

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Expansão e Aprimoramento de Ferramenta On-line**  
**Baseada no Uso da Técnica de PCR-RFLP para**  
**Identificação de Espécies do Gênero *Amblyomma***  
**Koch, 1844 (Acari: Ixodidae)**

**Lucas Aguiar Rosa Machado**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EXPANSÃO E APRIMORAMENTO DE FERRAMENTA ON-LINE  
BASEADA NO USO DA TÉCNICA DE PCR-RFLP PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Amblyomma* KOCH,  
1844 (Acari: Ixodidae)**

**LUCAS AGUIAR ROSA MACHADO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Douglas McIntosh**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149e Machado, Lucas Aguiar Rosa, 1996-  
Expansão e Aprimoramento de Ferramenta On-line  
Baseada no Uso da Técnica de PCR-RFLP para  
Identificação de Espécies do Gênero *Amblyomma* Koch,  
1844 (Acari: Ixodidae) / Lucas Aguiar Rosa Machado. -  
Seropédica, 2022.  
93 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2022.

1. Acarologia. 2. Enzimas de restrição. 3. Biologia  
Molecular. I. McIntosh, Douglas, 1964-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III.  
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 342/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.009993/2022-21

Seropédica-RJ, 16 de fevereiro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LUCAS AGUIAR ROCHA MACHADO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16/02/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

*(Assinado digitalmente em 16/02/2022 14:40)*

DOUGLAS MCINTOSH  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 1354903

*(Assinado digitalmente em 16/02/2022 13:38)*

HERMES RIBEIRO LUZ  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 088.990.417-09

*(Assinado digitalmente em 16/02/2022 11:57)*

DANIEL PAIVA BARROS DE ABREU  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 116.083.757-06

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **342**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **16/02/2022** e o código de verificação: **a6d7411e1d**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional e confiança durante o mestrado e as dificuldades encontradas.

Agradeço à David Ferreira, por se voluntariar a testar o tutorial de COIsearcher, estar sempre presente para uma boa conversa e me ajudar com termos específicos dessa difícil estrada que é aprender a programar. Agradeço à Ruthe Fernandes, por seus conselhos, otimismo, ombro amigo nos momentos de cansaço e desânimo, mesmo quando a distância parece grande demais para ser superada. Agradeço à Gabriel Cauã, por seu constante apoio nessa jornada, que parece tão curta e ao mesmo tempo tão longa. Agradeço à Felipe e Kim pela confiança e apoio que me deram durante não só o mestrado, mas também a graduação. Agradeço a meus outros amigos não citados aqui pelo apoio, boas risadas e companheirismo durante essa jornada.

Agradeço aos membros do PPGCV que sempre me apoiaram e me motivaram a me dedicar a meus estudos. Agradeço a meu orientador, Douglas McIntosh, pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular. Agradeço à Tássia por sua constante ajuda e paciência ao esclarecer minhas muitas dúvidas. Agradeço à Daniel Paiva, responsável por muitas das ideias presentes em TickCutter que serviram como base para a criação de COIsearcher.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço pelo financiamento desta pesquisa. Agradeço também ao financiamento da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

MACHADO, Lucas Aguiar Rosa. **Expansão e Aprimoramento de Ferramenta On-line Baseada no Uso da Técnica de PCR-RFLP para Identificação de Espécies do Gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Durante os últimos 20 anos, pesquisadores brasileiros desempenharam um papel de liderança nos esforços para melhorar o nosso conhecimento da bioecologia, presença de patógenos e dinâmica das populações de carrapatos associados com animais silvestres na América do Sul. Muito destes achados foram fornecidos na forma de dados moleculares, principalmente sequenciamento de marcadores moleculares amplificados usando a técnica da “polymerase chain reaction” (PCR). Pesquisas elaboradas no PPGCV/UFRRJ por nosso grupo, entre 2018-2019, resultaram no desenvolvimento de um sistema robusto e de baixo custo (que serve como uma alternativa ao sequenciamento) para a identificação, em nível de espécie, de carrapatos da família Ixodidae. O sistema é baseado na técnica de PCR-RFLP (do inglês “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism”), utilizando um fragmento do gene mitocondrial que codifica o RNA ribossômico 16S como alvo. Para facilitar o acesso a esse sistema e promover seu uso por outros pesquisadores brasileiros, foi desenvolvida uma ferramenta “on-line” denominada “TickCutter”. O presente projeto visou expandir e aperfeiçoar esta ferramenta em duas frentes. Em primeiro lugar, uma nova ferramenta denominada “COIsearcher” foi desenvolvida usando um marcador molecular alternativo, especificamente Citocromo C Oxidase I (COI), com o intuito de resolver algumas das limitações associadas com o uso de um único marcador molecular. Em segundo lugar através da inclusão de dados de PCR-RFLP do gene 16S rDNA com as enzimas *Dra*I e *Vsp*I, oriundos de espécies de carrapatos da família Argasidae ou provenientes de novos representantes da família Ixodidae. Um total de 35 novos padrões de bandas foram identificados entre 363 sequências inéditas de 16S rDNA procedentes de carrapatos da família Ixodidae. Em relação aos carrapatos da família Argasidae, foram identificados 31 perfis de bandas entre as 75 sequências obtidas do GenBank (os quais representaram 22 espécies de Argasídeos). No entanto, sete padrões procedentes de seis espécies de Argasidae geraram identificações conflitantes com perfis derivados de alguns carrapatos da família Ixodidae. A nova ferramenta “COIsearcher” foi desenvolvida de modo bastante semelhante a ferramenta “TickCutter 16S” e aproveitou de algumas das soluções elaboradas para a resolução de problemas encontrados durante o desenvolvimento do módulo 16S. No entanto, algumas modificações foram necessárias devido as diferenças entre os marcadores, particularmente em termos do tamanho dos “amplicons”. O banco de dados do novo módulo foi estabelecido com base na digestão *in silico* de “amplicons” virtuais (709 nucleotídeos) do gene COI com as enzimas *Alu*I e *Mbo*I, oriundos de espécies de carrapatos da família Ixodidae. Um total de 88 perfis de bandas foram registrados entre as 851 sequências procedentes de 33 das 51 espécies da família Ixodidae. Foram detectadas algumas identificações conflitantes com a ferramenta “COIsearcher”, de modo similar ao notado anteriormente com a ferramenta “TickCutter 16S”. A solução encontrada para resolver estes conflitos foi a identificação de uma terceira enzima capaz de gerar padrões discriminatórios em nível de espécies. As modificações introduzidas na plataforma “TickCutter” fornecerão maior flexibilidade e poder discriminatório ao sistema de identificação atual e oferecerá uma solução para a maioria das limitações associadas ao uso de um único marcador molecular.

Palavras-chave: Acarologia, enzimas de restrição, biologia molecular

## ABSTRACT

MACHADO, Lucas Aguiar Rosa. **Expansion and Improvement of an On-line Tool Based on the Use of PCR-RFLP for Identification of Species Within the Genus *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae)**. Dissertation (Master of Sciences in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

During the last 20 years, Brazilian researchers have played a leading role in efforts to improve our knowledge of the bioecology, the presence and importance of pathogens and the dynamics of tick populations associated with wild animals in South America. Many of these findings were provided in the form of molecular data, principally sequencing of molecular markers amplified using the polymerase chain reaction (PCR) technique. Research carried out by our group within the PPGCV/UFRRJ, between 2018-2019, resulted in the development of a robust and low-cost system (which serves as an alternative to sequencing) for the identification, at the species level, of ticks of the Ixodidae family. The system is based on the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism technique (PCR-RFLP), using a fragment of the mitochondrial gene that encodes 16S ribosomal RNA as target. To facilitate access to this system and to promote its use by other Brazilian researchers, an online tool called “TickCutter” was developed. The present project aimed to expand and improve this tool on two fronts. Firstly, a new tool called “COIsearcher” was developed using an alternative molecular marker, specifically Cytochrome C Oxidase I (COI), in order to address some of the limitations associated with the use of a single molecular marker. Secondly, through the inclusion of PCR-RFLP data of the 16S rDNA gene with the enzymes *DraI* and *VspI*, derived from tick species of the Argasidae family and/or from novel representatives of the Ixodidae family. A total of 35 new banding patterns were identified among 363 previously unpublished 16S rDNA sequences derived from ticks of the Ixodidae family. Regarding the Argasidae family of ticks, 31 banding profiles were identified among the 75 sequences obtained from GenBank (which represented 22 Argasidae). However, it was observed that patterns derived from six species of Argasidae generated conflicting identifications with banding profiles derived from certain species of the Ixodidae family. The new “COIsearcher” tool was developed in a very similar manner to the “TickCutter 16S” tool, and took advantage of some of the solutions developed to solve problems encountered during the development of the 16S module. However, some modifications were necessary due to the differences between the markers, particularly in terms of the size of the amplicons. The database of the new module was established based on the *in silico* digestion of virtual “amplicons” (709 nucleotides) of the COI gene, derived from tick species of the Ixodidae family, with the enzymes *AluI* and *MboI*. A total of 88 banding profiles were recorded among a total of 851 sequences derived from 33 of the 51 species of the Ixodidae family. The interspecific discriminatory power of the “COIsearcher” tool was high. However, some conflicting identifications were detected, in a manner similar to what was previously observed with the “TickCutter 16S” tool. The solution found to resolve these conflicts was the identification of a third enzyme capable of generating discriminatory patterns at the species level. It was concluded that the modifications introduced to the “TickCutter” platform will provide greater flexibility and discriminatory power to the current identification system and will offer a solution to most of the limitations associated with the use of a single molecular marker.

