro, J. M.; The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 2051. 2009.
- FRANCISCHETTI, I. M.B; Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*. Volume 56, issue7, pages 1130-1144, 2010.
- FRANCO, P. F.; e colab.; Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 2016.

- GARCIA, G. R.; Gardinassi, L. G.; Ribeiro, J. M.; Anatriello, E.; Ferreira, B. R.; Moreira, H. N. S.; ... & Maruyama, S. R.; The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-18. 2014.
- GARCIA, G.R., Ribeiro, J.M.C., Maruyama, S.R. et al. A transcriptome and proteome of the tick *Rhipicephalus microplus* shaped by the genetic composition of its hosts and developmental stage. *Sci Rep* 10, 12857 (2020).
- GETTINS P. G.; Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev.*; 102(12):4751-804, 2002.
- GOMES, M. T.; Oliva, M. L.; Lopes, M. T.; Salas, C. E.; Plant proteinases and inhibitors: An overview of biological function and pharmacological activity. *Curr. Protein Pept. Sci.*; 12, 417–436. 2011.
- GRIFFITH, J. W.; Sokol, C. L.; Luster, A. D.; Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. Volume 32, pages 659-702. 2014.
- GUGLIELMONE, A. A.; Beati, L.; Battesti, D. M. B.; Labruna, M. B.; Nava, S.; Venzal, J. M.; Mangold, A. J.; Szabó, M. P. J.; Martins, J. R.; Gonzálezacuña, D.; Estrada-pena, A.; Ticks (*Ixodidae*) on humans in South America. *Experimental & applied acarology* 40, 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, A. A.; Robbins, R. G.; Apanaskevich, D. A.; Petney, T. N.; Estrada-peña, A.; Horak, I. G.; Shao, R.; Barker, S. C.; Zootaxa, *The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida)* of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528, 1–28. 2010.
- GULIA-NUSS, M.; Nuss, A. B.; Meyer, J. M.; Sonenshine, D. E.; Roe, R. M.; Waterhouse, R. M.; et al.; Genomic insights into the *Isodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat. Commun.* 7: 10507. 2016.
- GUYTON & HALL; Tratado de Fisiologia médica; Tradução da 13ª edição; Editora Elsevier; 2017.
- HEINZE, D. M.; Carnical, J. R.; Aronson, J. F.; Thangamani, S.; Early immunologic events at the tick-host interface. *Plos One*. Volume 7, issue 10. 2012.
- HEGAZY, M. M.; Mostafa, R. M.; El-Sayed, Y. A.; Baz, M. M., Khater, H. F.; Selim, A.; El-Shourbagy, N. M.; The efficacy of *saussurea costus* extracts against hematophagous arthropods of Camel and Cattle. *Pakistan Veterinary Journal*, 42 (4). 2022.

- HEUTINCK, K. M.; Ten Berge, I. J.; Hack, C. E.; Hamann, J.; Rowshani, A. T.; Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol.*; 47:943–955. 2010.
- HORN, F.; dos Santos, P. C.; Termignoni, C.; *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of biochemistry and biophysics*, 384(1), 68-73. 2000.
- HUNTINGTON, J. A.; Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of thrombosis and haemostasis*. Volume 9. 2011.
- IBELLI, A. M.G.; Kim, T. K.; Hill, C. C.; Lewis, L. A.; Bakshi, M.; Miller, S.; Porter, L.; Mulenga A.; A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting, *International Journal for Parasitology*, Volume 44, Issue 6, Pages 369-379. 2014.
- ISLAM, M. K.; Tsuji, N.; Miyoshi, T.; Alim, M. A.; Huang, X.; Hatta, T.; Fujisaki, K.; The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog.*; 5, e1000497. 2009.
- ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; Portinho, C.P.; Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Rev. Assoc. Med. Bras. São Paulo*, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.
- JANEWAY Jr, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J.; The complement system and innate immunity. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Garland Science. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>.
- JAWORSKI, D. C.; Bowen, C. J.; Wasala, N. B.; *Amblyomma americanum* (L): tick macrophage migration inhibitory factor peptide immunization lengthens lone star tick feeding intervals *in vivo*. *Exp. Parasitol.*; 121: 384-387. 2009.
- JAWORSKI, D. C.; Jasinkas, A.; Metz, C. N.; Bucala, R.; Barbour, A. G.; Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect molecular biology*, 10(4), 323-331. 2001.
- JAWORSKI, D. C.; Simmen, F. A.; Lamoreaux, W.; Coons, L. B.; Muller, M. T.; Needham, G. R.; A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma Americanum*) saliva. *J. Insect Physiol.*; 41: 369-375. 1995.
- JERZAK, M.; Gandurski, A.; Tokaj, M.; Stachera, W.; Szuba, M.; Dybicz, M. Advances in *Babesia* Vaccine Development: An Overview. *Pathogens*, 12(300). 2023.

