



Instituto Nacional de  
Ciência e Tecnologia em  
Entomologia Molecular

# TÓPICOS AVANÇADOS EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR

2<sup>a</sup> edição

Andréa Cristina Fogaça  
Itabajara da Silva Vaz Junior  
ORGANIZADORES



**TÓPICOS AVANÇADOS EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR**

**Andréa Cristina Fogaça**  
**Itabajara da Silva Vaz Junior**  
Organizadores

**2ª edição**

**Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM**  
**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Porto Alegre**  
**2024**

© 2024 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM

This is an open-access work distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Elaboração e promoção:**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Financiamento:**

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM,  
CNPq, CAPES, FAPERJ

**Organização:**

Andréa Cristina Fogaça, Itabajara da Silva Vaz Junior

**Revisão de texto:**

Sylvia Furtado Félix

**Capa e diagramação:**

Adriana Silva da Silva

**Dados internacionais de catalogação na publicação**

T674	Tópicos avançados em entomologia molecular [recurso eletrônico] / Andréa Cristina Fogaça, Itabajara da Silva Vaz Junior, organizadores. – 2. ed. – Dados eletrônicos (1 arquivo : 26.068 KBytes). Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2024. 923 p. : il. color.  Livro digital Formato: PDF  ISBN 978-65-5973-430-6  1. Artrópodes. 2. Doenças. 3. Diagnóstico. 4. Transmissão. 4. Entomologia. 5. Parasitas-hospedeiros. I. Fogaça, Andréa Cristina. II. Vaz Junior, Itabajara da Silva.  CDD 595.7
------	---

Catalogação na fonte: Maurício de Vargas Corrêa – CRB-10/2370

**Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

91501-970 - Porto Alegre - RS



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular  
Tópicos Avançados em Entomologia Molecular  
INCT – EM – 2024

**INCTEM**

---

## CAPÍTULO 25

# Desenvolvimento de Vacinas contra Carrapatos

---

**Jéssica Waldman<sup>1</sup>**  
**Luís Fernando Parizi<sup>1</sup>**  
**Abid Ali<sup>2</sup>**  
**Itabajara da Silva Vaz Junior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

<sup>2</sup>Abdul Wali Khan University Mardan, Mardan, Paquistão.

## Considerações iniciais

Os carrapatos são ectoparasitos obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres. Há, atualmente, cerca de 950 espécies de carrapatos descritas (Guglielmone et al., 2020), distribuídas em duas famílias principais: Argasidae (família dos carrapatos moles [*soft ticks*], ausência de um rígido escudo quitinoso no dorso de macho e fêmea) com, aproximadamente, 200 espécies (Ali, et al., 2022) e Ixodidae (família dos carrapatos duros [*hard ticks*], apresentam um escudo dorsal) com mais de 700 espécies. Há, também, uma terceira família, Nuttalliellidae, que apresenta apenas uma espécie, que vive apenas no sul da África (Guglielmone et al., 2020). Todas as espécies descritas alimentam-se do sangue de seus hospedeiros e, durante esse processo, podem transmitir uma variedade de patógenos. Há uma crescente importância desses parasitos na saúde humana e animal, devido à transmissão de patógenos ao homem e aos animais e às perdas econômicas decorrentes dos custos da prevenção e do tratamento das doenças. O controle desses ectoparasitos é baseado, majoritariamente, no uso de acaricidas sintéticos; porém, o uso incorreto desses compostos levou à seleção de populações a eles resistentes. Essas drogas também apresentam toxicidade a outros organismos (Obaid et al., 2022). Apesar dos problemas relacionados ao uso dos acaricidas, ainda não há formas de controle alternativas eficazes, que possam substituí-lo. Nesse sentido, o desenvolvimento de vacinas anticarrapatos torna-se uma alternativa técnica e economicamente viável. Ademais, vacinas não são prejudiciais a outros animais, ao consumidor e ao meio ambiente, como os acaricidas sintéticos.

Neste capítulo, será abordada, principalmente, a espécie *Rhipicephalus microplus*, responsável por grandes impactos econômicos no Brasil e no mundo, bem como serão analisadas estratégias utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra esse e outros carrapatos. A ênfase será dada ao desenvolvimento de diferentes alternativas para o controle desse ectoparasito, sendo descrito o ciclo biológico. Em seguida, será realizada uma análise de estudos envolvendo possíveis alvos para o desenvolvimento do controle imunológico, através de vacinas. Também serão apresentados aspectos relevantes da história do desenvolvimento de vacinas contra carrapatos (Tabela 1).

Ano/ Pesquisadores	Eventos
1918 Johnston et al.	Observação de resistência em carrapatos de campo
1976 Roberts e Kerr	Transferência passiva de anticorpos
1976 Brossard	Imunização com antígenos de glândula salivar
1982 Wikel	Caracterização da imunidade mediada por células
1988 Willadsen et al.	Purificação da Bm86
1994 Riding et al.	Purificação e clonagem da Bm91
1994/1995	Testes de campo com Bm86 (vacina comercial)
1996 Willadsen et al.	Imunização com Bm86-Bm91
1998 McKenna et al.	Purificação e imunização com BMA7
1999 De-Rose et al.	Vacina de DNA (gene da Bm86)
2000 García-García et al.	Imunização com Bm95
2002 Andreotti et al.	Imunização com inibidores de proteinases
2002 Patarroyo et al.	Imunização com peptídeos sintéticos de Bm86
2002 Valenzuela et al.	Transcriptoma da saliva de <i>I. scapularis</i>
2005 Guerrero et al.	Proposta de sequenciar o genoma do <i>R. microplus</i>
2005 Hill et al.	Genoma do <i>I. scapularis</i>
2011 Parizi et al.	Imunização de bovinos com HIGST
2015 Ali et al.	Caracterização funcional de metaloproteases
2019 Ndaqula et al.	Vacina multi-antigênica GST de <i>R. decoloratus</i> e <i>A. variegatum</i>
2020 Tirloni et al.	Transcriptomas de órgão/estágio de <i>R. microplus</i>
2020 Jia et al.	Genoma de seis espécies de carrapatos
2020 Almazán et al .	Vacina multi-antigênica de neuropeptídeos contra carrapatos
2021 Sajid et al.	Vacina de mRNA previne transmissão de <i>B. burgdorferi</i>
2022 Scoles et al.	Vacina de peptídeos de aquaporinas reduz alimentação

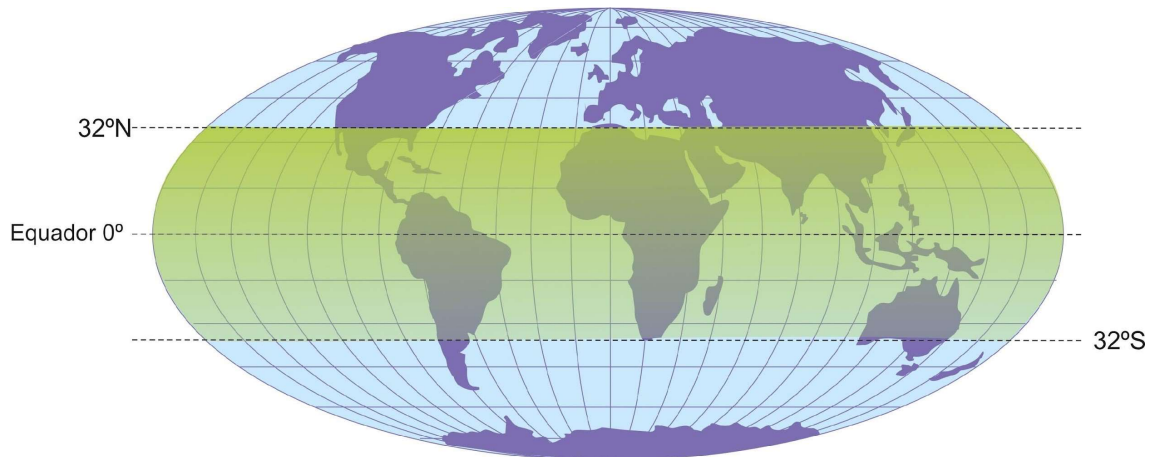
**Tabela I:** Eventos no estudo para uma vacina contra carrapato.

Fonte: Arquivo pessoal

## O carrapato *R. microplus*

No Brasil, prejuízos significativos à pecuária são causados, principalmente, pelo carrapato bovino *R. microplus* (Grisi et al., 2014), que pertence à família Ixodidae. Essa espécie já foi denominada de *Boophilus microplus*. Entretanto, uma reclassificação foi feita em 2003 (Murrell et al., 2003), com base em análises moleculares e morfológicas, na qual se concluiu que esse carrapato deveria ser incluído no gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*. *Rhipicephalus microplus*

é originário da Ásia Meridional e tem os bovídeos como seus principais hospedeiros. Ele também se encontra amplamente distribuído nos rebanhos das Américas, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S (Jonsson et al., 2000). É um dos principais parasitos que afetam a pecuária bovina dessas áreas, tendo seu desenvolvimento favorecido pelas condições climáticas (Figura 1).



**Figura 1:** Regiões de ocorrência natural do carrapato *Rhipicephalus microplus* nos rebanhos das Américas, África, Ásia e Oceania (áreas delimitadas em verde).

Fonte: Arquivo pessoal

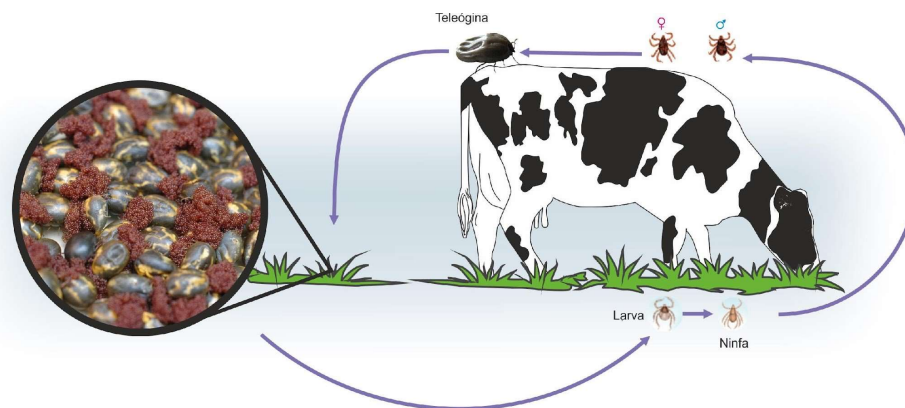
## Ciclo biológico

No ciclo biológico do carrapato *R. microplus*, a fêmea ingurgitada (teleógi-na), que apresenta um aumento de mais de dez vezes o tamanho corporal causado pelo volume de sangue e fluídos do hospedeiro ingeridos durante o final da fase parasitária, se desprende do hospedeiro, procura um local mais úmido e ao abrigo do sol (como a superfície do solo junto às raízes de plantas), e inicia a postura dos ovos (de 2.500 a 3.000 ovos) (Figura 2), morrendo ao término da postura. Posteriormente, as larvas eclodem dos ovos e, após alguns dias, sobem pelas gramíneas e arbustos, aguardando a passagem dos hospedeiros para se fixarem, dando início à fase parasitária, que dura, em média, 21 dias. Entretanto, dependendo da temperatura e da umidade ambiental, a larva pode sobreviver por até quatro meses sem encontrar um hospedeiro.