Keywords: Acarology, Restriction enzymes, Molecular biology

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Todas as 51 espécies de ixodídeos procuradas no levantamento e total de sequências COI usadas nesse estudo, incluindo aquelas não depositadas em bancos de dados públicos. .25	
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de sequências de COI e mitocondrial de <i>Amblyomma</i> utilizadas nesse estudo.....27	
<b>Tabela 3.</b> Detalhes dos conjuntos de padrões de bandas que precisaram de uma terceira enzima para permitir uma identificação em nível de espécies usando a ferramenta “COIsearcher”....44	
<b>Tabela 4.</b> Padrões de bandas geradas através de digestão in silico com as enzimas <i>DraI</i> e <i>VspI</i> de “amplicons” virtuais de sequencias de 16S rDNA derivadas de 22 espécies da família Argasidae.....48	
<b>Tabela 5.</b> Perfis de digestão gerados por carrapatos da família Argasidae que geraram identificações conflitantes com membros da família Ixodidae. ....49	

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Enzimas de restrição utilizadas na seleção de terceira enzima da ferramenta. ....	22
<b>Quadro 2.</b> Perfis de bandas produzidos de “amplicons” virtuais (709 pb) de COI usando as enzimas <i>AluI</i> e <i>MboI</i> para 27 espécies de <i>Amblyomma</i> .....	30
<b>Quadro 3.</b> Perfis de bandas produzidos de “amplicons” virtuais (709 pb) de COI utilizando as enzimas <i>AluI</i> e <i>MboI</i> para espécies de <i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> e <i>Rhipicephalus</i> . .....	33

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem da página incluída na plataforma “TickCutter” incluindo o tutorial para o uso da ferramenta principal de COIsearcher. .... 36
- Figura 2.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *AluI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 25 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas claramente separadas (A), bandas de menos de 100 pb que não podem ser medidas com segurança (B) e bandas sugestivas de digestão parcial (C). .... 38
- Figura 3.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *AluI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 23 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*, dois exemplares de *H. leporispalustris* (marcado como *Haemaphysalis* sp.) e uma única amostra de *R. microplus*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas sugestivas de digestão parcial (C), e a presença de bandas não separadas de tamanhos semelhantes (D). .... 39
- Figura 4.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *MboI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 25 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041 Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas claramente separadas (A), bandas de menos de 100 pb que puderam ser medidas com confiança (B), bandas sugestivas de digestão parcial (C) e a presença de bandas não separadas de tamanhos semelhantes (D). .... 40
- Figura 5.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *MboI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 23 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*, dois exemplares de *H. leporispalustris* (marcado como *Haemaphysalis* sp.) e uma única amostra de *R. microplus*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. .... 41

**Figura 6.** Imagem da página incluída na plataforma “TickCutter” incluindo o tutorial para o uso da ferramenta complementar do módulo “COIsearcher” para identificação através do uso de uma terceira enzima. ....46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 As intersecções entre parasitologia, animais silvestres e o conceito de Saúde Única ...	3
2.2 A importância de carrapatos e as doenças transmitidas por carrapatos .....	4
2.3 A importância da biologia molecular no estudo de carrapatos e as DTCs .....	7
2.4 Estratégias para a aplicação de métodos moleculares ao estudo de carrapatos e DTCs .....	8
2.5 PCR-RFLP e o sistema “TickCutter” como método alternativo ou complementar ao uso de sequenciamento para a identificação de carrapatos no Brasil .....	11
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
3.1 Levantamento de Sequências COI .....	15
3.2 Digestões enzimáticas <i>in silico</i> das sequências COI .....	15
3.3 Inserção de “COIsearcher” no “website” “TickCutter” .....	16
3.4 Avaliações executadas com dados geradas por digestão <i>in vitro</i> .....	19
3.5 Escolha de Terceira Enzima de Restrição .....	21
3.6 Atualização de “COIsearcher” com Terceira Enzima .....	23
3.7 Atualização da Ferramenta “TickCutter 16S” .....	23
<b>4 RESULTADOS</b> .....	25
4.1 Levantamento de Sequências .....	25
4.1.1 Aquisição e caracterização de sequências COI e de genomas mitocondriais de membros do gênero <i>Amblyomma</i> .....	25
4.1.2 Aquisição e caracterização de sequências COI de membros dos gêneros <i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> e <i>Rhipicephalus</i> .....	28
4.1.3 Aquisição e caracterização de sequências 16S rDNA de carrapatos das famílias e Argasidae e Ixodidae .....	28
4.2 Preparação de “amplicons” virtuais de COI e digestão <i>in silico</i> .....	28
4.3 Expansão da Plataforma “TickCutter” para inclusão da ferramenta “COIsearcher” .....	33
4.4 Verificação com os padrões de bandas gerados por digestão <i>in silico</i> .....	36
4.5 Avaliação de padrões de bandas produzido por digestão <i>in vitro</i> .....	37
4.6 Identificação de enzimas alternativas (terceiras enzimas) para complementar os perfis de bandas geradas por <i>AluI</i> e <i>MboI</i> .....	43
4.7 Expansão do módulo “COIsearcher” para permitir identificação em nível de espécie empregando uma terceira enzima .....	45
4.9 Atualização da Ferramenta “TickCutter 16S” .....	47
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	78
<b>ANEXO A – Código de “COIsearcher”</b> .....	79

# 1 INTRODUÇÃO

A fauna de carrapatos do Brasil é composta por espécies das famílias Argasidae e Ixodidae. A família Ixodidae é a mais numerosa e representada por espécies dos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus*, com a maioria dos casos de infestação humana associada a carrapatos *Amblyomma*. As aves silvestres são os hospedeiros primários dos estágios imaturos (larvas e ninfas) da maioria das espécies de carrapatos *Amblyomma* reconhecidas no Brasil. A ausência de características diferenciais claras para espécimes imaturos (particularmente larvas) de carrapatos *Amblyomma* torna a identificação morfológica tradicional em nível de espécie desafiadora e, em muitos casos, só pode ser resolvida pela análise de sequência de nucleotídeos de marcadores moleculares mitocondriais, como por exemplo o 16S rDNA, 12S rDNA, subunidade 1 do gene que codifica a Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), ou nuclear como o segundo espaçador transcrito interno (ITS2).

As doenças transmitidas por carrapatos (DTCs) representam uma ameaça real e crescente à saúde humana e animal globalmente. Além disso, prevê-se que o tamanho e a complexidade da ameaça aumentarão nas próximas décadas em resposta a fatores antropogênicos, como ocorrido com a doença de Lyme nos Estados Unidos. A capacidade de monitorar os efeitos desses fenômenos e de responder a possíveis mudanças na bioecologia dos carrapatos (que por sua vez podem influenciar a capacidade de adquirir e disseminar agentes infecciosos) depende da identificação correta de carrapatos a nível de espécie. Paradoxalmente, essa exigência surge em um momento em que o número de especialistas em acarologia/taxonomia tradicional está em declínio. No entanto, recursos/ferramentas ecológicas moleculares, principalmente métodos de identificação baseados em sequenciamento de nucleotídeos, evoluíram durante os últimos 20 anos para fornecer soluções potenciais para o impedimento taxonômico e representam um componente essencial da pesquisa acarológica moderna, incluindo as investigações conduzidas por pesquisadores brasileiros. Infelizmente, o progresso no uso desses métodos estagnou em muitos países de baixa e média renda, incluindo o Brasil, como consequência de fatores como instabilidade cambial, dependência de reagentes e equipamentos importados, deficiências de infraestrutura (falta de manutenção e de pessoal qualificado), e financiamento limitado para pesquisa básica sobre ameaças de doenças ainda não reconhecidas. Como resultado, muitos pesquisadores brasileiros não têm outra opção a não ser relatar a identificação de espécimes de carrapatos em nível de gênero e não em nível de espécie, impossibilitando avaliar completamente seu papel como hospedeiros de patógenos conhecidos ou emergentes e determinar a verdadeira distribuição geográfica e gama de hospedeiros usados pelos carrapatos.

Os pesquisadores brasileiros não são os únicos a enfrentar essa situação, e um número crescente de soluções possíveis, baseadas no uso de tecnologias moleculares de menor complexidade, têm sido propostas para permitir a identificação econômica e reprodutível de carrapatos e/ou seus patógenos associados, sem a necessidade de sequenciamento de nucleotídeos. Em 2019 o grupo de pesquisa do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LBioMol), desenvolveu e validou um protocolo com base no método de Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), para a identificação em nível de espécie da maioria dos carrapatos Ixodidae registrados no Brasil (DE ABREU, 2019). Esse sistema demonstrou ser altamente eficiente e, como tal, foi empregado como base para o desenvolvimento de um ferramenta “on-line” denominada “TickCutter” (disponível em <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter>), projetada por Dr. Daniel Paiva Barros de Abreu e pelo então aluno de iniciação científica Lucas Aguiar Rosa Machado (atual aluno de mestrado). Apesar de se mostrar promissor como solução econômica para vigilância de carrapatos no Brasil, o sistema não é livre de limitações. Em primeiro lugar, as sequências 16S

não estão disponíveis para todos os carrapatos Ixodidae registrados no Brasil. Em segundo lugar, algumas espécies de carrapatos geram múltiplos perfis de bandas (devido a polimorfismos intraespecíficos nos amplicons). Em terceiro lugar, algumas espécies requerem uma terceira enzima de restrição para garantir sua identificação precisa. Em quarto lugar, a avaliação original da ferramenta “TickCutter” não incluiu sequências derivadas de carrapatos da família Argasidae. Além desses fatores, o ensaio de PCR para amplificação do marcador 16S rDNA usando DNA produzido a partir de carrapatos imaturos como molde foi revelado pelo mesmo grupo de pesquisa como menos sensível do que os ensaios que amplificam outros marcadores, especificamente COI e ITS2, principalmente quando os carrapatos foram preservados em isopropanol, que é o fixador mais utilizado pelos acarologistas brasileiros para conservação de espécimes (VARELA, 2016).

O presente trabalho buscou expandir e refinar a ferramenta “on-line” “TickCutter” através da atualização do banco de dados de 16S da ferramenta por adição de novos dados e o desenvolvimento de um método para identificação de carrapatos *Amblyomma* por PCR-RFLP do marcador COI, com posterior desenvolvimento de uma ferramenta baseada no novo método para introduzir maior flexibilidade à plataforma.

Espera-se que o método desenvolvido nesse trabalho servirá como uma alternativa ou complemento ao método anterior, baseado em 16S, quando a amplificação do marcador 16S rDNA for insuficiente ou ausente ou quando o usuário deseja confirmar os resultados que obteve com 16S sem recorrer ao sequenciamento molecular.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 As intersecções entre parasitologia, animais silvestres e o conceito de Saúde Única

A ciência veterinária está posicionada no centro do conceito de saúde única, que objetiva unificar as atividades nas áreas de saúde humana, animal e ambiental, resultando em soluções para os principais desafios a saúde que o planeta está enfrentando no presente ou poderá enfrentar em um futuro próximo (GRUETZMACHER et al., 2021; DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2018; COCCIA, 2022; OTRANTO; STRUBE; XIAO, 2021). Este conceito é de extrema relevância para o Brasil, país que possui a maior biodiversidade do planeta, e uma das maiores potências mundiais no setor agropecuário (LEMES; DE ANDRADE; LOYOLA, 2020). No entanto, verifica-se ainda taxa expressiva de doenças parasitárias e infecciosas, muitas destas transmitidas por vetores artrópodes (LEAL FILHO et al., 2018). O desenvolvimento de soluções para assuntos de relevância dentro do conceito de Saúde Única deveria ser construído com base no aprimoramento da capacidade de controle e maior investimento em pesquisa (básica e aplicada) e inovação (MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ., 2018; ARSHAD et al., 2021). Assim, o fornecimento das respostas envolverá aspectos sócio-políticos (fortalecimento de colaborações intersetorial e intrasetorial; participação e mobilização das comunidades afetadas) e científicos, incluindo reforços na vigilância e diagnóstico associado a avaliação de eficácia das intervenções (OTRANTO; STRUBE; XIAO, 2021; MICHALON, 2020).