- JEVNIKAR, Z.; Mirković, B.; Fonović, U. P.; Zidar, N.; Svajger, U.; Kos, J.; Three-dimensional invasion of macrophages is mediated by cysteine cathepsins in protrusive podosomes. *Eur J Immunol.*; 42:3429–3441. 2012.
- JMEL, M. A.; Voet, H.; Araújo, R. N.; Tirloni, L.; Sá-Nunes, A.; Kotsyfakis, M.; Tick Salivary Kunitz-Type Inhibitors: Targeting Host Hemostasis and Immunity to Mediate Successful Blood Feeding. *Int. J. Mol. Sci. Vol 24*, 1556. 2023.
- KARCZEWSKI, J.; Connolly, T. M. The interaction of disagregin with the platelet fibrinogen receptor, glycoprotein IIb-IIIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 744–748. 1997.
- KARCZEWSKI, J.; Endris, R.; Connolly, T. M.; Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 269, 6702–6708. 1994.
- KAZIMÍROVÁ, M.; ŠTIBRÁNIOVÁ, I.; Tick salivary compounds: Their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013.
- KELLY-ROBINSON, G. A.; Reihill, J. A.; Lundy, F. T.; McGarvey, L. P.; Lockhart, J. C.; Litherland, G. J.; *et al.*; The serpin superfamily and their role in the regulation and dysfunction of serine protease activity in COPD and Other chronic lung diseases. *Int. J. Mol. Sci.*; Volume 22, issue 12, page 6351. 2021.
- KEMP, D. H., Bourne, A.; *Boophilus microplus*: o efeito da histamina na fixação de larvas de carrapatos bovinos – estudos in vivo e in vitro. *Parasitologia* 80: 487–496. 1980.
- KESSENBROCK, K.; Dau, T.; Jenne, D. E.; Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *J Mol Med (Berl)*; 89:23–28. 2011.
- KHAN, M. S.; Singh, P.; Azhar, A.; Naseem, A.; Rashid, Q.; Kabir, M. A.; *et al.*; Serpin Inhibition mechanism: A delicate balance between native metastable state and polymerization. *Journal of Amino Acids*. 2011.
- KIM, T. K.; Ibelli, A. M. G.; Mulenga, A.; *Amblyomma americanum* tick calreticulin binds C1q but does not inhibit activation of the classical complement cascade. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(1), 91-101. 2015.
- KIM, T. K.; Radulovic, Z.; Mulenga, A.; Target validation of highly conserved *Amblyomma Americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Volume 7, Issue 3, Pages 405-414, 2016.