Após fixar-se e se alimentar no hospedeiro, a larva sofre muda, com o desenvolvimento de uma nova cutícula, passando para o estágio de ninfa, que por sua vez, se ingurgita e sofre nova muda, ocorrendo a diferenciação sexual para macho ou fêmea. Após a cópula, a fêmea inicia o ingurgitamento, passando para a fase de fêmea parcialmente ingurgitada (partenógina). Um grande aumento da

sua massa corpórea ocorre nas últimas 24 horas, quando, totalmente ingurgitada, finalmente ela se desprende do hospedeiro, dando início a um novo ciclo. Os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro e podem fecundar outras fêmeas.

No Brasil, principalmente na região Sul, durante a primavera e o verão, diferenças nas temperaturas e umidade relativa do ar estão associadas à variação do intervalo de tempo da fase não-parasitária. São observados, nesse período, os maiores índices de produção e de viabilidade dos ovos e, por consequência, uma maior abundância de larvas. No outono e inverno, ocorre o prolongamento da fase não-parasitária e a diminuição da eficiência reprodutiva e da taxa de eclosão das larvas. Além disso, as baixas temperaturas estão associadas a uma maior permanência das larvas nos campos, resultando de três a quatro gerações anuais de *R. microplus* no sul do Brasil.



**Figura 2:** Ciclo biológico do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Em destaque, fêmeas realizando a postura dos ovos.

Fonte: Arquivo pessoal

## Prejuízos relacionados ao parasitismo

O parasitismo realizado por *R. microplus* acarreta diversos danos econômicos (Grisi et al., 2014), o que torna esse parasito um dos principais alvos de controle nos rebanhos da América do Sul (Nari et al., 1995). Cada fêmea dessa espécie se alimenta, em média, de 2 a 3 mL de sangue do seu hospedeiro (Gonzales, 1995), o que resulta em significativas perdas na produção de leite e carne (Jongejan et al., 2004; Jonsson et al., 2006), bem como em danos na pele causados por reações inflamatórias, nos locais de fixação do carrapato (Seifert et al., 1968). Esse parasito pode atuar como vetor de agentes causadores de doenças, como os protozoários do gênero *Babesia* e as bactérias do gênero



*Anaplasma*, causadores da tristeza parasitária bovina (Jonsson et al., 2006). Além disso, existem diversos custos relacionados à mão-de-obra necessária para seu controle, tais como despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e compra de equipamentos adequados para aplicação desses compostos sintéticos nos rebanhos (Cordoves, 1996). Em 2016, estudos revelaram uma perda mundial anual de até 30 bilhões de dólares na atividade pecuária devido a infestações por *R. microplus* (Tabor, 2021).

O principal método de controle dos carrapatos, que tem sido utilizado desde a década de 50, é o uso de acaricidas sintéticos (Pruett, 1999). Apesar de ser, atualmente, o único método eficaz para uso em larga escala, é dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Atualmente, as sete principais classes de acaricidas que estão disponíveis comercialmente são: i) organofosforados; ii) piretroides sintéticos; iii) lactonas macrocíclicas; iv) formamidinas; v) benzoil fenil ureias; vi) fenilpirazóis e vii) isoxazolininas (Gassel et al., 2014; Reck et al., 2014; Zhou et al., 2022). A troca dos princípios ativos ou a sua combinação têm sido uma necessidade, devido à seleção de populações resistentes a esses compostos (Jongejan et al., 2004). Interessantemente, *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente do que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (Kocan, 1995). No Brasil, já foram descritas populações de carrapatos de campo multirresistentes a todas as classes de acaricidas disponíveis (Reck et al., 2014; Dzemo et al., 2022; Rodriguez-Vivas et al., 2018; Vilela et al., 2020), o que impõe a necessidade de desenvolver formas alternativas de controle para essa espécie.

## **Controles alternativos contra os carrapatos**

### **Biológico**

O controle biológico de *R. microplus* inclui a seleção de raças de bovinos menos sensíveis ao carrapato, cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do parasito (Farias et al., 1986; Sutherst et al., 1982), ação de predadores naturais, como a garça-vaqueira *Egretta ibis* (Alves-Branco et al., 1983) e as formigas (Gonzales, 1995), manejo do rebanho (Wharton et al., 1980) e rotação de pastagens (Elder et al., 1980).

A utilização de fungos no controle desse parasito também tem sido muito investigada, sendo identificados isolados de *Metarhizium robertsii* (anteriormente conhecido como *Metarhizium anisopliae*) ocorrentes no Brasil, infectantes naturais de *R. microplus* (da Costa et al., 2002). Interessantemente, a aplicação

de *M. robertsii* em conjunto com cipermetrina e clorpirifós se mostrou efetiva no tratamento contra *R. microplus*, reduzindo a viabilidade dos carrapatos em 97,9% nos grupos tratados (Webster et al., 2015). Além disso, quando incubados com acaricida por mais de cinco dias, esses fungos não perdem sua capacidade de infectar o carrapato, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (Kaaya et al., 1996).

Ensaio *in vitro* e a campo têm demonstrado que esse fungo causa mortalidade também em outras espécies de carrapato, bem como reduz o tamanho das gerações subsequentes, devido a efeitos na eficácia reprodutiva das fêmeas infectadas (Fernandes et al., 2008). A aplicação de *M. robertsii* reduz o número de ninfas de *Ixodes scapularis* (Bharadwaj et al., 2010); foi também demonstrado que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados do fungo podem causar morte de até 100% dos carrapatos por eles infectados (Frazzon et al., 2000). Apesar dos resultados promissores com carrapatos, o desenvolvimento tecnológico de pesticidas biológicos baseados em fungos, denominados micoinseticidas ou micoacaricidas, têm avançado lentamente, embora haja expectativa para um uso mais amplo, tendo em vista a sua utilidade no controle de patógenos de plantas (Michereff Filho et al., 2009). O uso desse método alternativo ainda depende da identificação de novas linhagens e de avanços nas estratégias de produção, formulação e aplicação que resultem no desenvolvimento de novos produtos (Polar et al., 2008; Samish et al., 2004). Outros parasitos, tais como nematódeos, também têm sido avaliados como possíveis agentes no controle biológico de carrapatos, pois têm se mostrado eficientes no controle de insetos (Samish et al., 2001, 2004;).

Além disso, a utilização de fitoterápicos, com atividades pesticidas, também tem sido considerada. Em bovinos, foram testadas concentrações diferentes de spinosad, um acaricida natural obtido a partir da mistura de dois metabólitos de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), espinosina A e D. Os resultados mostraram uma queda drástica no número de teleóginas, na massa de ovos e no índice de fecundidade (Davey et al., 2001). Interessantemente, reduzidos níveis de resistência em *R. microplus* foram observados quando foi realizado um tratamento rotativo entre amitraz e spinosad (Jonsson et al., 2010). Além disso, foi mostrado que, em bovinos banhados com moxidectina, um composto endectocida (produto utilizado no controle de ecto e endoparasitos), que também atua como anti-helmíntico, a infestação por carrapatos foi reduzida em quase 95% (Guglielmone et al., 2000).

Extratos de plantas com propriedades acaricidas e repelentes também podem ser uma alternativa para o controle dos carrapatos. O tratamento de *R.*

*microplus* com extratos de óleos essenciais de orégano (*Lippia graveolens*), alho (*Allium sativum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) demonstrou 100% de mortalidade (Martinez-Velazquez et al., 2011). Além disso, a exposição a compostos do orégano também leva a uma redução na oviposição de fêmeas de carrapatos (Flores-Fernández et al., 2016). Também foi observado que gramíneas, tais como as do gênero *Stylosanthes*, que produzem fluidos viscosos venenosos para os carrapatos, são capazes de repelir, capturar e até mesmo matar os carrapatos (Kaaya, 2000). Dessa forma, é possível que, no futuro, acaricidas naturais venham a assumir o papel dos compostos sintéticos como método para o controle dos carrapatos.

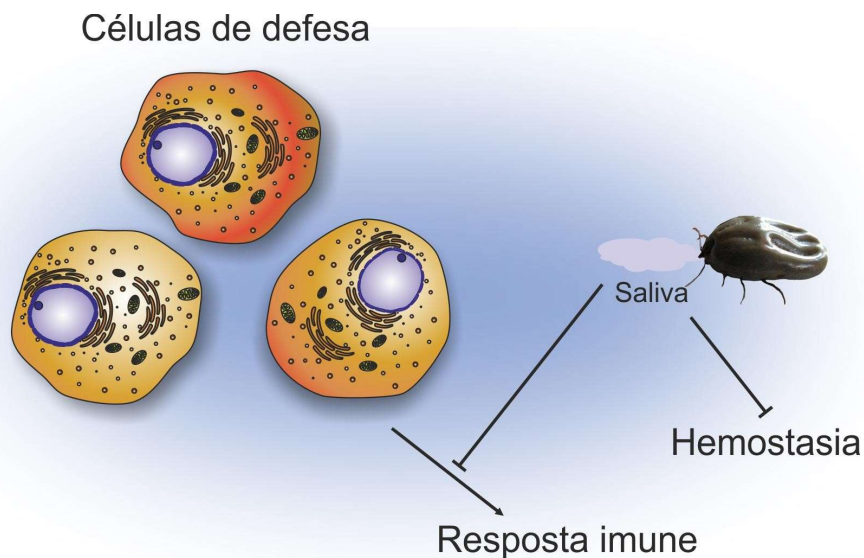
## Desenvolvimento de vacinas

O controle de carrapatos através do sistema imunológico do hospedeiro tem sido investigado nos últimos cem anos (Johnston et al., 1918) e tem se imposto, cada vez mais, como alternativa ou complemento ao uso de acaricidas. Mais recentemente, o uso da biotecnologia tem permitido o desenvolvimento de novas estratégias para a pesquisa, desenvolvimento, formulação e produção de vacinas. Para o desenvolvimento de uma vacina, a identificação de moléculas do parasito capazes de induzir uma resposta imune protetora é essencial e, para isso, é necessário o conhecimento dos mecanismos da resposta imunológica do animal a ser vacinado. Nesse sentido, descobriu-se que bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória contra moléculas dos carrapatos, o que permite uma resposta imune mais eficiente em futuras infestações (Wikel, 1996). A importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz foi bem definida, apesar de não estar totalmente esclarecida a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra carrapatos (Wikel et al., 1997). A imunidade adquirida, obtida pelo hospedeiro após repetidas infestações com carrapatos, serve como base para os estudos na busca de potenciais antígenos vacinais (Ali et al., 2022; Narasimhan et al., 2020).