As principais intersecções de Saúde Única e parasitologia dos animais silvestres incluem zoonoses parasitárias, vetores e doenças transmitidas por vetores, doenças infecciosas emergentes, transmissão de doenças em interfaces animais silvestres/animais domésticos/humanos, doenças negligenciadas, mudanças climáticas e segurança alimentar (KRECEK; RABINOWITZ; CONRAD, 2020; OLIVEIRA et al., 2021). Os pesquisadores no campo de parasitologia da fauna silvestre aplicaram ativamente e durante muito tempo a abordagem em Saúde Única, mesmo antes da popularização do conceito (HOTEZ, 2018; WHITE; FORESTER; CRAFT, 2018). Isto ocorreu através da forte abordagem ecológica às questões relativas à diversidade e complexidade da transmissão de parasitos entre os compartimentos hospedeiros, níveis tróficos e ambiente, juntamente com o reconhecimento dos fatores de risco socioeconômicos vinculados a muitas doenças parasitárias negligenciadas (HASSELL et al., 2017).

Os animais silvestres são frequentemente considerados dentro do contexto de saúde única como reservatórios de doenças emergentes que ameaçam a saúde humana ou a segurança alimentar, e não como habitantes importantes de um ambiente em constante mudança e com riscos compartilhados (BOWSHER et al., 2021). Resultando em uma visão antropocêntrica e unidirecional de Saúde Única (especialmente dentro da saúde humana) que enfatizou o fluxo, ou o transbordamento, de doenças infecciosas de origem animal para receptores humanos. Conforme mostrado claramente pela pandemia COVID-19, a percepção pública de doenças emergentes da vida selvagem, se não enquadradas e comunicadas de maneira adequada, pode representar uma ameaça à conservação da vida silvestre (YUAN et al., 2020; LU et al., 2021). Uma melhor compreensão dos mecanismos ecológicos fundamentais pode surgir da aplicação de métodos e conceitos da parasitologia de animais silvestres a outros problemas comuns a saúde humana, animal e do meio ambiente. Os parasitos são onipresentes nas populações de animais silvestres, e sua presença não significa necessariamente que a fauna silvestre não esteja saudável (KRECEK; RABINOWITZ; CONRAD, 2020; WHITE; FORESTER; CRAFT, 2018; HASSELL et al., 2017). Na verdade, os parasitos podem servir como indicadores de alta biodiversidade e relações tróficas intactas em ecossistemas saudáveis (JENKINS et al., 2015).

Entender o sistema ecológico, bem como a estrutura social e as percepções de risco subjacentes, pode ajudar a decidir quando e como agir em resposta à detecção de determinado parasito na fauna silvestre (JENKINS et al., 2015; POLLEY; THOMPSON, 2015; MACHALABA et al., 2021).

## 2.2 A importância de carrapatos e as doenças transmitidas por carrapatos

Estima-se que haja no mundo mais de 850 espécies de carrapatos parasitando inúmeras espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012a; DANTAS-TORRES et al., 2019). Carrapatos (Acari: Ixodidae) são artrópodes hematófagos obrigatórios de distribuição mundial (NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009). Os carrapatos afetam humanos e animais, causando reações alérgicas, danos às peles, diminuição da produção animal, infecções secundárias e a transmissão de patógenos causadores de doenças (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2018; GRISI et al., 2014; CALVANO et al., 2021). Os estudos sobre os carrapatos, bem como sobre os patógenos e parasitos por eles transmitidos, podem ser divididos em três grandes áreas, a saber, carrapatos de animais de produção, carrapatos de animais de companhia e carrapatos de animais selvagens. As duas primeiras áreas têm uma longa história de pesquisa, que foi e continua a ser estimulada pela necessidade de controlar as infestações como forma de reduzir os impactos negativos sobre a saúde animal e a eficiência produtiva (bioeconomia) incluindo impactos associados a patógenos e parasitos transmitidos pelos carrapatos, alguns dos quais são zoonóticos ou têm potencial zoonótico (ONMAZ et al., 2013; BERMÚDEZ et al., 2021; MAGNARELLI, 2009; RIBEIRO et al., 2021; CHARLES et al., 2021; BUCZEK, A.; BUCZEK, W., 2021). Como resultado, um corpo substancial de literatura foi gerado sobre quase todos os aspectos da biologia desses carrapatos, suas interações com seus hospedeiros e métodos para o controle e tratamento eficientes de infestações e, em alguns casos, das doenças transmitidas por esses ectoparasitos (DE LA FUENTE et al., 2017; ESTRADA-PEÑA; DE LA FUENTE; CABEZAS-CRUZ, 2017; VALENTE et al., 2021; CUTLER et al., 2021).

Em contraste, apesar de um progresso substancial durante os últimos 20 anos, seria justo afirmar que o nosso conhecimento sobre a bioecologia de carrapatos associados a animais selvagens e seus impactos (reais e potenciais) sobre a saúde de seus hospedeiros, outros animais e humanos permanece bastante incipiente (BARBIERI et al., 2019; ESTRADA-PEÑA; DE LA FUENTE; CABEZAS-CRUZ, 2017; ESTEVE-GASSENT et al., 2016; LUZ; FACCINI; MCINTOSH, 2017; LUZ et al., 2018b; PEIXOTO et al., 2021; WIKEL, 2018; WITTER, et al., 2016). Esta diferença, em relação às outras áreas de pesquisa sobre carrapatos, pode ser atribuída a uma série de fatores, incluindo, a percepção equivocada de que os carrapatos associados à vida selvagem são de importância limitada economicamente ou para a saúde pública, as inerentes dificuldades associadas ao trabalho com animais selvagens e talvez o mais importante seria a falta de comunicação e interação entre os diversos pesquisadores que estudam os diferentes aspectos (médicos, veterinários, acarológicos e ambientais) desses parasitos e as doenças por eles transmitidas. Felizmente, o ressurgimento do conceito de saúde única durante a primeira década do século atual (GRUETZMACHER et al., 2021; DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012a; CHARLES et al., 2021; PASCUCCI et al., 2022), começou a mostrar que a execução de pesquisas básicas sobre esses carrapatos associados aos animais silvestres é de fundamental importância em termos de saúde animal, humana e ambiental (CHARLES et al., 2021; PASCUCCI et al., 2022; SPRONG; BRAKS, 2016).

A importância dos carrapatos associados à vida selvagem em relação aos fatores identificados acima, e o valor de aplicar o conceito de saúde única ao estudar estes parasitos, pode provavelmente ser melhor demonstrada usando o exemplo de carrapatos do gênero *Ixodes* como vetores de bactérias do gênero *Borrelia*, principalmente da espécie *Borrelia burgdorferi*

(o agente etiológico da doença de Lyme) em várias regiões do mundo. Os primeiros 51 casos da doença de Lyme, foram registrados em 1976, na região conhecida como “The Lyme”, em Connecticut, estado localizado no nordeste dos Estados Unidos da América (EUA) (STEERE et al., 2004). Uma conexão entre picadas de carrapato e o desenvolvimento da doença foi rapidamente estabelecida, e *Borrelia burgdorferi* foi identificada em 1982 (BURGDORFER et al., 1982). O principal vetor da bactéria é o *Ixodes scapularis*, comumente conhecido como o carrapato de patas pretas dos cervídeos (QIU et al., 2002). Além de transmitir *B. burgdorferi*, essa espécie de carrapato também pode transmitir os agentes da babesiose humana (*Babesia microti*) e da erliquiose (*Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophila* e *Anaplasma phagocytophilum*) (SCHULZE et al., 2005). Os centros de controle de doenças (CDC) passaram a realizar o acompanhamento dos casos da doença em 1985, época em que foi classificada como de notificação obrigatória. Durante as décadas subsequentes, o número de casos confirmados da doença de Lyme identificados anualmente, por programas de vigilância nacionais padronizados, aumentou para um nível de 30.000 tornando-a a doença transmitida por vetor mais prevalente no país (BISANZIO et al., 2020). No entanto, o CDC declarou que o valor de 30.000 não reflete fielmente todos os casos de doença de Lyme diagnosticados anualmente nos Estados Unidos e, usando dados de fontes alternativas, eles estimam que o número real de casos da doença de Lyme é de aproximadamente 476.000 por ano (KUGELER et al., 2021).

Em termos de impactos econômicos, um estudo conduzido pela Escola de Saúde Pública Johns Hopkins Bloomberg estimou que a doença de Lyme custa ao sistema de saúde dos EUA entre US \$ 712 milhões e US \$ 1,3 bilhão por ano - ou quase US \$ 3.000 por paciente em média (ADRION et al., 2015).

O progresso na compreensão, mas não no controle desta doença, foi alcançado por meio da colaboração de pesquisadores de áreas distintas (SPRONG; BRAKS, 2016). Assim, microbiologistas identificaram e caracterizaram o agente causador, cientistas médicos fizeram progressos no sentido de compreender as complexidades do processo da doença, veterinários da vida selvagem e biólogos demonstraram como a doença é mantida na natureza e seus esforços combinados mostraram como a distribuição desta doença se expandiu, e continua a expandir de seu foco original no nordeste dos EUA, para incluir toda a costa leste dos EUA (EDDENS et al., 2019). Ecologistas contribuíram demonstrando que o surgimento original da doença de Lyme em Connecticut foi atribuído principalmente a mudanças no uso da terra (STEERE et al., 2004). Ou seja, a terra que antes era usada para agricultura tornou-se reflorestada e cada vez mais desenvolvida para uso residencial nos subúrbios. Essas mudanças favorecem a expansão do habitat que sustenta os carrapatos e a vida selvagem e, portanto, a transmissão de doenças transmitidas por carrapatos de animais silvestres para pessoas em áreas residenciais e entre aqueles que trabalham ou se divertem ao ar livre. Pesquisas produzidas por ecologistas moleculares e biólogos evolutivos determinaram que a bactéria da doença de Lyme é antiga na América do Norte, circulando silenciosamente nas florestas por pelo menos 60.000 anos - muito antes de a doença ser descrita pela primeira vez, em 1976 e muito antes da chegada de humanos (WALTER et al., 2017). A descoberta mostra que a epidemia da doença de Lyme em curso não foi desencadeada por uma introdução recente da bactéria ou uma mudança evolutiva - como uma mutação que tornou a bactéria mais facilmente transmissível. Está ligada à transformação ecológica de grande parte da América do Norte. Especificamente, a fragmentação das florestas e a explosão populacional de cervídeos no século passado criaram as condições ideais para a propagação de carrapatos e desencadearam esta epidemia contínua (MACDONALD; LARSEN.; PLANTINGA, 2019; Levi et al., 2012).