- KIM, T. K.; Tirloni, L.; Radulovic, Z.; Lewis, L.; Bakshi, M.; Hill, C.; Vaz, I. S.; Logullo, C.; Termignoni, C.; Mulenga, A.; Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *International Journal for Parasitology*, Volume 45, Issues 9–10, Pages 613-627. 2015.
- KORKMAZ, B.; Moreau, T.; Gauthier, F.; Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie.*; 90:227–242. 2008.
- KOTSYFAKIS, M.; Sá-Nunes, A.; Francischetti, I. M.; Mather, T. N.; Andersen, J. F.; & Ribeiro, J. M.; Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26298-26307. 2006.
- KOVÁROVÁ, Z.; Chmelar, J.; Sanda, M.; Brynda, J.; Mares, M.; Rezácová, P.; Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(11), 1453–1457. 2010.
- KRAWCZAK, F. S.; Nieri-Bastos, F.A.; Nunes, F.P.; Soares, J.F.; Moraes-Filho, J.; Labruna, M.B.; Infecção rickettsial em carrapatos *Amblyomma cajennense* e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) em área endêmica de febre maculosa brasileira. *Vetores Parasitários*, 7:7, 2014.
- KROLL, M. H.; SCHAFFER, A. I.; Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood*. [S.l: s.n.], 1989.
- KULAGINA, A. P. and Aleksei A. Suzdaltsev. Asthenic syndrome in the convalescents of ixodid tick-borne borrelioses. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhia*, 23 pages 10-14. 2023.
- LABRUNA, M. B.; Comparative survival of the engorged stages of *Amblyomma cajennense* sensu stricto and *Amblyomma sculptum* under different laboratory conditions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, volume 9, Issue 4, Pages 996-1001. 2018.
- LABRUNA, M. B.; Kerber, C. E.; Ferreira, F.; Faccini, J. L. H.; Waal, D. T.; Gennari, S. M.; Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 97, p. 1–14, 2001.
- LABRUNA, M. B.; Krawczak, F. S.; Gerardi, M.; Binder, L. C.; Barbieri, R. M. A.; Paz, G. F.; Rodrigues, D. S.; Araújo, R. N.; Bernardes, M. L.; Leite, R. C.; Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted

- fever-endemic area in the Pampulha Lake region. *Veterinary Parasitology: Regional studies and reports*. Volume 8. Pages 82-85. 2017.
- LEBOULLE, G.; Rochez, C.; Louahed, J.; Ruti, B.; Brossard, M.; Bollen, A.; Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 3, page 225-233, 2002.
- LEUNG, L. L. K. Hemostasis and its Regulation. *ACP Medicine*. 2012.
- LEWIS, L. A.; Radulović, Ž. M.; Kim, T. K.; Porter, L. M.; Mulenga, A.; Identification of 24 h *Ixodes scapularis* immunogenic tick saliva proteins. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 424-434. 2015.
- MACDONALD, S. M.; Rafnar, T.; Langdon, J.; Lichtenstein, L. M.; Identificação molecular de um fator de liberação de histamina dependente de IgE. *Ciência* 269: 688–690. 1995.
- MACEDO-RIBEIRO, S.; Almeida, C.; Calisto, B. M.; Friedrich, T.; Mentele, R.; et al.; Isolation, Cloning and Structural Characterization of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. *PLOS ONE* 3(2): e 1624. 2008.
- MAKO, V.; Czucz, J.; Weiszhar, Z.; Herczenik, E.; Matko, J.; Prohaszka, Z.; et al.; Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha and LPS. *Cytometry A*. Volume 77, issue 10, pages 962-70. 2010.
- MANS, B. J.; Andersen, J. F.; Schwan, T. G.; Ribeiro, J. M.; Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: Implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Vol. 38, 22–41. 2008.
- MANS, B. J.; Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity*, 2011.
- MANS, B. J.; Klerk, D.; Pienaar, R.; Castro, M. H.; Latif, A. A.; Next - generation sequencing as means to retrieve tick systematic markers, with the focus on *Nuttalliella namaqua* (*Ixodoidea: Nuttalliellidae*), *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 6, Issue 4, Pages 450-462, 2015.