Um fator importante para o desenvolvimento de vacinas é que a saliva dos carrapatos, secretada durante a infestação, apresenta a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, interferindo na produção de interleucinas pelos macrófagos bovinos, assim como a proliferação das células mononucleares (Figura 3) (Kotál et al., 2015; Turni et al., 2002). Além disso, a alimentação do carrapato, quando realizada em hospedeiros de espécies diferentes, promove a expressão de um perfil específico de proteínas na saliva, ou seja, proteínas são

diferencialmente expressas de acordo com o hospedeiro no qual o parasito realiza a sua alimentação (Tirloni et al., 2017). Além disso, o padrão transcricional é modulado, resultando em proteínas diferencialmente expressas nas glândulas salivares, de acordo com o estágio em que o carrapato se encontra e o tempo de alimentação (Garcia et al., 2020). Interessantemente, foi demonstrado que a picada do carrapato, bem como sua alimentação, também induz diferenças na transcrição de genes das células da pele, que codificam para proteínas imunomodulatórias e anti-inflamatórias, considerando hospedeiros suscetíveis e resistentes. Em bovinos suscetíveis, tem se observado um recrutamento tardio de células pró-inflamatórias (Franzin et al., 2017), enquanto a hipersensibilidade cutânea apresentada por bovinos resistentes é mais rápida, quando comparada aos animais suscetíveis. Adicionalmente, a identificação de possíveis genes, relacionados ao fenótipo de resistência de bovinos a carrapatos, já pode ser realizada (Otto et al., 2018). O entendimento dos padrões transcricionais e proteômicos nas diferentes fases do estágio de vida do carrapato, assim como a indução da expressão diferencial por diferentes hospedeiros, poderá acelerar a identificação de potenciais antígenos vacinais.

Outro ponto importante é que a resposta humoral e o desenvolvimento natural de resistência podem ser influenciados pelo nível de infestação do hospedeiro e, conseqüentemente, pela quantidade de antígenos salivares nele injetados durante a alimentação (Cruz et al., 2008). Proteínas do cimento [secreção da glândula salivar, que se solidifica em volta das peças bucais, evitando o extravasamento de fluidos e auxiliando a fixação do carrapato no hospedeiro (Suppan et al., 2018)] e proteínas ricas em glicina são produzidas, durante o início do parasitismo, sendo importantes para o sucesso da fixação do carrapato (Hollmann et al., 2018). Além disso, proteínas importantes para a regulação da hemostase, como a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária, a angiogênese, e proteínas envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro (Šimo et al., 2017) estão presentes na saliva e são secretadas, durante a alimentação. Um exemplo importante são as serpinas (inibidores de serino proteases), que modulam as serino proteases do hospedeiro. De fato, a redução da transcrição e, conseqüentemente, dos níveis proteicos de duas serpinas, leva à ingestão de uma menor quantidade de sangue pelo carrapato *Amblyomma americanum* (Kim et al., 2020). Em *I. scapularis* foi mostrado que a imunização de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) com glicoproteínas da saliva é suficiente para restaurar a resistência desse hospedeiro contra a infestação por esse carrapato (Narasimhan et al., 2020).



**Figura 3:** Ação da saliva de carrapatos durante a alimentação. A saliva contém diversas moléculas que interferem na fisiologia do hospedeiro, como na inibição dos mecanismos da resposta imunológica e cascata de coagulação.

Fonte: Arquivo pessoal

### **A primeira vacina comercial contra carrapatos: Bm86**

A primeira vacina comercial contra carrapatos, desenvolvida pelo grupo australiano liderado por Willadsen (Willadsen et al., 1988), foi baseada em uma proteína purificada do intestino de carrapato, denominada de Bm86. Esse foi um marco, uma vez que também foi a primeira vacina desenvolvida contra parasitos. A imunização com a Bm86 induz uma resposta imunológica protetora em bovinos e foi usada como base de duas vacinas comercializadas: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO (Jonsson et al., 2000), e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba (de la Fuente et al., 1999). Posteriormente, foi proposta a teoria dos antígenos ocultos, em que um potencial antígeno para a produção de uma vacina seria aquele que não fosse exposto ao sistema imunológico do hospedeiro durante uma infestação natural, como, por exemplo, proteínas do intestino ou outros órgãos internos.

Essa hipótese foi baseada no fato de que os carrapatos não teriam desenvolvido nenhum mecanismo de evasão contra a resposta imunológica do hospedeiro para esses antígenos. Isso seria resultante da falta de pressão seletiva para esses alvos durante a evolução. Existem, ainda, outros antígenos, como a 64TRP (descrita adiante) que, quando usados em vacinas, resultam em resposta imune para epítomos antigênicos secretados e ocultos (Nuttall et al.,

2006). Embora o 64TRP seja um antígeno exposto, a resposta imune gerada reage de forma cruzada com epítomos antigênicos ocultos, em diferentes tecidos e estádios de *Rhipicephalus appendiculatus* (Trimnell et al., 2002, 2005). Corroborando essa resposta, constatou-se que, apesar de 64TRP ser um antígeno exposto, a infestação de carrapatos em animais imunizados resulta em um reforço vacinal para os antígenos ocultos. Isso é observado pelo aumento do título de anticorpos para essas proteínas.

Em Cuba, foram analisados os efeitos da vacinação de mais de meio milhão de bovinos com a Gavac, durante oito anos. Os resultados mostraram que o uso da vacina permitiu reduzir em 87% a necessidade de acaricidas e, também, causou uma redução de 96% nos casos de babesiose (Valle et al., 2004). No entanto, tanto a TickGard como a Gavac não asseguram o grau de proteção necessário para substituir o uso de acaricidas, devido a uma variação de eficácia observada quando a vacina é utilizada em diferentes regiões do mundo (Willadsen et al., 1996; Jonsson et al., 2000). Análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene da Bm86, que tornam os carrapatos resistentes à vacinação. A variabilidade na sequência do gene Bm86 é um dos possíveis responsáveis pela variação no grau de proteção induzida pelas vacinas que utilizam esse antígeno (García-García et al., 2000).

Esse polimorfismo decorre de uma mutação de ponto, que cria um códon de terminação no gene. Como consequência, tem-se a produção de uma proteína solúvel ao invés de uma proteína de membrana, que é detectada em carrapatos da Austrália e de Cuba. Além disso, foi observada uma variação de 6% na sequência de aminoácidos da Bm86 de isolados de carrapatos obtidos de diferentes localidades da América do Sul (Sossai et al., 2005). A Bm86 isolada de carrapatos coletados no sul do Texas apresentou 90% de identidade para as sequências de Bm86 australiana e cubana (Freeman et al., 2010).

Visando melhorar os resultados obtidos com a proteína Bm86, foram selecionadas três regiões imunogênicas dessa proteína para a produção de peptídeos sintéticos (Patarroyo et al., 2002). Bovinos imunizados com os peptídeos produziram anticorpos que foram capazes de reconhecer a Bm86 *in situ*, especialmente no interior dos vacúolos digestivos. Os resultados da infestação experimental por *R. microplus* demonstraram uma eficácia da vacinação entre 36 a 81% (Patarroyo et al., 2002, 2020).

Além disso, um segundo antígeno oculto, Bm91, foi avaliado. Quando a Bm91 foi associada à Bm86, um pequeno aumento da eficácia da vacinação foi observado (Willadsen et al., 1996; Riding et al., 1994). Posteriormente, uma nova vacina recombinante foi desenvolvida, utilizando a Bm95, homóloga à Bm86,



presente em carrapatos argentinos. Essa vacina mostrou-se eficaz na proteção dos bovinos contra infestações tanto de carrapatos presentes na Argentina, como em Cuba (García-García et al., 2000). Sendo assim, os resultados parcialmente efetivos obtidos com diferentes antígenos geraram confiança sobre a viabilidade técnica do desenvolvimento de uma vacina contra carrapatos.

Embora a Bm86 e seus homólogos sejam a base das vacinas comerciais já desenvolvidas contra carrapatos, a associação com outros antígenos em uma mesma vacina pode aumentar a proteção induzida (Parthasarathi et al., 2003). Para o sucesso dessa estratégia, é necessário a identificação de novas moléculas com potencial de induzir uma resposta imune protetora. Além disso, apesar de não ser essencial, a caracterização das funções biológicas e a participação em mecanismos de interação parasito-hospedeiro de moléculas do carrapato pode auxiliar na identificação de potenciais antígenos protetores. Com base em diferentes estudos, outras proteínas, além dos antígenos descritos anteriormente, têm sido identificadas como potenciais antígenos vacinais.

## **Estratégias para o desenvolvimento de vacinas**

Uma estratégia anteriormente aplicada na identificação de potenciais antígenos vacinais foi a imunização com clones derivados de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) em vetores de expressão. O método consiste na imunização de animais com grupos aleatórios de cDNA clonados em vetores de expressão de eucariotos. Quando os animais são inoculados com os plasmídeos, as regiões codificadoras de genes do parasito são transcritas e traduzidas, resultando em expressão de proteínas do carrapato no vertebrado, induzindo uma resposta imune e a produção de anticorpos contra as proteínas do parasito. A seguir, os animais são infestados com larvas para se observar o efeito protetor da imunização, que é avaliada comparando o desenvolvimento dessas larvas com o desenvolvimento daquelas alimentadas em animais não vacinados. Em *I. scapularis*, foram identificadas três proteínas com capacidade de induzir uma resposta imune protetora (Almazán et al., 2003). A capacidade imunoprotetora não foi só para a infestação por *I. scapularis*, mas também para a infestação por *Dermacentor variabilis* e *A. americanum* (Almazán et al., 2003, 2005a, 2005b).