Relatos de doenças transmitidas por carrapatos (DTCs) vem aumentando mundialmente e há uma clara necessidade de mais estudos envolvendo projetos de pesquisa básica, com o intuito de melhorar a nossa compreensão da bioecologia, biogeografia, genética de populações e capacidade destes artrópodes de atuarem como vetores de patógenos (KASHKYNBAYEV;

KOPTLEUOVA, 2020; WISELY; GLASS, 2019; MURGIA et al., 2019). A aquisição destas informações é um pré-requisito para o desenvolvimento de programas para o controle de DTCs (KADING et al., 2018; PLEY et al., 2021). Apesar da abundância global de seres humanos e sua presença em uma variedade de climas e condições ecológicas, estes não atuam como reservatórios para DTCs (PAROLA; RAOULT, 2001). Estas doenças diferem da epidemiologia de algumas das doenças humanas transmitidas por dípteros vetores, como a malária. As DTCs de seres humanos, são tipicamente o resultado de uma violação dos habitats (antropização de biomas) onde circulam reservatórios (animais silvestres) e os carrapatos vetores (OGDEN; MECHAI; MARGOS, 2013; DE LA FUENTE et al., 2017; GILBERT, 2021). As DTCs de seres humanos, animais de produção e animais de companhia, podem sobrepor-se, e alguns agentes, tais como *Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum* são capazes de infectar hospedeiros pertencentes a mais do que uma destas categorias, apesar de todos os agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos serem associados originalmente com reservatórios silvestres (TSAO et al., 2021; ESPINAZE et al., 2018).

Durante os últimos 20 anos, pesquisadores brasileiros, desempenharam um papel de liderança nos esforços para melhorar o nosso conhecimento da bioecologia, a presença de patógenos e a dinâmica das populações de carrapatos associados com animais silvestres na América do Sul (LABRUNA, et al., 2004; LABRUNA et al., 2005a; LABRUNA, et al., 2007; LABRUNA, et al., 2009a; LABRUNA, et al., 2016; HORTA, et al., 2006; DANTAS-TORRES, et al., 2012b; LUZ et al., 2012; LUZ et al., 2018a; BARROS-BATTESTI, et al., 2015; LUGARINI, et al., 2015; MARTINS, et al., 2016; BITENCOURTH et al., 2019; VALENTE et al., 2020). No entanto, as informações em relação à ocorrência de patógenos transmitidas por carrapatos associados com mamíferos e aves silvestres, ainda deve ser considerada limitada (LUZ, H; FACCINI; MCINTOSH, 2017; ZERINGÓTA et al., 2017; BARBIERI, et al., 2019; PACHECO et al., 2021). A fauna de carrapatos do Brasil é composta por 76 espécies reconhecidas, 25 da família Argasidae e 51 da família Ixodidae, das quais 6 (7,9%) foram relatadas desde 2019 (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019, ONOFRIO et al., 2020; MUÑOZ-LEAL et al., 2020; MUÑOZ-LEAL et al., 2021). A família Ixodidae é representada por espécies dos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus*, com a maioria dos casos de infestação humana associada a carrapatos *Amblyomma* que utilizam animais selvagens como hospedeiros (WIKEL, 2018; WITTER, et al., 2016). O gênero *Amblyomma* é o mais numeroso, com 33 espécies (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019). Do ponto de vista para medicina humana, o gênero *Amblyomma* é considerado o mais importante da América do Sul, onde as doenças humanas causadas por agentes transmitidas por carrapatos, especificamente, *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri* (sensu strito) e *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, são transmitidas através de espécies ixodídeos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2011a, 2011b; NIERI-BASTOS et al., 2013; KRAWCZAK et al., 2016). Este gênero também é reconhecido como o hospedeiro da maioria (15/16) dos membros do gênero *Rickettsia* reconhecidos no Brasil, muitos dos quais são de patogenicidade indeterminada para animais e humanos (SANTOLIN; FAMADAS; MCINTOSH, 2013; PEIXOTO et al., 2021). Os membros deste gênero parasitam uma ampla gama de hospedeiros, onde os adultos têm preferência pela ordem Mammalia enquanto aves silvestres são parasitadas, principalmente, por larvas e ninfas de *Amblyomma* sp., raramente por *Amblyomma* adultos (BARROS-BATTESTI et al., 2006; OGRZEWALSKA et al., 2008; DANTAS-TORRES et al., 2019). Anfíbios e répteis, em menor escala, também são reconhecidos como hospedeiros de algumas espécies de *Amblyomma* sp. (DANTAS-TORRES et al., 2019). Na região neotropical, este gênero representa um importante e emergente problema de saúde pública, dado a alta prevalência de casos de parasitismo em humanos e pelo comprovado potencial como vetores de transmissão de agentes infecciosos (DIAS et al., 2020; BORSOI et al., 2019; RECK et al 2018). Evidentemente, a adequada identificação das espécies

de *Amblyomma* envolvidas, ou com potencial de serem envolvidos, em problemas de Saúde Pública e animal é crucial para melhorar o nosso entendimento e para o desenvolvimento de estratégias para controle de DTCs.

### 2.3 A importância da biologia molecular no estudo de carrapatos e as DTCs

Tradicionalmente, os carrapatos do gênero *Amblyomma* são identificados através da avaliação de características morfológicas empregando a chave de Martins et al. (2010), para ninfas e a chave de Barros-Battesti, Arzua e Bechara (2006), para adultos. No entanto, a identificação das espécies com base em dados morfológicos muitas vezes é difícil, particularmente no caso das ninfas, mas também quando as amostras de adultos estão fisicamente danificadas. Além disso, até o momento, não existe uma chave para larvas deste gênero. Durante as últimas décadas, estudos que envolveram a identificação de carrapatos vêm mostrando uma crescente tendência em incorporar análises moleculares, principalmente ensaios baseados na técnica de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) em combinação com o sequenciamento de “amplicons”, utilizando um número limitado de sequências mitocondriais e/ou nucleares para complementar e estender os achados morfológicos (LABRUNA et al., 2005b; LV et al., 2014a; LUZ et al., 2017; LUZ et al., 2018a; MARTINS et al., 2019). Os marcadores moleculares mais amplamente utilizados são os genes mitocondriais que codificam a grande (16S) e a pequena (12S) subunidades do RNA ribossomal (WANG et al., 2019). Enquanto o gene mitocondrial que codifica a Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), vem surgindo como um marcador adicional (LV et al., 2014a; LV et al., 2014b; LUZ et al., 2018b; FELIPE et al., 2021). As sequências nucleares incluem o gene que codifica a subunidade pequena (18S) de RNA ribossomal (rRNA), e a região do segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico (ITS2) (LV et al., 2014b; ABOUELHASSAN et al., 2019). A contribuição desses dados tem sido substancial e, em alguns casos, desempenharam um papel central na solução de problemas taxonômicos importantes, incluindo a correta identificação de *Amblyomma latepunctatum*, que mesmo na fase adulta era frequentemente identificado, erroneamente, como *Amblyomma incisum* ou *Amblyomma sculpturatum* (LABRUNA et al., 2005b). Dados moleculares também foram indispensáveis para chegar à identificação da espécie *Amblyomma yucumense*, que é restrita ao sul do Brasil e à Argentina e que frequentemente foi confundido com a espécie *Amblyomma dubitatum* (KRAWCZAK et al., 2015; LAMATTINA et al., 2018). No entanto, talvez o exemplo mais claro de como a identificação imprecisa das espécies pode levar a conclusões erradas em relação à biologia dos carrapatos, foi a descoberta de que *Amblyomma cajennense*, a espécie mais amplamente estudada na América Latina, é, de fato, um complexo de seis espécies; *A. cajennense sensu stricto* (s.s.), *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma patinoi*, *Amblyomma sculptum*, e *Amblyomma tonelliae*. Três deles, *A. interandinum*, *A. patinoi*, e *A. tonelliae*, representam novas espécies, enquanto *A. mixtum* e *A. sculptum* foram redescritas. Esta conclusão foi alcançada através de uma combinação de experimentos biológicos (cruzamento entre carrapatos oriundos de várias regiões do Brasil e Argentina), a análise de múltiplas sequências e uma profunda reavaliação dos aspectos morfológicos (NAVA et al., 2014).

A mais nova adição ao gênero *Amblyomma* é a espécie *A. romarioi*, descrita em 2019 empregando a combinação de métodos morfológicos tradicionais e moleculares por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) e da UFRRJ (MARTINS et al., 2019). Esta espécie é filogeneticamente relacionada às espécies *A. geayi*, *A. longirostre* e *A. parkeri* (LUZ et al., 2017; MARTINS et al., 2019). Os estágios imaturos de *A. romarioi* infestam aves silvestres no sudeste do país, com estudos demonstrando que esta espécie até então não caracterizada, é na realidade a segunda espécie de carrapato mais abundante em termos de

infestação de aves no bioma Mata Atlântica, sendo superado apenas por *A. longirostre* (LUZ et al., 2017; ZERINGOTA et al., 2017). Embora inicialmente identificadas infestando aves silvestres, ninfas foram posteriormente detectadas infestando primatas não humanos (MARTINS et al., 2019). É importante ressaltar que a maioria das amostras coletadas até o momento foram infectadas com agentes rickettsiais pertencentes ao grupo da febre maculosa, especificamente *R. rhipicephali* (LUZ et al., 2017; ZERINGOTA et al., 2016) e *Candidatus "Rickettsia paranaensis"* (PECKLE et al., 2019). A elucidação desses fatos só foi possível através da aplicação de métodos moleculares para a determinação da identificação em nível de espécie de todas as larvas e ninfas coletadas nas aves e para a detecção e caracterização das bactérias *Rickettsia*. É pertinente observar que, antes da publicação desses estudos, a maioria dos levantamentos de carrapatos de aves silvestres realizados no Brasil relatou identificações em nível de espécie para apenas um número limitado (5 a 25%), dos espécimes coletados (TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2011; MATURANO et al., 2015), com a maioria relatada como *Amblyomma* spp. As razões para isso foram essencialmente financeiras, como será discutido em mais detalhes adiante. No entanto, está claro que, na ausência de identificação em nível de espécie, as informações que poderiam ter sido derivadas desses levantamentos eram limitadas e claramente subestimavam a diversidade de espécies de carrapatos associadas a aves silvestres no Brasil (LUZ et al., 2017).