- MANS, B. J.; Louw, A. I.; Neitz, A. W.; Disaggregation of Aggregated Platelets by Savignygrin, a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  Antagonist from *Ornithodoros savignyi*. *Exp Appl Acarol.* 27, 231–239. 2002.
- MARDIS, E. R.; A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, Volume 470(7333), Pages 198-203, 2011.
- MARIA, D. A.; Will, S. E. A. L.; Bosch, R. V.; Souza, J. G.; Sciani, J. M.; Goldfeder, M. B.; Rondon, G. G.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; Preclinical evaluation of Amblyomin-X, a Kunitz-type protease inhibitor with antitumor activity. *Toxicology Reports*, v. 6, p. 51–63, 2019.
- MARIJANOVIC, E. M.; Fodor, J.; Riley, B. T.; Porebski, B. T.; Costa, M. G. S.; Kass, I.; *et al.*; Reactive core loop dynamics and serpin specificity. *Representante Científico*, 9(1):3870. 2019.
- MARITZ-OLIVIER, C.; Stutzer, C.; Jongejan, F.; Neitz, A. W. H.; Gaspar, A. R. M.; Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology*, Volume 23, Issue 9, Pages 397-407. 2007.
- MARTINS, T. F.; e colab.; 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*, 2016.
- MARTINS, L. A.; Kotál, J.; Bensaoud, C.; Chmelar, J.; Kotsfakis, M.; Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Volume 1868, Issue 2, 2020.
- MASSARD, C. L. e Fonseca, A. H.; Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária* 135(1):15-23, 2004.
- MELDRUM, C.; Doyle, M. A. & Tohill, R. W.; Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *The Clinical Biochemist Reviews*, Volume 32(4), Pages 177-195, 2011.
- METZKER, M. L.; Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46, 2010.
- MICHALAK, M.; Groenendyk, J.; Szabó, E.; Gold, L. I.; Opas, M.; Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperona of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*; 417(3):651-66. 2009.

- MIGLIACCIO, A. R.; Uversky, V. N.; Dissecting physical structure of calreticulin, an intrinsically disordered  $\text{Ca}^{2+}$  - buffering chaperone from endoplasmic reticulum. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 36(6):1617–36. 2018.
- MIHALJICA, D.; Marković, D.; Radulović, Ž.; Mulenga, A.; Ćakić, S.; Sukara, R.; ... & Tomanović, S.; Assessment of using recombinant *Ixodes ricinus* AV422 saliva protein for confirmation of tick bites in hunting dogs as naturally infested hosts. *Experimental and Applied Acarology*, 72, 429-437. 2017.
- MKAOUAR, H.; Akermi, N.; Kriaa, A.; Abraham, A. L.; Jablaoui, A.; Soussou, S.; *et al.*; Serine protease inhibitors and human wellbeing interplay: new insights for old friends. *Peer J.; Biochemistry, Biophysics and molecular biology*. Volume 7, page 7224. 2019.
- MORAIS, K. L. P.; Ciccone, L.; Stura, E.; Alvarez-Flores, M. P.; Mourier, G.; Driessche, M. V.; Sciani, J. M.; Iqbal, A.; Kalil, S. P.; Pereira, G. J.; Marques-Porto, R.; Gunegundes, P.; Juliano, L.; Servent, D.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; Structural and functional Properties of the Kunitz-type and C-terminal domains of Amblyomin-X supporting its antitumor activity. *Front. Mol. Biocci.*; Volume 10. 2023.
- MOREIRA, H. N. S.; Barcelos, R. M.; Vidigal, P. M. P.; Klein, R. C.; Montandon, C. E.; Maciel, T. E. F.; ... & Mafra, C.; A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. *Parasitology International*, v. 66, n. 2, p. 64–73, 2017.
- MULENGA, A.; Khumthong, R.; BLANDON, M. A.; Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *J Exp Biol* 210 (18): 3188–3198. 2007.
- MULENGA, A.; Kim, T.; Ibelli, A. M.; *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 molecular biology*, 22(3), 306–319. 2013b.
- MULENGA, A.; Kim, T. K.; Ibelli, A. M. G.; Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein, *International Journal for Parasitology*, Volume 43, Issue 6, Pages 439-451. 2013a.
- NATIVIDADE, U. A.; *et al.*; Locomotion activity and its effects on the survival of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) nymphs under laboratory conditions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 12, n. 1, p. 101562, 2021.
- NAVA, S.; e colab.; Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae*