## **Estudos ômicos para o estudo da fisiologia do carrapato**

Atualmente, metodologias “ômicas” como transcriptômica, proteômica, imunogenômica, biologia de sistemas e bioinformática têm sido utilizadas para

auxiliar o desenvolvimento de novas vacinas. A necessidade de conhecer o genoma para avançar na pesquisa sobre carrapatos e patógenos transmitidos por eles tem sido reconhecida há vários anos. O primeiro organismo a ter o seu genoma completo sequenciado foi a bactéria *Haemophilus influenzae*, em 1995, seguindo-se de genomas de outros microrganismos e de genomas de organismos eucarióticos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 1996, *Drosophila melanogaster* em 2000 e o genoma humano em 2003. Em 2004, um consórcio internacional de pesquisadores iniciou um primeiro esforço para obter a sequência completa do genoma de carrapatos relevantes para a medicina humana. O carrapato *I. scapularis*, transmissor de *Borrelia burgdorferi* (causador da doença de Lyme), *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmose) e *Babesia microti* (responsável pela babesiose) (Belongia et al., 2002; Krause et al., 2002), foi o primeiro carrapato a ter o genoma sequenciado em 2016 (Gulia-Nuss et al., 2016). Apesar dos esforços realizados, o sequenciamento dos genomas de carrapatos foi demorado, devido a dificuldades técnicas, uma vez que esses genomas são grandes e possuem muitas regiões repetitivas (Barrero et al., 2017; Hill et al., 2009; Palmer et al., 1994; Ullmann et al., 2005).

Recentemente, genomas de sete espécies de carrapatos ixodídeos foram estudados (Gulia-Nuss et al., 2016; Jia et al., 2020), quando foi explorada a base genética comum dos carrapatos, incluindo digestão de heme e hemoglobina, metabolismo do ferro e espécies reativas de oxigênio, os quais são alvos averiguados para o desenvolvimento de métodos de controle para os carrapatos. Na análise comparativa, diferentes perfis genéticos e a distinta composição de patógenos, como *Babesia sp.*, *Rickettsia sp.* e *Ehrlichia sp.*, foram observados entre as espécies de carrapatos estudadas, sugerindo, pela primeira vez, que isso possa estar relacionado à adaptação dos ectoparasitos em relação à distribuição geográfica e aos hospedeiros parasitados (Jia et al., 2020). Além disso, vários novos grupos de proteínas exclusivas de carrapatos foram e continuam sendo identificados.

Em 2011, o sialoma do carrapato *Amblyomma variegatum* foi descrito em um estudo proteômico das glândulas salivares desse parasito (Ribeiro et al., 2011). As principais revelações trazidas pelos projetos de sialoma de carrapatos, realizados nas últimas décadas, foram revisadas recentemente (Martins et al., 2021). Entre elas, destaca-se o desenvolvimento de alguns medicamentos derivados de moléculas dos carrapatos e identificação de alvos na fisiologia do carrapato, que podem ser utilizados para a obtenção de novos métodos de controle, incluindo acaricidas e vacinas. Proteínas secretadas na saliva despertam o interesse como antígenos vacinais, uma vez que são inoculadas



durante a alimentação do carrapato e modulam o sistema imune do hospedeiro (Kim et al., 2020; Tirloni et al., 2020), e a inibição de suas funções pode dificultar a alimentação e/ou digestão. Entretanto, mais observações são necessárias para identificar esses alvos, entre eles o estágio de alimentação e o hospedeiro em que o parasito se alimenta.

Foi demonstrado que o perfil proteico da saliva sofre alterações, de acordo com a fase de alimentação em que o carrapato se encontra (parcialmente ou totalmente alimentado) (Tirloni et al., 2014), bem como o estágio de vida (ninfas ou adultos) (Tirloni et al., 2015). Além disso, observou-se que a estimulação da alimentação do carrapato, quando realizada em diferentes hospedeiros e, de acordo com o tempo transcorrido da alimentação, também influenciam na composição e secreção das proteínas presentes na saliva. A maioria das proteínas associadas à transmissão de patógenos e à regulação da alimentação é secretada nos estágios iniciais (até 48 horas) (50,86). Por isso, proteínas presentes nas diferentes condições são consideradas candidatas a serem estudadas como antígenos vacinais.

Além disso, a busca por outros alvos envolvendo a caracterização de moléculas do sistema nervoso central, que coordenam processos fisiológicos, pode ajudar no estudo de novos métodos para o controle dos carrapatos. Um neuro-hormônio, o periviscerokinina, envolvido na regulação do balanço osmótico em *Ixodes ricinus* e *R. microplus* foi identificado (Neupert et al., 2005). Uma análise do singânglio (sistema nervoso central) do *I. scapularis* revelou a presença de neuropeptídeos e precursores com alta similaridade com neuropeptídeos de insetos (Neupert et al., 2009). Alguns genes transcritos nesse órgão e em órgãos neurosecretórios acessórios do carrapato *D. variabilis* codificam para acetilcolinesterases, receptor muscarínico de acetilcolina (Ach), receptores de dopamina, receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), transportadores de GABA, entre outros (Bissinger et al., 2011). Também foram identificados hormônio de eclosão, corazonina e bursicon no singânglio de *D. variabilis*. Em insetos, essas moléculas participam da regulação do desenvolvimento da cutícula e da muda, sistemas que podem ser modulados para regular a alimentação hematófaga (Bissinger et al., 2011).

Mais recentemente, foram estudados transcriptomas de *R. microplus* órgão/estádio específico (embrião e ovário, glândulas salivares, singânglio, corpo gorduroso e intestino de fêmeas, parcialmente e totalmente ingurgitadas) (Tirloni et al., 2020; Waldman et al., 2022). Precursores de neuropeptídeos foram identificados em um transcriptoma de *R. microplus* e no genoma de diferentes espécies de carrapatos: *R. microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato,

*Ixodes persulcatus*, *Dermacentor silvarum*, *Haemaphysalis longicornis* e *Hyalomma asiaticum* (Jia et al., 2020, bem como em *I. scapularis* (Gulia-Nuss et al., 2016). Como previsto, a maioria das sequências de precursores de neuropeptídeos apresenta mais transcritos no singânglio de *R. microplus* do que nos outros órgãos e estádios avaliados. Além disso, alguns neuropeptídeos foram descritos pela primeira vez em carrapatos, sendo ainda necessário a caracterização fisiológica e funcional (Waldman et al., 2022). Também foi testada uma vacina multiantigênica, usando os neuropeptídeos SIF amida e o peptídeo mioinibitório de *I. scapularis* como antígenos vacinais. Embora tenha levado à produção de altos níveis de anticorpos IgG, a vacinação não reduziu a infestação por carrapatos (Almazán et al., 2020). Esses trabalhos identificaram muitas proteínas, cujas funções permanecem desconhecidas, gerando oportunidades de estudos para análise funcional e/ou descobertas de novos compostos farmacológicos.

Em outra estratégia, a vacinologia reversa permite identificar *in silico* potenciais antígenos vacinais inferidos, com base nas sequências disponibilizadas pelos estudos transcriptômicos (Lew-Tabor et al., 2016; Rappuoli et al., 2000). Em um estudo do sialotranscriptoma (do grego, *sialon*, saliva) de *Rhipicephalus Bursa*, foram selecionados alvos associados à membrana ou secretados pelo carrapato (Couto et al., 2021). Essas proteínas são exclusivas do parasito e são capazes de estimular células T e B em uma resposta imune robusta, assim como não são alergênicos ou tóxicos para o hospedeiro (Couto et al., 2021). Além disso, proteínas possivelmente essenciais para *I. scapularis* foram, recentemente, identificadas e caracterizadas *in silico* (Ali et al., 2021). Uma vez preditas, as proteínas candidatas podem ser expressas e testadas *in vitro* ou *in vivo* e serem exploradas como antígenos vacinais. Com estratégia semelhante, foi realizada a predição de epítomos conservados de células B nas sequências de glutathione-S transferase (GST) de várias espécies de carrapatos de importância econômica (*R. microplus*, *R. appendiculatus*, *A. variegatum*, *H. longicornis* e *Rhipicephalus decoloratus*). Também foi demonstrado que um soro anti-GST recombinante reconheceu, de forma cruzada, os peptídeos derivados das diferentes GST (Ndawula et al., 2020).

A caracterização funcional de proteínas de parasitos por ensaios de RNA de interferência (RNAi) (Almazán et al., 2010; Barnard et al., 2012), também pode ser usada para identificar potenciais alvos vacinais. Por exemplo, o silenciamento de serpinas mediado por RNAi leva à ingestão de menor quantidade de sangue por *A. americanum*. A inibição da atividade de uma serpinapelo uso de anticorpos produz o mesmo efeito, reforçando a sugestão de que essas proteínas sejam candidatos a antígenos vacinais (Kim et al., 2020).

Após a identificação de antígenos vacinais, diferentes estratégias podem ser aplicadas para potencializar a resposta imunogênica. Como exemplo, pode-se citar a seleção racional de peptídeos antigênicos baseada em estudos físico-químicos, com base na composição e estrutura das proteínas candidatas (Tong et al., 2014). Uma vacina na qual o antígeno é construído para conter duas ou mais sequências peptídicas de diferentes antígenos é denominada de vacina quimérica. Essa abordagem pode ser usada para aumentar a proteção gerada pela resposta imune do hospedeiro ou para desenvolver novas construções de vacinas.

Essa estratégia visa ao bloqueio simultâneo de várias funções dos carrapatos pela seleção de epítomos protetores e pela remoção de epítomos que não são imunogênicos e/ou interferem na resposta imune protetora. Esse conjunto de análises vem sendo aprimorado (Nuccitelli et al., 2011; Patarroyo et al., 2009; Shrivastava et al., 2013; Singh et al., 2012), resultando em uma estratégia racional para a identificação de sequências de aminoácidos para a composição de uma vacina quimérica. Foi proposto que diferentes antígenos/epítomos de carrapatos podem ser expressos como uma única proteína, que pode ter capacidade de induzir proteção cruzada contra outras espécies de carrapatos (Parthasarathi et al., 2003).