Apesar dos avanços conseguidos até o momento, ainda existe uma série de barreiras que impedem que as técnicas moleculares se tornem a abordagem padrão para a identificação de carrapatos associados a animais silvestres no Brasil. O primeiro obstáculo é o acesso a uma infraestrutura em termos de equipamentos e pessoal qualificado para executar estas técnicas. A segunda barreira se refere ao elevado custo associado com a utilização de serviços de sequenciamento de DNA como um método para identificação. A questão de custo também deve ser considerada no contexto de estudos de campo, onde grandes quantidades (centenas a milhares) de carrapatos imaturos podem ser obtidas em uma única coleta. O terceiro obstáculo, e possivelmente o que mais dificulta o uso de técnicas moleculares rotineiramente, é a insuficiência em termos das sequências de referência depositadas em bancos de dados públicos para comparação e análise.

Por um lado, é correto afirmar que há uma carência mundial de técnicos e profissionais treinados em taxonomia de carrapatos, sendo este impedimento taxonômico, acentuado nos países da América Latina, o que explica, pelo menos em parte, a dificuldade existente na obtenção de informações a respeito da distribuição de carrapatos e de seus hospedeiros na região Neotropical (ENGEL et al., 2021). Por outro lado, a biologia molecular tem o potencial de fornecer um sistema operacional que permita uma classificação rápida e eficiente desses organismos, para que se possa compreender a situação taxonômica dos carrapatos e dos patógenos por eles transmitidos (LUZ et al., 2017). No entanto, para cumprir esse potencial, pesquisas básicas adicionais serão necessárias para superar os obstáculos que estão bloqueando o desenvolvimento e a ampla aplicação destas tecnologias.

## **2.4 Estratégias para a aplicação de métodos moleculares ao estudo de carrapatos e DTCs**

Prever o surgimento de ameaças zoonóticas, incluindo doenças transmitidas por carrapatos (DTCs), requer programas de vigilância coordenados e validados capazes de detectar padrões na prevalência e distribuição dos patógenos e vetores (MADER et al., 2021; FRYXELL; VOGT, 2010). Conforme notado anteriormente em relação aos carrapatos, a compreensão das DTCs no Brasil vem sendo aprimorada através da aplicação de técnicas moleculares (PCR e sequenciamento) que permitem a caracterização ao nível de espécie de vetores e patógenos (MCINTOSH et al., 2015; LUZ et al., 2017; DE ABREU et al., 2019; PECKLE et al., 2019; BINETRUY et al., 2020; WECK et al., 2020; PEIXOTO et al., 2021;

MONTANEZ-GONZALEZ et al., 2021). Porém, seria justo afirmar que o potencial da vigilância molecular de DTCs no Brasil está subdesenvolvido devido à colaboração limitada entre grupos de pesquisa, à ausência de metodologias padronizadas e ao elevado custo de pesquisas que empregam sequenciamento em larga escala (FACCINI et al., 2020; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2021). Tais pesquisas não são viáveis para a maioria dos pesquisadores brasileiros no atual clima de austeridade financeira, que provavelmente persistirá como consequência da pandemia COVID-19 (FACCINI et al., 2020; MIGUEL et al., 2021; PEIXOTO et al., 2021).

As doenças transmitidas por carrapatos, incluindo as zoonoses, não podem ser efetivamente compreendidas sem o conhecimento da relação parasito-hospedeiro (HEMMING-SCHROEDER et al., 2018; RIZZOLI et al., 2019; SWEI et al., 2020). No entanto, para gerar tais informações, é necessário primeiro identificar com precisão os carrapatos coletados nestes hospedeiros (LV et al., 2014b; ABOUELHASSAN et al., 2019; FELIPE et al., 2021). Avanços significativos na nossa compreensão da biologia, ecologia e distribuição dos carrapatos do gênero *Amblyomma* e os agentes patogênicos transmitidos por eles no Brasil foram consolidados na última década (LABRUNA, et al., 2007; LABRUNA, et al., 2016; LUZ, et al., 2012; LUZ, et al., 2018b; BARROS-BATTESTI, et al., 2015; BORSOI et al., 2019; VALENTE et al., 2020; WECK et al., 2020; PEIXOTO et al., 2021). No entanto, muitas lacunas sobre a compreensão da relação parasito-hospedeiro das espécies deste gênero ainda existem, como consequência da ocorrência da diversidade de ecótopos que caracterizam os cinco biomas que constituem o território nacional. Portanto, é evidente que o continuado progresso neste campo irá depender de novas técnicas para identificação das populações de carrapatos, de preferência técnicas de baixo custo.

A evolução da biologia molecular, como um conjunto de métodos e abordagens para o estudo de doenças e patógenos em nível de DNA, RNA e proteína, tem sido muita rápida nos últimos 20 anos (VAN HOLDE; ZLATANOVA, 2018). Melhorias e avanços na engenharia, nanotecnologia e as ciências de computação forneceram as ferramentas necessárias (sequenciamento de próxima geração, por exemplo), para revelar a maquinaria molecular em níveis considerados impossíveis a pouco tempo atrás (BURIAN et al., 2021; DEROCLES et al., 2018). Os avanços obtidos através da aplicação destas tecnologias de alta sofisticação (denominado “high tech”) ao estudo de doenças humanas e animais, incluindo a fauna silvestre, vem sendo amplamente documentados na literatura científica internacional (D’HUMIÈRES et al., 2021; MALLA et al., 2019). Além disso, o potencial das abordagens “high-tech” para resolver problemas importantes em Saúde Única, principalmente nas áreas de monitoramento e diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias, tem sido enaltecido por seus proponentes (GHOSH; FISHER; BATES, 2018; AARESTRUP; BONTEN; KOOPMANS, 2021; KIM; CHA, 2021). No entanto, a execução de pesquisas que empregam tais tecnologias apresenta custos elevados não somente em termos dos investimentos iniciais dos equipamentos, mas também na manutenção de infraestrutura, compra de reagentes importados e pagamento de salários para o pessoal altamente qualificado, necessário para efetivamente realizar pesquisas com base nessas técnicas (HOTRON et al., 2018; RIZAL., 2020).

A evolução humana não acompanhou o mesmo ritmo das técnicas empregadas em biologia molecular, e está se tornando cada vez mais evidente para a comunidade biomédica que será muito difícil, pelo menos em curto e médio prazo, analisar e efetivamente interpretar a enorme quantidade de informação produzida pelas abordagens “high-tech”. Tal fator limita a transformação destes dados em soluções efetivas para os inúmeros desafios à saúde humana e/ou animal, especificamente no Brasil dos dias atuais (FRISCHTAK, 2019; MAGNUSSON et al., 2018; FACCINI et al., 2020). Assim, os parasitologistas brasileiros podem optar pelo uso de tecnologias sofisticadas, na tentativa de manter suas investigações tão atuais quanto as pesquisas executadas em outras regiões do mundo ou, alternativamente, podem maximizar seus

esforços através do uso de metodologias moleculares de menor complexidade (denominados “low-tech”), porém com reconhecido grau elevado de reprodutibilidade. Na condição fiscal atual e futura, a segunda opção parece ser a mais sensata. Contudo, não é recomendado ignorar totalmente as abordagens e oportunidades associadas a métodos “high-tech”. Assim, é recomendável a manutenção dos esforços para monitorar de perto o progresso alcançando, identificando os avanços que podem ser implementados para aprimorar as metodologias “low-tech” empregadas para geração de dados com maior robustez, relevância e validade (GRENINGER AL. 2018).

A evolução é geralmente vista como um processo positivo que leva a melhorias na aptidão e desenvolvimento das espécies. No entanto, este não é sempre o caso. É válido, às vezes, dar um passo para trás e revisar os sistemas mais simples já existentes. Parasitologistas brasileiros que trabalham com carrapatos não estão sozinhos nesta situação e, nos últimos anos, uma série de possíveis soluções foram propostas para permitir a identificação reprodutível em nível de espécie em média a grande escala de diferentes artrópodes (incluindo carrapatos) e seus patógenos associados (ALMAZÁN et al., 2020; THOMPSON et al., 2020; DE ABREU et al., 2019; KATO et al., 2019; SHAIKEVICH; BOGACHEVA; GANUSHKINA, 2019). Tais abordagens, invariavelmente, empregam técnicas moleculares de baixo custo com complexidade reduzida, que são baseadas na existência de polimorfismos de sequência dentro dos mesmos produtos de PCR usados para o sequenciamento de nucleotídeos. Tais polimorfismos podem ser explorados usando géis de acrilamida desnaturante (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante - “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” - DGGE), fluorometria (Análise de Temperatura de Fusão de Alta Resolução - “High Resolution Melt Analysis” - HRM) ou digestão de amplicons com endonucleases de restrição seguida por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de reação em cadeia da polimerase - PCR-RFLP), para gerar padrões de bandas diferenciais (THOMPSON et al., 2020; RAHIMI et al., 2019).

Estas técnicas foram amplamente experimentadas, testadas e avaliadas como eficazes no passado, mas não são vistas de maneira tão positiva por muitos pesquisadores, devido à falta de conhecimento acerca de seu potencial e a percepção, equivocada, de que elas são inferiores a tecnologias de ponta. Conforme mostrado via uma série de publicações, esses métodos podem e estão sendo usados para fazer contribuições significativas para vários aspectos da pesquisa parasitológica moderna, incluindo, genotipagem de protozoários (OHIOLEI et al., 2021; BUDDHACHAT et al., 2020), helmintos (SKORPIKOVA et al., 2020; RAHIMI et al., 2019) e vetores artrópodes de doenças zoonóticas (MONTANEZ-GONZALEZ et al., 2021; ALMAZÁN et al., 2020; THOMPSON et al., 2020; DE ABREU et al., 2019; SHAIKEVICH; BOGACHEVA; GANUSHKINA, 2019), investigações de mecanismos de resistência (ZUCCHERATO et al., 2018) e também ao estudo das microbiotas desses parasitos (SINNATHAMBY et al., 2018). No entanto, é evidente que tais métodos continuam a ser cada vez menos empregados, particularmente por grupos de pesquisa no mundo desenvolvido. Contudo, a mudança de paradigma será apenas possível se formos capazes de formar pesquisadores com a habilidade de abordar problemas científicos questionando a razão da pesquisa em questão, ao invés de focar quase exclusivamente na metodologia científica empregada para alcançar a resposta a ser obtida.