- n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. Ticks and Tickborne Diseases, 2014.
- NEVES, D. P.; *et al.*; Parasitologia Humana. 13. ed. Rio de Janeiro: Atheneu., 2016.
- NIENABER, J.; Gaspar, A. R. M.; Neitz, A. W. H.; Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). Experimental Parasitology, 1999.
- NOGUEIRA, B. C. F.; Orozco, A. M. O.; Argumedo, A. K.; *et al.*; Circulating oxidative stress and acute phase protein levels in horses infested with ticks. Exp Appl Acarol. 2023.
- O'LEARY, N. A.; Wright, M. W.; Brister, J. R.; Ciufu, S.; Haddad, D.; Mcveigh, R.; Rajput, B.; Robbertse, B.; Smith-white, B.; Ako-adjai, D.; *et al.*; Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Research, Volume 44: Issue D1, pages D733–D745. 2016.
- OLIVEIRA, S.V.; Romero-Alvarez, D.; Martins, T.F.; Santos, J.P.D.; Labruna, M.B.; Gazeta, G.S.; *et al.*; *Amblyomma* ticks and future climate: Range contraction due to climate warming. Acta Trop.; 176:340-348. 2017.
- PAINE, S. H.; Kemp, D. H.; Allen, J. R.; Alimentação in vitro de *Dermacentor andersoni* (Stiles): efeitos da histamina e outros mediadores. Parasitologia 86 (Pt 3): 419–428.1983.
- PALENIKOVÁ, J.; Lieskovská, J.; Langhansová, H.; Kotsfalís, M.; Chmelar, J.; Kopecky, J.; *Ixodes ricinus* Salivary Serpin IRS-2 Affects Th17 Differentiation via Inhibition of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway. ASM Journals, Infection and Immunity. Vol 83, No 5. 2015.
- PARIZI, L. F.; Rech, H.; Ferreira, C. A. S.; Imamura, S.; Ohashi, K.; Onuma, M.; ... & da Silva Vaz Jr, I.; Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. Veterinary parasitology, 164(2-4), 282-290. 2009.
- PICHU, S.; Ribeiro, J. M.; Mather, T. N.; Francischetti, I. M.; Purification of a serine protease and evidence for a protein C activator from the saliva of the tick, *Ixodes scapularis*. Toxicon, 77, 32-39. 2014.

- PORRETTA, D.; Latrofa, M. S.; Dantas-Torres, F.; *et al.*; Exon-intron structure and sequence variation of the calreticulin gene among *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Parasites Vectors* **9**, 640. 2016.
- RADULOVIĆ, Ž. M.; Kim, T. K.; Porter, L. M.; Sze, S. H.; Lewis, L.; Mulenga, A.; A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BMC genomics*, **15**, 1-30. 2014.
- RAMOS, Vanessa do Nascimento; *et al.*; Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 8, n. 4, p. 506-510, 2017.
- RANASINGHE, S.; McManus, D.P.; Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.*; **39**, 219–227. 2013.
- RAWLINGS, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A.; MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, **38**(suppl\_1), D227-D233. 2010.
- RAWLINGS, N. D. & Barrett, A. J.; Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of molecular evolution*. **30**, 60-71. 1990.
- RIBEIRO, J. M.; Alarcon-Chaidez, F.; Francischetti, I. M.; Mans, B. J.; Mather, T. N.; Valenzuela, J. G.; Wikel, S. K.; An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.*; **36**, 111–129. 2006.
- RIBEIRO, S. M.; Almeida, C.; Calisto, B. M.; Friedrich, T.; Mentele, R.; Stürzebecher, J.; Fuentes-Prior, P.; Pereira, P. J. B.; Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. *Plos one*, 2008.
- ROBERTS, H. R.; Monroe, D. M.; Hoffman, M.; Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. *Williams hematology*, **6**, 1409-1434. 2001.
- RODRIGUES, V. S.; Barradas, F. T. P.; Barros, J. C.; Garcia, M. V.; Andreotti, R.; Carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum*): ecologia, biologia, controle e importância. Comunicado Técnico do Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. 132, ISSN 1983-9731, Brasília-DF, dezembro, 2015. Disponível em: [https://cloud.cnpqc.embrapa.br/controle-do-carrapato-ms/files/2016/11/COT\\_132.pdf](https://cloud.cnpqc.embrapa.br/controle-do-carrapato-ms/files/2016/11/COT_132.pdf).
- RODRIGUEZ-VALLE, M.; Xu, T.; Kurscheid, S.; *et al.*; *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression, and functional characterization assessment. *Parasites Vectors* **8**, article 7. 2015.