A relativamente nova técnica de CRISPR (Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas) é considerada uma ferramenta de edição de DNA com alta capacidade de manipulação de genes e elevada precisão, rapidez e menor custo (Adli et al., 2018; Lau et al., 2017). Essa técnica está sendo utilizada em muitos organismos, inclusive em parasitos (Bryant et al., 2019; McVeigh et al., 2019; Zhang et al., 2015), tanto para estudos básicos como para o tratamento de doenças (Mittal et al., 2019; Zhao et al., 2021). Até o momento, seu uso em carrapatos ainda é escasso pela falta de sequências genômicas bem estudadas e também por desafios técnicos relacionados à manipulação de ovos e embriões de carrapatos. Só recentemente que alguns protocolos estão sendo desenvolvidos para uso de CRISPR nesse ectoparasito (Sharma et al., 2022). Imagina-se que, futuramente, essa técnica seja de grande valia em estudos relativos aos mecanismos fisiológicos de carrapatos e patógenos transmitidos por eles (Nuss et al., 2021).

## **Alvos relacionados à embriogênese de carrapatos**

Diferentes alvos têm sido analisados para interferir em processos fisiológicos que possam ser úteis para o desenvolvimento de vacinas. Essa

estratégia requer o estudo das vias metabólicas, que ocorrem em diferentes órgãos e nos estádios de vida dos carrapatos. A seguir, estão ressaltados os principais estudos realizados com este objetivo:

A glicolipoproteína BYC (*Boophilus* Yolk *pro*-Cathepsin) participa na digestão da vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos do carrapato (Logullo et al., 1998). Bovinos imunizados com BYC produzem imunoglobulinas que migraram para a hemolinfa dos carrapatos que parasitavam esses animais. Efetivamente, imunoglobulinas bovinas circulantes na hemolinfa mantêm suas atividades biológicas (medida pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente). Esse resultado mostra que anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal do carrapato, e, possivelmente, se fixar em antígenos localizados em tecidos ou órgãos internos (da Silva Vaz et al., 1996). Por outro lado, a inoculação de fêmeas ingurgitadas com anticorpos monoclonais anti-BYC reduziu tanto o peso dos ovos, quanto a taxa de sobrevivência das fêmeas durante o período de postura, de forma dose-dependente (da Silva Vaz et al., 1998). Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas de *R. microplus*, houve a redução no número de teleóginas, na capacidade de postura e na viabilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%. Posteriormente, foi mostrado que a proteína BYC recombinante é imunoprotetora para bovinos, apresentando 25% de proteção contra *R. microplus* (Leal et al., 2006).

Além da BYC, o potencial imunogênico de proteínas envolvidas no metabolismo da vitelina foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelo experimental (Tellam et al., 2002). A sequência de duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina (VIT87 e GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente, foram analisadas. Essas proteínas apresentaram identidade em, no mínimo, 11 resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal, demonstrando serem altamente relacionadas (Tellam et al., 2002). Ovinos imunizados com VIT87 ou GP80 reduziram o número de larvas de *R. microplus* após um ciclo completo em 68% e 66%, respectivamente.

### **Alvos relacionados ao processo digestório dos carrapatos**

Inibidores de tripsina de *R. microplus* (BmTI) foram detectados em concentrações variáveis nas diferentes fases de desenvolvimento do carrapato, sugerindo terem um papel na interação parasito-hospedeiro. BmTIs, purificados de larvas, foram usados como antígeno para vacinação de bovinos que, então, foram desafiados com larvas de *R. microplus* (Andreotti et al., 2002). A eficácia total da vacinação com BmTIs foi de 73%.

O uso de serpinas como antígeno vacinal vem sendo explorado para diferentes espécies de carrapato (*R. microplus*, *I. ricinus*, *R. appendiculatus* e *A. americanum*) (Imamura et al., 2006; Imamura et al., 2008; Jittapalapong et al., 2010; Kim et al., 2016; Mulenga et al., 2000; Prevot et al., 2007). Como exemplo, duas serpinas de *H. longicornis* com atividade anticoagulante, quando inoculadas em coelhos, induzem proteção parcial (aproximadamente 40% de mortalidade dos parasitos) contra infestação pelo carrapato (Imamura et al., 2005; Sugino et al., 2003).

Também foram estudadas proteínas que armazenam ferro e que desempenham funções críticas no metabolismo, como as ferritinas. Nos carrapatos, as ferritinas são essenciais para a alimentação sanguínea, a reprodução, o transporte de ferro e a proteção contra o estresse oxidativo mediado pelo ferro durante a alimentação e a digestão do sangue (Galay et al., 2013; Galay et al., 2014; Hernandez et al., 2020; Oleaga et al., 2022; Zhao et al., 2022). Os carrapatos possuem duas formas de ferritinas, uma intracelular e uma secretada, sendo que essa última foi descrita apenas em carrapatos (Hajdusek et al., 2009). Ensaios de vacinação utilizando ferritinas reduziram o peso, o número e capacidade reprodutiva de diferentes espécies de carrapato (Galay et al., 2013; Githaka et al., 2020; Hajdusek et al., 2010), tornando essas proteínas candidatas para comporem vacinas mono e multi-antigênicas.

Ademais, uma superfamília de proteínas evolutivamente conservadas em bactérias a mamíferos, denominadas aquaporinas (AQP) foram analisadas. As AQP formam poros nas membranas celulares, através dos quais água e pequenos solutos neutros, incluindo glicerol e ureia, podem ser transportados. Em carrapatos, essas proteínas participam de vários processos fisiológicos, incluindo produção de saliva, alimentação, concentração do sangue ingerido e regulação do estresse osmótico (Pérez-Sánchez et al., 2022). Infestações por algumas espécies de carrapatos, entre elas *I. ricinus*, *R. microplus* e *R. sanguineus* sensu lato, foram reduzidas pela imunização dos hospedeiros quando AQP foram utilizadas como antígenos vacinais (Contreras et al., 2017; Scoles et al., 2022).

## **Alvos relacionados a modulação do sistema imune dos hospedeiros**

Metaloproteases são endopeptidases multidomínio e componentes bioativos-chaves em processos fisiológicos vitais de invertebrados. Dessa forma, são vistas como possíveis alvos para o controle de microrganismos e parasitos (Barnard et al., 2012). Por sua vez, os carrapatos dependem de metaloproteases

para a infestação. Essas enzimas estão envolvidas em interações moleculares complexas entre os carrapatos e os processos imunológicos, inflamatórios e hemostáticos do hospedeiro (Ali et al., 2015; Perner et al., 2020). Efetivamente, ensaios de vacinação de hospedeiros com essas endopeptidases afetam diversos parâmetros fisiológicos, como o inorgitamento e a fecundidade de *I. ricinus* (Decrem et al., 2008), a sobrevivência de *H. longicornis* (Imamura et al., 2009) e de *R. microplus* (Ali et al., 2015).

Cistatinas são inibidores reversíveis de cisteino endopeptidases que, entre outras funções, atuam como mediadoras da atividade proteolítica dentro dos lisossomos. Em carrapatos, essas endopeptidases são importantes para o sucesso da alimentação, como demonstrado em *A. americanum* (Karim et al., 2005), *H. longicornis* (Yamaji et al., 2009) e *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2007). Em *I. scapularis*, foi demonstrado que existem, pelo menos, duas cistatinas, sendo expressas em diferentes momentos do ciclo de vida e em diferentes tecidos (Kotsyfakis et al., 2007). Essas cistatinas inibem catepsinas L e S humanas, sugerindo que podem ter atividade na modulação do sistema imune e do remodelamento tecidual dos hospedeiros, facilitando a alimentação hematófaga. Imunizações de cobaias, camundongos e coelhos com cistatinas recombinantes conferiram proteção parcial contra *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2008), *Ornithodoros moubata* (Salat et al., 2010) e *R. microplus* (Parizi et al., 2020), respectivamente. Esses resultados demonstraram que as cistatinas têm um papel importante na alimentação dos carrapatos e, também, têm potencial para serem usadas como componentes de uma vacina contra esses parasitos.

## **Alvos relacionados a outros processos fisiológicos**

Além dos antígenos avaliados imunologicamente e descritos anteriormente, várias moléculas envolvidas em outros processos fisiológicos do carrapato e na sua interação com o hospedeiro têm sido propostas como possíveis antígenos vacinais.

Foi observado que a imunização de cobaias com uma proteína recombinante do cemento de *R. appendiculatus* (64TRP) induz proteção parcial contra esse carrapato (Trimnell et al., 2002). Uma vacina contendo essa proteína também protegeu cobaias contra a infestação por *R. sanguineus sensu lato*, assim como coelhos e camundongos contra a infestação por *I. ricinus* (Trimnell et al., 2005). Apesar dos índices de proteção parcial serem baixos, esses achados indicam a possibilidade de usar tal antígeno em vacinas multiespécies. Além disso, a imunização com 64TRP interfere na transmissão do vírus da encefalite



por *I. ricinus*, possivelmente devido à resposta inflamatória cutânea no local da picada do carrapato (Labuda et al., 2006). Isso demonstrou que o uso dessa vacina pode auxiliar na prevenção da transmissão de patógenos.

As GST constituem uma família multifuncional de enzimas presentes em animais e vegetais. Suas funções incluem transporte intracelular, participação em processos digestórios, síntese de prostaglandinas e, principalmente, destoxificação de substâncias endógenas e exógenas e proteção contra o estresse oxidativo (Lee et al., 2002; Rosa De Lima et al., 2002). Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticidas em vários organismos (Rufingier C. 1999). Além disso, foi demonstrado o papel dessa enzima na destoxificação de ácaros expostos à permetrina e à ivermectina (Mounsey et al., 2010). Em carrapatos, as GST são sintetizadas nas glândulas salivares e no intestino de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas (Rosa De Lima et al., 2002; Freitas et al., 2008). Uma GST recombinante de *H. longicornis* (GST-HI) foi utilizada em ensaios de proteção cruzada, reduzindo em 57% a infestação por *R. microplus* em bovinos (Parizi et al., 2011), e em 67% a infestação por *R. appendiculatus* em coelhos (Sabadin et al., 2017). Interessantemente, apesar da GST-HI não proteger coelhos contra *R. sanguineus sensu lato* (Sabadin et al., 2017), uma vacina multiantigênica, constituída por GST de *R. decoloratus* e *A. variegatum*, apresentou uma proteção de 35% contra esse carrapato (Ndawula et al., 2019).