O projeto atual visa dar continuidade a pesquisas investigando carrapatos de animais silvestres, através do desenvolvimento, aplicação e validação de um método molecular considerado “low-tech”. Especificamente, a técnica de PCR-RFLP, para aperfeiçoar um sistema inovador e econômico, denominado “TickCutter”, para a identificação diferencial em nível de espécies de carrapatos associados as aves silvestres brasileiras. Nossa equipe de pesquisa tem desenvolvido investigações nessas áreas por quase uma década (SANTOLIN; FAMADAS; MCINTOSH, 2013; ZERINGOTA et al., 2017; LUZ et al., 2017; DE ABREU et al., 2019) e

antes da atual crise financeira, nossas pesquisas dependiam cada vez mais do uso de abordagens, consideradas relativamente “high-tech”, que atualmente são inviáveis. Alternativamente a redução de nossas atividades nessa área, a crise econômica foi enxergada como uma oportunidade para ampliar e tornar as nossas atividades de pesquisa ainda mais relevantes.

## **2.5 PCR-RFLP e o sistema “TickCutter” como método alternativo ou complementar ao uso de sequenciamento para a identificação de carrapatos no Brasil**

A técnica de PCR-RFLP se baseia na digestão de fragmentos de DNA amplificados por PCR, através de endonucleases de restrição que geram uma série de fragmentos de diferentes tamanhos, que ocorrem como resultado de mutações em sequências dos sítios de restrição, a aquisição ou a deleção dos sítios de reconhecimento, ou inserções e exclusões nas sequências entre os sítios de reconhecimento (BRETTSCHEIDER, 1998). Os fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel (agarose ou poliacrilamida) e a imagem do gel é gravada digitalmente para posterior análise dos padrões de bandas (SNOWDON; LANGSDORF, 1998). O método básico de PCR-RFLP requer um grau de treinamento limitado, utiliza equipamentos (termocicladores, cubos de eletroforese em gel de agarose e foto-documentadores) encontrados na maioria dos laboratórios que empregam métodos moleculares e é considerado de alto custo-benefício (IGAWA et al., 2019; MONTANEZ-GONZALEZ et al., 2019; SANTOLIN; FAMADAS; MCINTOSH, 2013).

Vale a pena salientar mais uma vez que a questão de custo é um grande obstáculo à implementação de sequenciamento como a técnica de primeira escolha para identificação de carrapatos no Brasil e outros países na América Latina. Infelizmente, este impedimento ganha cada vez mais importância devido à instabilidade do dólar americano (GUZMAN; OCAMPO; STIGLITZ, 2018). Neste contexto, a maioria dos reagentes são importados dos EUA e sofreram aumentos de aproximadamente 40% nos últimos cinco anos, uma realidade que está em contraste direto com a dos pesquisadores do mundo desenvolvido, onde os custos de sequenciamento têm diminuído continuamente na última década (JEGATHISAWARAN et al., 2020). Esta diferença poderia exercer um impacto limitado no caso de estudos que analisam um pequeno número de carrapatos, ou uma única espécie associada com animais domésticos. No entanto, no caso dos carrapatos imaturos recuperados de animais silvestres, não é incomum trabalhar com hospedeiros infestados com mais de uma espécie de carrapatos ou ainda, diferentes variantes genéticas (haplótipos), da mesma espécie de carrapato recuperados do mesmo indivíduo (LUZ et al., 2017; FECCHIO et al., 2020; PACHECO et al., 2021). O custo da identificação, baseada no sequenciamento, de uma amostragem de apenas 100 carrapatos, (examinado um único gene, onde um mínimo de duas reações é necessário para assegurar uma análise precisa das duas cadeias de cada fragmento), tem um custo atual de R\$ 5.000,00 a 7.000,00. Estendendo este exemplo para o caso de um levantamento de um ano, com coletas mensais, o custo associado com a análise de 1200 carrapatos seria R\$ 60.000,00 a 84.000,00.

O conhecimento sobre as ameaças à saúde humana e animal por DTCs no Brasil, incluindo doenças emergentes oriundas de animais silvestres, é fragmentado e concentrado no formato de artigos científicos, dissertações e teses, que geralmente fornecem dados descritivos obtidos em pesquisas de curta duração. Muitos estudos empregam análise baseada em sequenciamento de apenas uma porção limitada dos carrapatos coletados e/ou patógenos sob investigação (OGRZEWALSKA et al., 2011; MATURANO et al., 2015; WITTER et al., 2016). Apesar de contribuir quantitativamente para a produção científica do país e qualitativamente por meio da geração de capital humano, fica evidente que o atual modelo de investigar este importante tópico é insustentável, gera lacunas de conhecimento e tem falhado em grande parte em produzir avanços conceituais em nossa compreensão de DTCs.

Em 2019, nosso grupo de pesquisa relatou o desenvolvimento e execução de uma validação preliminar de um protocolo de PCR-RFLP para a identificação em nível de espécie da maioria dos carrapatos da família Ixodidae registrados no Brasil (apresentado na tese de doutorado de Dr. Daniel Paiva Barros de Abreu - PPGCV/UFRRJ). Este método baseia-se no uso de duas enzimas de restrição (*DraI* e *VspI*), para digerir fragmentos gerados por PCR (de aproximadamente 460 pb) do gene que codifica o RNA ribossômico 16S (DE ABREU, 2019). Esse sistema demonstrou ser altamente eficiente para a identificação das espécies de carrapatos *Amblyomma* coletados de aves silvestres na Mata Atlântica (DE ABREU, 2019). No entanto, tornou-se evidente para nosso grupo de pesquisa, com base nas previsões para o futuro do modelo tradicional de publicação científica (STERN; O'SHEA, 2019; TENNANT, 2018) e o movimento crescente em direção à digitalização da educação científica e da pesquisa (POGORELOVA; EFIMOVA, 2020) que, apesar das óbvias vantagens associadas à metodologia PCR-RFLP, seria improvável que ela fosse adotada por outros grupos de pesquisa caso fosse simplesmente apresentada no formato de uma publicação científica tradicional revisada por pares.

Como resultado dessa percepção, a decisão foi tomada para tentar transformar o método básico de PCR-RFLP no componente central de uma ferramenta online, denominado "TickCutter", projetada pelo então aluno de doutorado Daniel Paiva Barros de Abreu e pelo então aluno de iniciação científica Lucas Aguiar Rosa Machado. Uma motivação adicional para investir nesta abordagem pouco convencional, foi a necessidade de constante atualização dos protocolos PCR-RFLP formulados para identificação de carrapatos ixodídeos em virtude da obtenção de novos dados moleculares ou descrição de novas espécies. Assim, a ferramenta on-line "TickCutter" foi desenvolvida com o intuito de facilitar a implementação das metodologias de PCR-RFLP previamente desenvolvidas, para oferecer um meio para a atualização contínua e para compartilhar os dados existentes e novos de maneiras que serão inerentemente impossíveis e ineficazes usando o caminho tradicional das publicações científicas. A hospedagem de fórum on-line em "TickCutter" possibilita ainda o contato e debate entre profissionais e acadêmicos que atuam na área de ixodologia no Brasil (DE ABREU, 2019). A aplicabilidade da ferramenta de busca e tutorias foi comprovada a partir da análise voluntária de dez usuários, executada em três rodadas e com subsequente aprimoramento da plataforma ao final de cada etapa (DE ABREU, 2019). Desta forma, a ferramenta on-line desenvolvida garante não somente a sobrevivência dos protocolos moleculares desenvolvidos e sua implementação por diferentes grupos de pesquisa, mas também a possibilidade de formação de uma rede de parcerias que, através de medidas estratégicas seria capaz de elaborar abordagens eficazes para o controle de doenças transmitidas por carrapatos no Brasil.

Evidentemente, este sistema inovador e promissor não é livre de limitações. Em primeiro lugar, as sequências 16S não estão disponíveis para todos os carrapatos da família Ixodidae registrados no Brasil e na sua versão original não foram incluídos dados referentes às espécies de carrapatos que pertencem à família Argasidae. Em segundo lugar, algumas espécies de carrapatos geram múltiplos perfis de bandas (devido a polimorfismos intraespecíficos nos "amplicons"). Em terceiro lugar algumas espécies requerem avaliação através de digestão com uma terceira enzima de restrição para garantir sua identificação precisa. Além desses fatores, o ensaio de PCR para amplificação do marcador 16S é conhecido por ser menos sensível do que os ensaios que amplificam outros marcadores, especificamente COI e ITS2 (VARELA, 2016). Geralmente, isso não é um problema quando trabalhando com adultos ou quando as amostras de formas imaturas foram conservadas através de congelamento ou em RNALater™, no entanto, pode se tornar uma limitação ao trabalhar com amostras de larvas e ninfas preservadas em isopropanol (VARELA, 2016). Nesse contexto, observou-se que a amplificação eficiente do alvo 16S a partir desse tipo de material pode ser difícil ou (em muitos casos) impossível, sem o uso de métodos caros de extração de DNA (como kits comerciais, por exemplo). Em

contraste, os marcadores COI e ITS podem frequentemente ser amplificados a partir de material preservado em isopropanol (VARELA, 2016).

Apesar de oferecer uma alternativa ao sequenciamento como o meio principal de identificação de carrapatos, o método PCR-RFLP e o sistema “TickCutter” são inerentemente dependentes do sequenciamento para fornecer as informações básicas necessárias para interpretar padrões de bandas e alcançar identificações em nível de espécie. Surpreendentemente, dada a importância deste gênero, os dados moleculares disponíveis para as espécies *Amblyomma* identificadas no Brasil podem ser considerados limitados. Um levantamento das sequências depositadas no banco de dados “GenBank” (produzido e mantido pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI)), para as 33 espécies de *Amblyomma* descritas para o Brasil, demonstrou que para as sequências de 16S rDNA, existe um total de 635 registros depositados para 32 das 33 espécies (a única exceção sendo *A. pictum*). Infelizmente, o número de sequências depositadas para cada espécie é altamente variável, com muitas espécies representadas por menos de 3 sequências, enquanto outras, incluindo *A. parvum* e *A. ovale*, são representadas por dezenas de sequências.