- ROSSIGNOL, P. A.; e colab.; Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: Evidence for vector-parasite mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985.
- SCHECHTER, N. M.; Plotnick, M. I.; Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Métodos*. 32 :159–168. 2004.
- SCHIEMANN, F.; Grimm, T. A.; Hoch, J.; Gross, R.; Lindner, B.; Petersen, F.; Bulfone-Paus, S.; Brant, E.; Mast cells neutrophils proteolytically active chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. *Blood*. 107 (6):2234–2242. 2006.
- SCHUIJT, T. J.; Bakhtiari, K.; Daffre, S.; DePonte, K.; Wielders, S. J.; Marquart, J. A.; ... & van 't Veer, C.; Factor Xa activation of factor V is of paramount importance in initiating the coagulation system: lessons from a tick salivary protein. *Circulation*, 128(3), 254-266. 2013.
- SCHWARZ, A.; Valdés, J. J.; Kotsyfakis, M.; The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(3), 117-127. 2012.
- SHINJO, S. K.; Gauditano, G.; Marchiori, P. E.; Bonoldi, V. L. N.; Costa, I. P.; Mantovani, E.; Yoshinari, N. H.; Manifestação neurológica na síndrome de Baggio-Yoshinari (Síndrome brasileira semelhante à doença de Lyme). *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2009.
- SHIVAROV, V.; Ivanova, M.; Tiu, R. V.; Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind  $Ca^{2+}$ : some mechanistic and therapeutic implications. *Blood cancer journal*. 4(2):e185. 2014.
- SILVERMAN, G. A.; Bird, P. I.; Carrell, R. W.; Church, F. C.; Caughlin, P. B.; Gettins, P. G. W.; Moyer, R. W.; Pemberton, P. A.; Remold-O'Donnell, E.; Salvesen, G. S. *et al.*; The serpins are expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, 276, 33293-33296. 2001.
- SIM, R. B.; Dodds, A. W.; The complement system: an introduction. *Complement: A practical approach*, AW Dodds and RB Sim (eds.). IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, p. 1–18, 1997.
- SIM, R. B.; Laich, A.; Serine proteases of the complement system. *Biochemical Society transactions*. [S.l: s.n.], 2000.

- ŠIMO, L.; Kazimirova, M.; Richardson, J.; Bonnet, S. I.; The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Volume 7, Article 281. 2017.
- SIMONS, S. M.; de Sa Junior, P. L.; Faria, F.; Batista, I. D. F. C.; Barros-Battesti, D. M.; Labruna, M. B.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; The action of *Amblyomma cajennense* tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(6), 443-450. 2011.
- SMITH, M. J. E KOCH, G. L.; Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calreticulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO. J.*; 8:3581-6. 1989.
- SOARES, T. S.; Okuta, R. M. W.; Tanaka-Azevedo, M. A.; Torquato, R. J. S.; Lu, S.; Figueiredo, A. C.; Pereira, P. J. B.; Tanaka, A. S.; Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. *Veterinary Parasitology*, Volume 187, Issues 3–4, Pages 521-528. 2012.
- SOUSA, A. C. P.; Oliveira, C. J. F.; Szabó, M. P. J.; Silva, M. J. B.; Anti-neoplastic activity of *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* and *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva on breast tumor cell lines. *Toxicon*, 148, 165-171. 2018.
- SPARKES, A.; De Baetselier, P.; Roelants, K.; De Trez, C.; Magez, S.; Van Ginderachter, J. A.; Raes, G.; Bucala, R.; Stijlemans, B.; The non-mammalian MIF superfamily. *Immunobiology*, 222(3), 473-482. 2017.
- STANKE, M.; Waack, S.; Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. In: *Bioinformatics*. Oxford Academic, 215–225. 2003.
- STONE, B. F.; Commins, M. A.; Kemp, D. H.; Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *International journal for parasitology*, 13(5), 447-454. 1983.
- SUN, H. W.; Bernhagen, J.; Bucala, R.; Lolis, E.; Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 93, 5191-5196. 1996.
- SUN, L.; Wu, Z.; Hayashi, Y.; Peters, C.; Tsuda, M.; Inoue, K.; *et al.*; Microglial Cathepsin B Contributes to the Initiation of Peripheral Inflammation-Induced Chronic Pain. *J Neurosci.*; 32:11330–11342. 2012.
- SZABÓ, M. P. J.; Martins, T. F.; Barbieri, A. R. M.; Costa, F. B.; Soares, H. S.; Tolesano-Pascoli, G. V.; Torga, K.; Saraiva, D. G.; Ramos, V. N.; Osava, C. F.;