Subolesina e a akirina são proteínas ortólogas em carrapatos e mosquitos, respectivamente, envolvidas na regulação da expressão gênica (Artigas-Jerónimo et al., 2021a, b). Ambas as proteínas induziram uma resposta imune protetora quando usadas como antígenos vacinais contra carrapatos (Almazán et al., 2005; 2010; Almazán et al., 2012; Kasaija et al., 2020; Lee et al., 2020) e mosquitos (Letinić et al., 2021). Pela alta similaridade de aminoácidos entre a subolesina e a akirina em regiões contendo epítomos antigênicos, essas proteínas poderiam ser usadas no controle desses vetores em uma vacina universal (Canales et al., 2009). Nesse sentido, foi realizado um ensaio de proteção cruzada contra a infestação de carrapatos em veados vermelhos imunizados com a akirina de *Aedes albopictus*, resultando na redução da infestação por *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. (Carreón et al., 2012). Uma quimera composta por regiões da subolesina e a akirina mostrou proteção contra múltiplas espécies de carrapato (Contreras et al., 2020).

A proteína P0 é essencial para a montagem da subunidade ribossomal 60S e foi demonstrado que a imunização com um peptídeo imunogênico, derivado dessa proteína, reduziu a sobrevivência de *R. sanguineus sensu lato* em coelhos

(Rodríguez-Mallon et al., 2012) e de *R. microplus* em bovinos (Rodríguez-Mallon et al., 2015). Isso indica que a P0 tem potencial como antígeno para o controle de carrapatos. A capacidade de uma vacina multiantigênica, composta de subolesina e de um peptídeo da P0, de interferir na viabilidade de adultos de *H. longicornis* foi avaliada (Hassan et al., 2020). A primeira dose foi constituída de vacina de DNA para a expressão de subolesina, seguida de reforços de um único antígeno (subolesina) ou um polipeptídeo quimérico (subolesina/P0), afetando a sobrevivência, a ingestão de sangue e a reprodução. As eficácias da vacinação foram de 79,3% e 86,6% para os grupos que receberam as segundas doses de subolesina e subolesina/P0, respectivamente.

## **Estudos sobre *R. microplus* no Brasil**

A contribuição do Brasil para os estudos sobre o carrapato *R. microplus* pode ser inferida, analisando o número de publicações em revistas científicas que tem esse parasito como foco. No período de 1986 a 1996, usando a palavra-chave “*microplus*” foram localizados 22 artigos de pesquisadores brasileiros em revistas indexadas no ISI, 2 deles de autoria de pesquisadores do Instituto de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM). Em comparação, no período de 2001 a 2011, foram localizados 308 artigos de pesquisadores brasileiros (61 artigos de autoria de pesquisadores do INCT-EM). Pesquisando-se a palavra-chave “*tick*” no período de 2012 a 2021, 255 artigos, dos 24.028 encontrados, pertenciam aos pesquisadores do INCT-EM. É importante ressaltar que, nesse período, os trabalhos envolveram diferentes aspectos da biologia do carrapato. Alguns exemplos são os estudos sobre métodos de controle biológico e imunológico, identificação de novas proteínas com a caracterização da função biológica, clonagem e transcrição de genes. Em uma parcela significativa desses trabalhos, existiu a associação entre pesquisadores do grupo Arthromint.

## **Considerações finais**

Os problemas ocasionados pela seleção de carrapatos resistentes a acaricidas, o alto custo dos produtos sintéticos e da mão de obra na aplicação desses compostos, bem como o aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levam, cada vez mais, à procura de métodos biológicos e imunológicos, como formas alternativas de controle do carrapato. Apesar de o controle imunológico ainda não satisfazer completamente as necessidades da pecuária, os diversos resultados obtidos com proteções



parciais, tanto em experimentos controlados como em testes a campo, indicam que o desenvolvimento de uma vacina para o controle de carrapatos é um objetivo viável a médio e longo prazo, podendo vir a ser utilizado como complemento aos métodos existentes, atualmente, e como alternativa ao uso dos acaricidas sintéticos.

## Referências

- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* Dezembro de 2018;9(1):1911.
- Ali A, Ahmad S, de Albuquerque PMM, Kamil A, Alshammari FA, Alouffi A, et al. Prediction of novel drug targets and vaccine candidates against human lice (insecta), acari (arachnida), and their associated pathogens. *Vaccines.* Dezembro de 2021;10(1):8.
- Ali A, Khan S, Ali I, Karim S, da Silva Vaz I, Termignoni C. Probing the functional role of tick metalloproteases: Tick metalloproteases. *Physiol Entomol.* Setembro de 2015;40(3):177–88.
- Ali A, Numan M, Khan M, Aiman O, Muñoz-Leal S, Chitimia-Dobler L, et al. *Ornithodoros* (Pavlovskyella) ticks associated with a *Rickettsia* sp. in Pakistan. *Parasit Vectors.* Dezembro de 2022;15(1):138.
- Ali A, Parizi LF, Guizzo MG, Tirloni L, Seixas A, Vaz Ida S Jr, et al. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* metalloprotease. *Vet Parasitol.* Janeiro de 2015;207(1–2):107–14.
- Ali A, Zeb I, Alouffi A, Zahid H, Almutairi MM, Ayed Alshammari F, et al. Host immune responses to salivary components - A critical facet of tick-host interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* Março de 2022;12:809052.
- Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, et al. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine.* Agosto de 2005a;23(35):4403–16.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine.* Março de 2003;21(13–14):1492–501.
- Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine.* Novembro de 2005b;23(46–47):5294–8.
- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, et al. Identification and characterization of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res.* Janeiro de 2010;106(2):471–9.
- Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine.* Janeiro de 2012;30(2):265–72.
- Almazán C, Šimo L, Fourniol L, Rakotobe S, Borneres J, Cote M, et al. Multiple antigenic peptide-based vaccines targeting *Ixodes ricinus* neuropeptides induce a specific antibody response but do not impact tick infestation. *Pathogens.* Outubro de 2020;9(11):900.

Alves-Branco FP, Echevarria FAM, Siqueira AS. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. EMBRAPA; 1983.

Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CAM, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. Int Immunopharmacol. Março de 2002;2(4):557–63.

Artigas-Jerónimo S, Villar M, Cabezas-Cruz A, Caignard G, Vitour D, Richardson J, et al. Tick importin- $\alpha$  is implicated in the interactome and regulome of the cofactor subolesin. Pathogens. Abril de 2021b;10(4):457.

Artigas-Jerónimo S, Villar M, Estrada-Peña A, Velázquez-Campoy A, Alberdi P, de la Fuente J. Function of cofactor Akirin2 in the regulation of gene expression in model human Caucasian neutrophil-like HL60 cells. Biosci Rep. Julho de 2021a;41(7):BSR20211120.

Barnard AC, Nijhof AM, Gaspar ARM, Neitz AWH, Jongejan F, Maritz-Olivier C. Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol. Maio de 2012;186(3–4):403–14.

Barrero RA, Guerrero FD, Black M, McCooke J, Chapman B, Schilkey F, et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. Int J Parasitol. Agosto de 2017;47(9):569–83.

Belongia EA, Naimi TS, Gale CM, Besser RE. Antibiotic Use and Upper Respiratory Infections: A survey of knowledge, attitudes, and experience in Wisconsin and Minnesota. Prev Med. Março de 2002;34(3):346–52.

Bharadwaj A, Stafford KC. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strain F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. Setembro de 2010;47(5):862–7.

Bissinger BW, Donohue KV, Khalil SMS, Grozinger CM, Sonenshine DE, Zhu J, et al. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): Tick synganglion transcriptome. Insect Mol Biol. Agosto de 2011;20(4):465–91.

Bryant JM, Baumgarten S, Glover L, Hutchinson S, Rachidi N. CRISPR in parasitology: not exactly cut and dried! Trends Parasitol. Junho de 2019;35(6):409–22.

Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. BMC Biotechnol. Março de 2009;9(1):29.

Carreón D, Pérez de la Lastra JM, Almazán C, Canales M, Ruiz-Fons F, Boadella M, et al. Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer. Vaccine. Janeiro de 2012;30(2):273–9.

Contreras M, de la Fuente J. Control of infestations by *Ixodes ricinus* tick larvae in rabbits vaccinated with aquaporin recombinant antigens. *Vaccine*. Março de 2017;35(9):1323–8.

Contreras M, San José C, Estrada-Peña A, Talavera V, Rayas E, Isabel León C, et al. Control of tick infestations in wild roe deer (*Capreolus capreolus*) vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine*. Setembro de 2020;38(41):6450–4.

Cordoves Céspedes CO. Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Gralha; 1996.

Couto J, Seixas G, Stutzer C, Olivier NA, Maritz-Olivier C, Antunes S, et al. Probing the *Rhipicephalus bursa* sialomes in potential anti-tick vaccine candidates: A Reverse vaccinology approach. *biomedicines*. Março de 2021;9(4):363.

Cruz APR, Silva SS, Mattos RT, Da Silva Vaz I, Masuda A, Ferreira CAS. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet Parasitol*. Novembro de 2008;158(1–2):152–8.

da Costa GL, Sarquis MIM, de Moraes AML, Bittencourt VREP. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. Agosto de 2002;154(4):207–9.

da Silva Vaz I, Logullod C, Sorgine M, Velloso FF, Rosa de Lima MF, Gonzales JC, et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol*. Dezembro de 1998;66(3–4):331–41.

da Silva Vaz I, Moraes Martinez RH, Oliveira A, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol*. Março de 1996;62(1–2):155–60.

Davey RB, George JE, Snyder DE. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Vet Parasitol*. Julho de 2001;99(1):41–52.

de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine Gavac<sup>TM</sup>. *Genet Anal - Biomol Eng*. Novembro de 1999;15(3–5):143–8.

Decrem Y, Mariller M, Lahaye K, Blasioli V, Beaufays J, Zouaoui Boudjeltia K, et al. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*. Abril de 2008;38(5):549–60.

Dzemo WD, Thekiso O, Vudriko P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. Janeiro de 2022;8(1):e08718.

Elder JK, Emmerson FR, Kearnan JF, Waters KS, Dunwell GH, Morris RS, et al. A survey concerning cattle tick control in queensland. *Chemical Control. Aust Vet J.* Maio de 1980;56(5):212–8.

Évora PM, Sanches GS, Guerrero FD, de León AP, Bechara GH. Immunogenic potential of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin 1 against *Rhipicephalus sanguineus* in domestic dogs. *Rev Bras Parasitol Vet.* Janeiro de 2017;26(1):60–6.

Farias NA da R, Gonzales JC, de Saibro JC. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesqui Agropecuária Bras.* Dezembro de 1986;21(12).

Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp Appl Acarol.* Dezembro de 2008;46(1–4):71–93.