Em contraste, os conjuntos de sequências para os marcadores ITS2 e COI, estão muito longe de ser completos. No momento de iniciar o projeto, foi observado que sequências de ITS2 foram depositadas no GenBank para 18 das 33 espécies de *Amblyomma*, enquanto apenas 11 espécies tiveram sequências depositadas para COI. Este número de espécies aumentou para 15 quando sequências depositadas no banco de dados “Barcode of Life (BOLD)” foram consideradas, mas, mesmo assim, este valor representou menos de 50% das espécies de *Amblyomma* encontrados no Brasil. Ao longo do projeto, o número de sequências depositadas em bancos de dados públicos para ambos os marcadores aumentou. No caso do marcador ITS, um estudo realizado por pesquisadores franceses relatou as sequências de cinco espécies de *Amblyomma* coletadas na Guiana Francesa (BINETRUY et al., 2020), aumentando para 23 o número de espécies representadas no GenBank. O mesmo grupo de pesquisadores, também depositou várias sequências para o marcador COI derivado de diversas espécies de *Amblyomma* e outros gêneros de carrapatos como componente de um levantamento da Ixodofauna da Guiana Francesa (BINETRUY et al., 2019). Em contraste, uma única nova sequência para carrapatos brasileiros (*A. romitii*) foi depositada por nosso grupo de pesquisa em 2021. No entanto, a inclusão de sequências inéditas geradas pelo nosso grupo de pesquisa no início do projeto, antes das restrições impostas pela pandemia COVID-19, forneceu dados de sequências para um total de 27 das 33 espécies de *Amblyomma* reconhecidas no Brasil.

As dificuldades na obtenção de sequências, além do 16S rDNA mitocondrial para carrapatos brasileiros e sul-americanos, quase certamente refletem o fato de que os estudos moleculares iniciais realizados nos primeiros 15 anos do século XXI foram realizados por um número limitado de pesquisadores, principalmente o grupo do Professor Marcelo Labruna da USP (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2009b; NAVA et al., 2010; MARTINS et al., 2019; ONOFRIO et al., 2020), e se basearam quase que exclusivamente na análise de sequência por volta de 460 pb do gene que codifica o 16S rRNA, com um fragmento de 340 pb da sequência 12S rDNA, utilizado como o principal marcador secundário.

Como consequência da escolha dos marcadores feita pelos investigadores pioneiros, os estudos subsequentes foram essencialmente obrigados a utilizar os mesmos marcadores para permitir comparações entre os seus dados e os disponíveis nas bases de dados públicas. Esta situação também foi observada em outras regiões do globo, onde as sequências 16S são comumente usadas como o marcador primário para identificação de carrapatos. Curiosamente, apesar do uso esporádico tanto do marcador ITS quanto de COI em alguns estudos (LUZ et al., 2018; LABRUNA et al., 2005b), nenhum estudo foi publicado na América Latina para determinar a possibilidade e/ou o potencial valor do uso de marcadores alternativos.

Hebert et al. (2003) e Moritz; Cicero; Godfray (2004) sugeriram o uso e análise do fragmento 5' do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), como código de barras de DNA. A iniciativa do código de barras de DNA foi bem recebida pela comunidade científica devido à conectividade e linguagem comum das sequências de DNA, permitindo que pesquisadores em todo o mundo avançassem na taxonomia e estudos sistemáticos de vários grupos de organismos, incluindo vetores de doenças, de insetos e parasitos, incluindo carrapatos, flebotomíneos e mosquitos (BEEBE, 2018; FILIPE et al., 2021; SOUSA-PAULA et al., 2021; GUTIERREZ et al., 2021). O fragmento 5' de COI é considerado uma excelente ferramenta para o estudo de insetos e artrópodes de importância médica (ROSLIN et al., 2022; RUENCHIT, 2021). No entanto, as complicações associadas ao uso desse marcador incluem o potencial de amplificação de sequências nucleares de origem mitocondrial (NUMTs) e de endossimbiontes (RUENCHIT, 2021; ONDREJICKA et al., 2014).

Pesquisadores chineses publicaram dois estudos (LV et al., 2014a; LV et al., 2014b), comparando o uso de COI, 16S, ITS2 e 12S como marcadores primários para identificação de carrapatos em nível de espécie e demonstraram claramente a utilidade do marcador COI. Achados semelhantes foram posteriormente relatados por pesquisadores portugueses (FELIPE et al., 2021). No entanto, é importante notar que os estudos chineses demonstraram que a padronização da metodologia era necessária para cada grupo estudado, e que a amplificação bem-sucedida do marcador COI de algumas espécies de carrapatos só poderia ser alcançada usando uma combinação de diferentes “primers” e protocolos de termociclagem. Achados semelhantes foram relatados no estudo de carrapatos na Guiana Francesa (BINETRUY et al., 2019). Em conjunto, é possível que as dificuldades citadas acima tenham servido para dissuadir muitos pesquisadores sul-americanos de usar o marcador COI em seus estudos.

Apesar do baixo uso do marcador COI, planejou-se a expansão de “TickCutter” a partir do uso desse marcador para identificação de ixodídeos brasileiros.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Levantamento de Sequências COI

A análise foi iniciada pela aquisição de sequências depositadas em bancos de dados públicos (GenBank (CLARK et al., 2016) e BOLD (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007), disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> e <http://www.boldsystems.org/> respectivamente) ou utilizando sequências inéditas geradas por nosso grupo de pesquisa.

As sequências buscadas se limitaram inicialmente a sequências do marcador molecular Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) de carrapatos *Amblyomma* presentes no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019) e posteriormente foi expandido para incluir sequências depositadas para representantes dos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* documentados no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019, LABRUNA et al., 2020; ONOFRIO et al., 2020).

As sequências foram baixadas no formato FASTA e usadas para produzir “amplicons” virtuais de 709 pares de bases (pb), através da inclusão das sequências dos “primers” empregados nos ensaios de PCR, nos terminais 3' e 5'.

Para fins de documentação, foram registradas as seguintes informações (quando disponíveis) para cada sequência; número de acesso, espécie, país de origem e tamanho em pares de bases (pb). A maioria das sequências teve seu país de origem informado, entretanto em casos em que essa informação não foi fornecida a origem foi inferida a partir do título do artigo informado pelos responsáveis do depósito e em casos quando isso não foi possível o país de origem foi considerado “não informado”. Algumas sequências foram depositadas nos dois bancos de dados, sempre que esse fenômeno foi observado as informações foram registradas empregando as informações do GenBank.

Sequências adicionais, não depositadas em bancos de dados públicos, pertencentes ao Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LBioMol) do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foram incluídas no estudo. Nestes casos, o código interno do isolado foi usado no lugar do número de acesso.

Com o intuito de diferenciar o módulo baseado na análise das sequências COI da ferramenta “TickCutter” a nova ferramenta foi denominada “COIsearcher”, enquanto a antiga ferramenta passou a ser chamada “TickCutter 16S”.

### 3.2 Digestões enzimáticas *in silico* das sequências COI

A busca por enzimas de restrição envolveu a digestão *in silico* das sequências utilizando o “software” “on-line” gratuito NEBcutter V 2.0 (VINCZE; POSFAI & ROBERTS, 2003), disponível em <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>. As sequências foram inseridas no programa e uma lista das enzimas capazes de digerir cada “amplicon” virtual foi produzida e analisada manualmente para identificar enzimas com potencial de identificação interespecífica. A seleção de enzimas para análises *in vitro* foi baseada nos seguintes critérios: baixo custo por unidade da enzima; presença de pelo menos um sítio de clivagem no maior número possível de espécies de carrapatos; produção de pelo menos um fragmento de digestão com tamanho mínimo de 100 pb, o que permitiria a discriminação interespecífica usando eletroforese em géis de agarose. Portanto, a digestão *in silico* resultou na escolha de duas enzimas de restrição, com cada amostra sendo digerida duas vezes, uma por cada enzima.

Após escolha das enzimas de restrição a serem usadas pelo módulo foi necessário realizar a padronização do tamanho do fragmento de COI e criação dos “amplicons” para as próximas etapas. Para isso foi usado o par de “primers” LepF (5'-

ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') e LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAA AATCA-3') desenvolvido para lepidópteros, resultando em um fragmento de 658 pb sem as sequências dos “primers” (HAJIBABAEI et al., 2006).

No entanto, é importante notar que muitas das sequências disponíveis nos bancos de dados também careciam de alguns nucleotídeos nas suas extremidades. No caso de sequências de 658 pb, que faltaram apenas a região do “primer”, foi possível produzir “amplicons” virtuais completos simplesmente adicionando os nucleotídeos correspondentes aos “primers” nas extremidades 3' e 5'. No entanto, as sequências menores de 658 pb exigiram ajustes adicionais, que foram realizados dependendo da disponibilidade de sequências completas para representantes da mesma espécie ou, em casos extremos, espécies filogeneticamente relacionadas (por exemplo, *Amblyomma tigrinum* completado com *Amblyomma triste*). Esses ajustes foram feitos nos programas Sequencher ou MEGA X (KUMAR et al., 2018), disponível em <https://www.megasoftware.net/>.

O Sequencher foi usado da seguinte forma: quando disponível um mínimo de duas sequências de 658 pb foram alinhadas para produzir uma sequência de consenso. Em seguida, os nucleotídeos correspondentes aos “primers” foram adicionados à sequência de consenso para produzir um “amplicon” virtual de 709 pb. As sequências menores que 658 pb foram subsequentemente alinhadas individualmente com o “amplicon” virtual e os nucleotídeos ausentes foram adicionados para produzir “amplicons” virtuais completos.

Após união das sequências de COI da mesma espécie em um único arquivo no formato FASTA esse foi aberto no programa MEGA X, logo após as sequências foram alinhadas usando a opção “Align DNA” no botão “Align selected by codons using the ClustalW algorithm”, sem alterar os parâmetros oferecidos. Depois do alinhamento foi feita uma busca pelo sítio de restrição das enzimas através do botão “Find motif sequence” do programa, buscando-se um sítio por vez. Após comparação da posição dos sítios nas sequências da espécie, foram separadas amostras da mesma espécie com sítios na mesma posição, resultando em um grupo de digestão. Os grupos foram nomeados com as três, em alguns casos quatro, primeiras letras do epíteto específico da espécie seguido de uma letra maiúscula para *AluI* e número para *MboI*, sendo essas duas as enzimas escolhidas anteriormente.

Os grupos de digestão formados para *AluI* foram então unidos com os grupos de digestão para *MboI* da mesma sequência, formando o grupo final de digestão nomeado pela parte do epíteto específico seguido de número e depois letra. Desse modo, uma sequência de *A. longirostre* do grupo Lon1 e do grupo LonA pertence ao grupo final Lon1A. Foram então escolhidas sequências representantes para cada grupo de digestão final.

Após essa etapa cada um dos representantes foi digerido *in silico* com as enzimas escolhidas através de NEBcutter e o tamanho dos fragmentos gerados foram salvos para posterior análise.