- Castro, M. B.; Labruna, M. B.; Ticks biting humans in the Brazilian savannah: Attachment sites and exposure risk in relation to species, life stage and season. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Volume 11, Issue 2, 101328. 2020.
- TAN, Y.; Chen, M.; Li, Z.; Mabuchi, K.; Bouvier, M.; The calcium- and zinc- responsive regions of calreticulin reside strictly in the n-/C-domain. *Biochim Biophys Acta*; 1760 (5):745-53. 2006.
- TIRLONI, L.; Islam, M. S.; Kim, T. K.; Diedrich, J. K.; Yates, J. R.; Pinto, A. F.; ... & Da Silva Vaz, I.; Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-23. 2015.
- TIRLONI, L.; Seixas, A.; Mulenga, A.; Vaz Jr., I. S.; Termignoni, C.; A Family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp. Parasitology*, Vol 137, Pages 25-34. 2014.
- TITUS, R. G.; Bishop, J. V.; Mejia, J. S.; The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. 2006.
- UMEMIYA, R.; Hatta, T.; Liao, M.; Tanaka, M.; Zhou, J.; Inoue, N.; et al.; *Haemaphysalis longicornis*: molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. *Exp. Parasitol.* 2007.
- VALDÉS, J. J.; Antihistamine response: A dynamically refined function at the host-tick interface. *Parasites and Vectors*, 2014.
- VALENZUELA, J. G.; Francischetti, I. M. B.; Garfield, V. M.; Pham, M. K.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C.; Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol*. Volume 205, Pages 2843–2864, 2002.
- VAN GENT, D.; Sharp, P.; Morgan, K.; Kalsheker, N.; Serpins: structure, function and molecular function. *Int J Biochem Cell Biol*. Volume 35, issue 11, pages 1536-47. 2003.
- VARRICCHIO, L.; Falchi, M.; Dall'Ora, M.; De Benedittis, C.; Ruggeri, A.; Uversky, V. N.; et al.; Calreticulin: Challenges Posed by the Intrinsically Disordered Nature of Calreticulin to the Study of Its Function. *Frontiers in cell and developmental biology*. 5:96. 2017.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B.; Carvalho, J. E.; Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Curr Pharm Des.*; 18:3831–3852. 2012.

- WANG, X.; e colab.; Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. Journal of Biological Chemistry, 1996.
- WAXMAN, L.; Smith, D. E.; Arcuri, K. E.; Vlasuk, G.P.; Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Is a Novel Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. Science, Vol. 248, pages 593-596. 1990.
- WIJEYESAKERE, S. J.; Gafni, A. A.; Raghavan, M.; Calreticulin is a thermostable protein with distinct structural responses to different divalent cation environments. J Biol Chem. 286(11):8771–85, 2011.
- XU, G.; Fang, Q. Q.; Keirans, J. E.; Durden, L. A.; Cloning and sequencing of putative calreticulin complementary DNAs from four hard tick species. Journal of Parasitology, 90(1), 73-78. 2004.
- XU, T.; Lew-Tabor, A.; Valle, M. R.; Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*, Ticks and Tick-borne Diseases, Volume 7, Issue 1, Pages 180-187. 2016.
- ZARBOCK, A.; Polanowska-Grabowska, R. K.; Ley, K.; Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. Blood Rev., 21 (2):99–111. 2007.