Flores-Fernández JM, Padilla-Camberos E, Castillo Herrera GA, Martínez-Velázquez M. Adulticidal and oviposition- and hatching-altering activities of essential oil from Mexican oregano leaves (*Lippia graveolens* H.B.K.) against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Trop Biomed.* Junho de 2016;33(2):290–4.

Franzin AM, Maruyama SR, Garcia GR, Oliveira RP, Ribeiro JMC, Bishop R, et al. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors.* Dezembro de 2017;10(1):51.

Frazzon APG, Vaz Junior I da S, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* Dezembro de 2000;94(1–2):117–25.

Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit Vectors.* Novembro de 2010;3(1).

Freitas DRJ de, Vaz Junior I da S, Masuda A. Expressão e atividade enzimática de glutationa s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* Junho de 2008;17(2):99–104.

Galay RL, Aung KM, Umemiya-Shirafuji R, Maeda H, Matsuo T, Kawaguchi H, et al. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Exp Biol.* Maio de 2013;216(10):1905–15.

Galay RL, Umemiya-Shirafuji R, Bacolod ET, Maeda H, Kusakisako K, Koyama J, et al. Two kinds of ferritin protect Ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress. *Mans BJ, organizador. PLoS ONE.* Março de 2014;9(3):e90661.

Garcia GR, Chaves Ribeiro JM, Maruyama SR, Gardinassi LG, Nelson K, Ferreira BR, et al. A transcriptome and proteome of the tick *Rhipicephalus microplus* shaped by the genetic composition of its hosts and developmental stage. *Sci Rep.* Dezembro de 2020;10(1):12857.

García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. Abril de 2000;18(21):2275–87.

Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod  $\gamma$ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol*. Fevereiro de 2014;45:111–24.

Githaka NW, Konnai S, Isezaki M, Goto S, Xavier MA, Fujisawa S, et al. Identification and functional analysis of ferritin 2 from the Taiga tick *Ixodes persulcatus* Schulze. *Ticks Tick-Borne Dis*. Novembro de 2020;11(6):101547.

Gonzales JC. O controle do carrapato do boi. 2<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: edição do autor; 1995.

Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. Junho de 2014;23(2):150–6.

Guerrero FD, Andreotti R, Bendele KG, Cunha RC, Miller RJ, Yeater K, et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2014;7(1):475.

Guglielmone AA, Mangold AJ, Muñoz Cobeñas ME, Scherling N, García Posse F, Anziani OS, et al. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Vet Parasitol*. Janeiro de 2000;87(2–3):237–41.

Guglielmone AA, Petney TN, Robbins RG. Ixodidae (Acari: Ixodoidea): descriptions and redescriptions of all known species from 1758 to December 31, 2019. *Zootaxa*. 5 de novembro de 2020;4871(1):1–322.

Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun*. Abril de 2016;7(1):10507.

Hajdusek O, Almazán C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. Abril de 2010;28(17):2993–8.

Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, et al. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci*. Janeiro de 2009;106(4):1033–8.

Hassan IA, Wang Y, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Cross protection induced by combined Subolesin-based DNA and protein immunizations against adult *Haemaphysalis longicornis*. *Vaccine*. Janeiro de 2020;38(4):907–15.



Hernandez EP, Shimazaki K, Niihara H, Umemiya-Shirafuji R, Fujisaki K, Tanaka T. Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Heliyon*. Março de 2020;6(3):e03644.

Hill CA, Guerrero FD, Van Zee JP, Geraci NS, Walling JG, Stuart JJ. The position of repetitive DNA sequence in the southern cattle tick genome permits chromosome identification. *Chromosome Res*. Janeiro de 2009;17(1):77–89.

Hollmann T, Kim TK, Tirloni L, Radulović ŽM, Pinto AFM, Diedrich JK, et al. Identification and characterization of proteins in the *Amblyomma americanum* tick cement cone. *Int J Parasitol*. Março de 2018;48(3–4):211–24.

Imamura S, da Silva Vaz I, Konnai S, Yamada S, Nakajima C, Onuma M, et al. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol*. Agosto de 2009;48(4):345.

Imamura S, Junior I da SV, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. Janeiro de 2005;23(10):1301–11.

Imamura S, Konnai S, Vaz IDS, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Jpn J Vet Res*. Agosto de 2008;56(2):85–98.

Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*. Março de 2006;24(13):2230–7.

Jia N, Wang J, Shi W, Du L, Sun Y, Zhan W, et al. Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell*. Setembro de 2020;182(5):1328-1340.e13.

Jittapalapong S, Kaewhom P, Pumhom P, Canales M, De La Fuente J, Stich RW. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*: Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor. *Transbound Emerg Dis*. Abril de 2010;57(1–2):103–6.

Johnston TH, Brancroft MJ. A tick resistant condition in cattle. *Proc R Soc Qld*. 1918;30:209–317.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129:S3–14.

Jonsson NN, Mayer DG, Green PE. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol*. Fevereiro de 2000;88(1–2):79–92.

Jonsson NN, Miller RJ, Kemp DH, Knowles A, Ardila AE, Verrall RG, et al. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Vet Parasitol.* Abril de 2010;169(1–2):157–64.

Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol.* Abril de 2006;137(1–2):1–10.

Kaaya GP, Mwangi EM, Ouna EA. Prospects for biological control of livestock ticks, and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* Janeiro de 1996;67(1):15–20.

Kaaya GP. The potential for antitick plants as components of an integrated tick control strategy. *Ann N Y Acad Sci.* Janeiro de 2000;916:576–82.

Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochem Biophys Res Commun.* Setembro de 2005;334(4):1336–42.

Kasaija PD, Contreras M, Kabi F, Mugerwa S, de la Fuente J de la. Vaccination with recombinant subolesin antigens provides cross-tick species protection in *Bos indicus* and crossbred cattle in Uganda. *Vaccines.* Junho de 2020;8(2):319.

Kim TK, Radulovic Z, Mulenga A. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks Tick-Borne Dis.* Abril de 2016;7(3):405–14.

Kim TK, Tirloni L, Berger M, Diedrich JK, Yates JR, Termignoni C, et al. *Amblyomma americanum* serpin 41 (AAS41) inhibits inflammation by targeting chymase and chymotrypsin. *Int J Biol Macromol.* Agosto de 2020;156:1007–21.

Kim TK, Tirloni L, Pinto AFM, Diedrich JK, Moresco JJ, Yates JR, et al. Time-resolved proteomic profile of *Amblyomma americanum* tick saliva during feeding. *PLoS Negl Trop Dis.* Fevereiro de 2020;14(2):e0007758.

Kocan KM. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Vet Parasitol.* Março de 1995;57(1–3):121–51.

Kotál J, Langhansová H, Lieskovská J, Andersen JF, Francischetti IMB, Chavakis T, et al. Modulation of host immunity by tick saliva. *J Proteomics.* Outubro de 2015;128:58–68.

Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, et al. Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol.* Outubro de 2008;181(8):5209–12.

Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem.* 5 de outubro de 2007;282(40):29256–63.



Krause PJ, McKay K, Thompson CA, Sikand VK, Lentz R, Lepore T, et al. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin Infect Dis*. Maio de 2002;34(9):1184–91.

Labuda M, Trimnell AR, Ličková M, Kazimírová M, Davies GM, Lissina O, et al. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog*. Abril de 2006;2(4):e27.

Lau V, Davie JR. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation. *Biochem Cell Biol*. Abril de 2017;95(2):203–10.

Leal AT, Seixas A, Pohl PC, Ferreira CAS, Logullo C, Oliveira PL, et al. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol*. Dezembro de 2006;114(3–4):341–5.

Lee AJ, Huntley J, Van den Broek A, Coates D, Elwyn Isaac R. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Vet Parasitol*. Abril de 2002;105(1):49–63.

Lee SH, Li J, Moumouni PFA, Okado K, Zheng W, Liu M, et al. Subolesin vaccination inhibits blood feeding and reproduction of *Haemaphysalis longicornis* in rabbits. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2020;13(1):478.

Letinić BD, Contreras M, Dahan-Moss Y, Linnekugel I, de la Fuente J, Koekemoer LL. Additional evidence on the efficacy of different Akirin vaccines assessed on *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. Dezembro de 2021;14(1):209.

Lew-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis*. Junho de 2016;7(4):573–85.

Logullo C, Da Silva Vaz I, Sorgine MHF, Paiva-Silva GO, Faria FS, Zingali RB, et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. Junho de 1998;116:525–32.

Martinez-Velazquez M, Rosario-Cruz R, Castillo-Herrera G, Flores-Fernandez JM, Alvarez AH, Lugo-Cervantes E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. Julho de 2011;48(4):822–7.

Martins LA, Bensaoud C, Kotál J, Chmelař J, Kotsyfakis M. Tick salivary gland transcriptomics and proteomics. *Parasite Immunol*. Maio de 2021;43(5):e12807. McVeigh P, Maule AG. Can CRISPR help in the fight against parasitic worms? *eLife*. Janeiro de 2019;8:e44382.

Michereff Filho M, Faria M, Wraight SP, Silva KFAS. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? *Arq Inst Biológico*. Dezembro de 2009;76(4):769–79.

- Mittal RD. Gene editing in clinical practice: Where are we? *Indian J Clin Biochem.* Janeiro de 2019;34(1):19–25.
- Mounsey KE, Pasay CJ, Arlian LG, Morgan MS, Holt DC, Currie BJ, et al. Increased transcription of Glutathione S-transferases in acaricide exposed scabies mites. *Parasit Vectors.* Maio de 2010;3(1):43.
- Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: Identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect.* Setembro de 2000;2(11):1353–61.
- Murrell A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.* Novembro de 2003;56(3):169–72.
- Narasimhan S, Kurokawa C, Diktas H, Strank NO, Černý J, Murfin K, et al. *Ixodes scapularis* saliva components that elicit responses associated with acquired tick-resistance. *Ticks Tick-Borne Dis.* Maio de 2020;11(3):101369.
- Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol.* Março de 1995;57(1–3):153–65.
- Ndawula C, Amaral Xavier M, Villavicencio B, Cortez Lopes F, Juliano MA, Parizi LF, et al. Prediction, mapping and validation of tick glutathione S-transferase B-cell epitopes. *Ticks Tick-Borne Dis.* Julho de 2020;11(4):101445.
- Ndawula C, Sabadin GA, Parizi LF, da Silva Vaz I. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine.* Março de 2019;37(14):1918–27.
- Neupert S, Predel R, Russell WK, Davies R, Pietrantonio PV, Nachman RJ. Identification of tick periviscerokinin, the first neurohormone of Ixodidae: Single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* Dde 2005;338(4):1860–4.
- Neupert S, Russell WK, Predel R, Russell DH, Strey OF, Teel PD, et al. The neuropeptidomics of *Ixodes scapularis* synganglion. *J Proteomics.* Agosto de 2009;72(6):1040–5.
- Nuccitelli A, Cozzi R, Gourlay LJ, Donnarumma D, Necchi F, Norais N, et al. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus* infections. *Proc Natl Acad Sci.* Junho de 2011;108(25):10278–83.
- Nuss A, Sharma A, Gulia-Nuss M. Genetic manipulation of ticks: A paradigm shift in tick and tick-borne diseases research. *Front Cell Infect Microbiol.* Maio de 2021;11:678037.
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* Abril de 2006;28(4):155–63.

- Obaid MK, Islam N, Alouffi A, Khan AZ, da Silva Vaz I, Tanaka T, et al. Acaricides resistance in ticks: Selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Front Cell Infect Microbiol*. Julho de 2022;12:941831.
- Oleaga A, González-Pérez S, Pérez-Sánchez R. First molecular and functional characterisation of ferritin 2 proteins from *Ornithodoros* argasid ticks. *Vet Parasitol*. Abril de 2022;304:109684.
- Otto PI, Guimarães SEF, Verardo LL, Azevedo ALS, Vandenplas J, Soares ACC, et al. Genome-wide association studies for tick resistance in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle: A deeper look into this intricate mechanism. *J Dairy Sci*. Dezembro de 2018;101(12):11020–32.
- Palmer MJ, Bantle JA, Guo X, Fargoxy WS. Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Mol Biol*. Fevereiro de 1994;3(1):57–62.
- Parizi LF, Rangel CK, Sabadin GA, Saggin BF, Kiio I, Xavier MA, et al. *Rhipicephalus microplus* cystatin as a potential cross-protective tick vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks Tick Borne Dis*. Maio de 2020;11(3):101378.
- Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, et al. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp Parasitol*. Janeiro de 2011;127(1):113–8.
- Parthasarathi BC, Kumar B, Ghosh S. Current status and future prospects of multi-antigen tick vaccine. *J Vector Borne Dis*. Setembro de 2021;58(3):183–92.
- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Couto Pimentel J, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol*. Setembro de 2002;88(3–4):163–72.
- Patarroyo JH, Vargas MI, González CZ, Guzmán F, Martins-Filho OA, Afonso LCC, et al. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol*. Dezembro de 2009;166(3–4):333–9.
- Patarroyo S. JH, de Sousa Neves E, Fidelis CF, Tafur-Gómez GA, de Araujo L, Vargas MI, et al. Bovine immunisation with a recombinant peptide derived from synthetic SBm7462® (Bm86 epitope construct) immunogen for *Rhipicephalus microplus* control. *Ticks Tick-Borne Dis*. Setembro de 2020;11(5):101461.
- Pérez-Sánchez R, Cano-Argüelles AL, González-Sánchez M, Oleaga A. First data on *Ornithodoros moubata* aquaporins: structural, phylogenetic and immunogenic characterisation as vaccine targets. *Pathogens*. Junho de 2022;11(6):694.
- Perner J, Helm D, Haberkant P, Hatalova T, Kropackova S, Ribeiro JM, et al. The central role of salivary metalloproteases in host acquired resistance to tick feeding. *Front Cell Infect Microbiol*. Novembro de 2020;10:563349.

Polar P, Moore D, Kairo MTK, Ramsubhag A. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol*. Dezembro de 2008;46(1–4):119–48.

Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*. Abril de 2007;25(17):3284–92.

Pruett JH. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review. *Int J Parasitol*. Janeiro de 1999;29(1):25–32.

Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. Outubro de 2000;3(5):445–50.

Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol*. Março de 2014;201(1–2):128–36.

Ribeiro JM, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IM. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*. Dezembro de 2011;12(1):136.

Riding GA, Jarmey J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J Immunol Baltim Md 1950*. Dezembro de 1994;153(11):5158–66.

Rodríguez-Mallon A, Encinosa PE, Méndez-Pérez L, Bello Y, Rodríguez Fernández R, Garay H, et al. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-Borne Dis*. Junho de 2015;6(4):530–7.

Rodríguez-Mallon A, Fernández E, Encinosa PE, Bello Y, Méndez-Pérez L, Ruiz LC, et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*. Fevereiro de 2012;30(10):1782–9.

Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol Res*. 2018;117(1):3–29.

Rosa De Lima MF, Sanchez Ferreira CA, Joaquim De Freitas DR, Valenzuela JG, Masuda A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione s-transferase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32(7):747–54.

Rufingier C. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. *Insect Biochem Mol Biol*. Abril de 1999;29(4):385–91.

Sabadin GA, Parizi LF, Kiio I, Xavier MA, da Silva Matos R, Camargo-Mathias MI, et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. *Vaccine*. Dezembro de 2017;35(48):6649–56.

Salat J, Paesen GC, Rezacova P, Kotsyfakis M, Kovarova Z, Sanda M, et al. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochem J*. Julho de 2010;429(1):103–12.

Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. *Parasitology*. Outubro de 2004;129(S1):S389–403.

Samish M, Glazer I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends Parasitol*. Agosto de 2001;17(8):368–71.

Scoles GA, Hussein HE, Olds CL, Mason KL, Davis SK. Vaccination of cattle with synthetic peptides corresponding to predicted extracellular domains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin 2 reduced the number of ticks feeding to repletion. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2022;15(1):49.

Seifert GW, Springell PH, Tatchell RJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adults of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*. Maio de 1968;58(2):415–30.

Sharma A, Pham MN, Reyes JB, Chana R, Yim WC, Heu CC, et al. Cas9-mediated gene editing in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*, by embryo injection and ReMOT Control. *iScience*. Março de 2022;25(3):103781.

Shrivastava N, Singh PK, Nag JK, Kushwaha S, Misra-Bhattacharya S. Immunization with a multisubunit vaccine considerably reduces establishment of infective larvae in a rodent model of *Brugia malayi*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Setembro de 2013;36(5):507–19.

Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 22 de Junho de 2017;7:281.

Singh B, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. *Infect Immun*. Abril de 2012;80(4):1491–501.

Skwarczynski M, Dougall AM, Khoshnejad M, Chandrudu S, Pearson MS, Loukas A, et al. Peptide-based subunit vaccine against hookworm infection. *PLoS ONE*. Outubro de 2012;7(10):e46870.

Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol*. Dezembro de 2005;37(3–4):199–214.

Sugino M, Imamura S, Mulenga A, Nakajima M, Tsuda A, Ohashi K, et al. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; Cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*. Junho de 2003;21(21–22):2844–51.

Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nürnberger S. Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system: Tick attachment cement. *Biol Rev*. Maio de 2018;93(2):1056–76.

Sutherst RW, Jones RJ, Schnitzerling HJ. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*. Janeiro de 1982;295(5847):320–1.

Tabor AE. A review of Australian tick vaccine research. *Vaccines*. Setembro de 2021;9(9):1030.

Tellam RL, Kemp D, Riding G, Briscoe S, Smith D, Sharp P, et al. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet Parasitol*. Janeiro de 2002;103(1–2):141–56.

Tirloni L, Braz G, Nunes RD, Gandara ACP, Vieira LR, Assumpcao TC, et al. A physiologic overview of the organ-specific transcriptome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep*. Dezembro de 2020;10(1):18296.

Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR, Pinto AFM, et al. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit Vectors*. Dezembro de 2015;8(1):338.

Tirloni L, Kim TK, Pinto AFM, Yates JR, da Silva Vaz I, Mulenga A. Tick-host range adaptation: Changes in protein profiles in unfed adult *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* saliva stimulated to feed on different hosts. *Front Cell Infect Microbiol*. Dezembro de 2017;7:517.

Tirloni L, Lu S, Calvo E, Sabadin G, Di Maggio LS, Suzuki M, et al. Integrated analysis of sialotranscriptome and sialoproteome of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.): Insights into gene expression during blood feeding. *J Proteomics*. Outubro de 2020;229:103899.

Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, et al. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*. Abril de 2014;9(4):e94831.

Tong JC, Ranganathan S. Computer-aided vaccine design. Oxford ; Philadelphia: Woodhead Publishing; 2014. 135 p. (Woodhead publishing series in biomedicine).

Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. Julho de 2005;23(34):4329–41.

Trimnell AR, Hails RS, Nuttall PA. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. Outubro de 2002;20(29–30):3560–8.



Turni C, Lee RP, Jackson LA. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* Julho de 2002;24(7):355–61.

Ullmann AJ, Lima CMR, Guerrero FD, Piesman J, Black WC. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol.* Abril de 2005;14(2):217–22.

Valle MR, Mèndez L, Valdez M, Redondo M, Espinosa CM, Vargas M, et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac™. *Exp Appl Acarol.* Janeiro de 2004;34(3–4):375–82.

Vilela VLR, Feitosa TF, Bezerra RA, Klafke GM, Riet-Correa F. Multiple acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* Julho de 2020;11(4):101413.

Waldman J, Xavier MA, Vieira LR, Logullo R, Braz GRC, Tirloni L, et al. Neuropeptides in *Rhipicephalus microplus* and other hard ticks. *Ticks Tick-Borne Dis.* Maio de 2022;13(3):101910.

Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol.* Janeiro de 2015;207(3–4):302–8.

Wharton RH, Norris KR. Control of parasitic arthropods. *Vet Parasitol.* Janeiro de 1980;6(1–3):135–64.

Wikel SK, Bergman D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol Today.* Outubro de 1997;13(10):383–9.

Wikel SK. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol.* Janeiro de 1996;41(1):1–22.

Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol Today.* Julho de 1988;4(7):196–8.

Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* Maio de 1996;18(5):241–6.

Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, et al. A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes. *Parasitol Res.* Dezembro de 2009;106(1):61–8.

Zhang WW, Matlashewski G. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *mBio.* Setembro de 2015;6(4):e00861-15.

Zhao Y, Liu L, Liu JB, Wu CY, Duan DY, Cheng TY. Cloning, expression, and function of ferritins in the tick *Haemaphysalis flava*. Ticks Tick-Borne Dis. Março de 2022;13(2):101892.

Zhao Z, Li C, Tong F, Deng J, Huang G, Sang Y. Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. Biol Proced Online. Dezembro de 2021;23(1):14.

Zhou X, Hohman AE, Hsu WH. Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. Janeiro de 2022;45(1):1–15.