Algumas sequências de diversas espécies originadas da Guiana Francesa possuem 658 pb, entretanto possuem 5 nucleotídeos do “primer forward” no início das sequências. Ao alinhar essas sequências no MEGA X com outras é possível ver o trecho do “primer” que não alinha com as outras sequências e esse trecho de 5 pb é idêntico aos últimos 5 pb do “primer forward” de Hajibabaei et al. (2006). Em casos que houve outras sequências de 658 pb da mesma espécie as sequências representantes de grupos finais que contém trecho do “primer” receberam 5 pb de outra sequência e receberam o “primer forward” sem 5 pb finais. Quando não havia outras sequências esses representantes receberam o “primer forward” completo sem nenhuma adição de outra sequência.

### 3.3 Inserção de “COIsearcher” no “website” “TickCutter”

O “website” “TickCutter”, foi criado pela equipe do laboratório (LBioMol) entre 2018

a 2019 e pode ser acessado em <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter>. Este “site” foi projetado para oferecer uma série de recursos, incluindo: um repositório de espécies brasileiras de ixodídeos; um fórum; a ferramenta “TickCutter 16S” para fornecer identificação em nível de espécie de carrapatos da família Ixodidae com base no uso de perfis de digestão de restrição de “amplicons” do 16S rDNA; tutoriais para facilitar o uso da ferramenta (DE ABREU, 2019).

A ferramenta para COI, nomeada “COIsearcher”, é baseada em “TickCutter 16S”, usando seu código fonte e o modo de organização de seu banco de dados como inspiração. Ambas as ferramentas funcionam ao filtrar um banco de dados usando critérios inseridos pelo usuário, exibindo o resultado em uma tabela.

Durante a criação do banco de dados de “COIsearcher” as bandas formadas pela digestão de cada grupo com *AluI* e *MboI* foram divididas em faixas de detecção de acordo com as usadas em “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019). Essas faixas possuem a casa das unidades ocultadas por um “X” e englobam uma dezena, com cada banda recebendo duas faixas, uma de tamanho aproximado e outra de tamanho abaixo (DE ABREU, 2019). Desse modo, uma banda de 243 pb possui as faixas de detecção 25X-24X e 24X-23X. Entretanto, bandas terminadas em 7, 8 ou 9 são consideradas como tendo uma casa decimal maior que a realidade (DE ABREU, 2019), assim uma banda de 247 pb possui as faixas 26X-25X e 25X-24X. Devido ao alvo molecular ser diferente entre “COIsearcher” e “TickCutter 16S”, duas mudanças foram feitas nas faixas de detecção. Bandas de 500 pb ou maiores foram agrupadas na faixa “>=50X” e bandas menores que 50 pb ou inexistentes foram agrupadas na faixa “<05X ou Não possui”. O agrupamento de bandas inexistentes junto com bandas pequenas foi criado pelo Doutor Daniel Paiva Barros de Abreu para “TickCutter 16S”, apesar do agrupamento ser diferente entre as ferramentas (dado não publicado) e possui o propósito de prevenir possíveis casos de identificação errônea causada por bandas muito apagadas ou que saíram do gel devido a um tempo de corrida ou voltagem excessivos.

Cada grupo final de digestão foi adicionado ao banco de dados de “COIsearcher”, nomeado “COI”, que contém colunas com o nome do grupo, nome da espécie, nome do gênero, lista de bandas da digestão com *AluI*, lista de bandas com *MboI*, faixas de detecção das três primeiras bandas de *AluI* e faixa das três primeiras bandas de *MboI*. As três primeiras bandas de cada enzima são as três primeiras bandas a aparecer no gel de agarose de cima para baixo, ou seja, as três maiores bandas. A decisão de utilizar três bandas por enzima ocorreu em primeiro momento para padronizar “COIsearcher” com a ferramenta “TickCutter 16S”, que utiliza três bandas por enzima (DE ABREU, 2019).

Entretanto, bandas sobrepostas foram consideradas uma única banda, para isso, quando bandas *in silico* possuíam uma diferença de 9 pb ou menos apenas a maior banda foi considerada, do mesmo modo que na ferramenta “TickCutter 16S”. Essa ideia foi criada pelo Doutor Daniel Paiva Barros de Abreu (dado não publicado) e adotada para o novo módulo por facilitar o uso da ferramenta por pessoas com pouca experiência com interpretação de géis, pois estas podem não perceber a presença de bandas duplas durante a análise.

Para reduzir a falha de identificação devido a formação de bandas duplas, as bandas de COI com diferença entre 10 e 19 pb foram consideradas tanto como a mesma banda como bandas diferentes, assim como na ferramenta “TickCutter 16S”. Essa ideia também é de autoria do Doutor Daniel Paiva Barros de Abreu (dado não publicado). Desse modo a segunda banda visualizada no gel que possui uma diferença entre esses valores com a primeira banda é inserida tanto na coluna de primeira banda quanto na coluna de segunda banda. Por consequência a terceira banda passa a ocupar a segunda coluna e também a terceira coluna. Essa medida deixa a ferramenta menos precisa, mas permite maior margem de erro devido a pouca separação de bandas que possa ocorrer.

Após criação do banco de dados a página hospedando “COIsearcher” foi criada. Nessa página foi adicionado o tutorial para uso da ferramenta, semelhante ao presente na página de

“TickCutter 16S”, apesar dessa versão ser modificada para se adequar às diferenças entre as ferramentas. Foi adicionado também uma tabela, dois botões e seis menus do tipo “dropdown”, o mesmo tipo de menu visível no topo do “site” oficial da UFRRJ. Três dos menus permitem a escolha dos tamanhos das três primeiras bandas de AluI, sendo um menu para cada banda. Outros três permitem o mesmo, mas para MboI. Esses tamanhos são escritos do mesmo modo que nas faixas de detecção, tendo a casa das unidades ocultada por um “X”. Um dos botões foi nomeado “Identificar” e o outro “Limpar”. O primeiro inicia a busca na ferramenta e o segundo apaga o resultado e limpa os campos de busca. Por último também foi adicionado instruções do que fazer caso não seja possível identificar um exemplar com a ferramenta.

A possibilidade de escolher os tamanhos através de opções pré-definidas nos menus “dropdown” em oposição à digitação se deve à melhor padronização associada com esse tipo de entrada, que serviu para evitar variações pela introdução manual dos dados pelos usuários. Assim, não seria necessário cogitar as diferentes formas (ex. “9X” ou “09X” para “09X”), que os usuários podem utilizar na hora de adicionar dados. Outras vantagens associadas com esta mudança no formato incluíram uma redução no tempo necessário para atualização do banco de dados e a redução na quantidade de informação depositada no banco de dados, o que serviu para deixar o mesmo mais leve. A tabela é conectada ao banco de dados, permitindo que ela exiba parte ou todo o conteúdo deste, enquanto cada “dropdown” é conectado a apenas uma coluna do banco de dados.

Para criação do código, escrito em JavaScript, que permite o funcionamento de “COIsearcher” foi necessário inserir no topo do código a função “import wixData from “wix-data””, necessária para trabalhar com bancos de dados no código. Em seguida foram adicionados dois eventos, um para cada botão. Esses eventos são “export function button#\_click(event) {}”, em que “#” se refere ao número do botão, algo que todo botão no Wix possui e o código referente ao evento é escrito dentro das chaves.

O evento do botão de identificação foi feito com “wixData.query” do banco de dados COI, esse recurso permite definir o termo de um “dropdown” a ser pesquisado na respectiva coluna através de “.contains(“Coluna”, \$w(“Dropdown”).value)” para cada “dropdown”, logo após é inserido “.find()” para correr o filtro usando os termos definidos previamente e finalmente “.then(res = \$w(“Tabela”).rows = res.items;);” para atualizar a tabela e mostrar apenas os itens encontrados que possuem os termos desejados.

O evento do botão de limpar foi feito com uma cópia do evento anterior, com o adicional de termos genéricos, como “primeira banda”, definidos antes de “wixData.query” através de “\$w(“#Dropdown”).value = “Termo””. Desse modo, ao clicar no botão é feita uma busca usando esses termos, que mostram todos os itens presentes no banco de dados.

Durante as análises das digestões *in vitro*, uma dificuldade foi identificada para efetivamente visualizar bandas menores que 100 pb nos géis de agarose. Com o intuito de reduzir o impacto deste fenômeno foi adicionado posteriormente um agrupamento de tamanhos de bandas menores que 100 pb e bandas inexistentes nos menus “dropdown”. Como resultado, o banco de dados e os menus estabelecidos previamente tiveram que ser atualizados. Portanto, nas colunas com bandas menores que 100 pb, incluindo bandas inexistentes, o valor “<10X” foi incluído e os menus foram modificados com a inserção da opção “<10X ou Não possui”. Deve se notar que essa nova opção não substitui o agrupamento anterior menor que 50 pb, uma vez que as duas opções existem simultaneamente. No entanto, foi considerado que esta modificação irá aumentar a probabilidade que um usuário obterá um resultado correto, apesar de menor precisão, caso o gel possua bandas apagadas ou de difícil interpretação.

Para solucionar um problema presente em “TickCutter 16S” e “COIsearcher” de mostrar os resultados fora de ordem alfabética foi adicionado “.ascending()” antes de “.contains(“Coluna”, \$w(“Dropdown”).value)” no código das duas ferramentas, pois esse comando serve para ordenar os dados de uma coluna específica determinada entre os parênteses.

Com o intuito de avaliar a funcionalidade e acessibilidade do tutorial de “COIsearcher” um teste foi executado usando um voluntário leigo, especificamente um aluno com graduação em andamento, mas sem graduação e/ou pós-graduação nas áreas de ciências biológicas e/ou agrárias. O voluntário foi fornecido com uma descrição dos elementos que se encontram dentro da plataforma junto com acesso da penúltima versão do tutorial. Subsequentemente o voluntário foi entrevistado para avaliar a sua capacidade de explicar o funcionamento da ferramenta e para fornecer uma explicação do uso do sistema que seria compreensível para possíveis usuários com pouco ou nada de experiência na área de biologia molecular. As informações obtidas através deste processo foram utilizadas para corrigir aspectos do tutorial que foram considerados ambíguos. Desse modo, espera-se que um tutorial compreensível por um leigo seja facilmente compreendido pelo público alvo de “COIsearcher”.

Buscando confirmar a correta inserção dos dados das sequências em “COIsearcher” os grupos de digestão inseridos nas primeiras versões do banco de dados passaram por verificação. A verificação ocorreu a partir de inserção de bandas geradas *in silico* por NEBcutter na ferramenta. Foram feitas três simulações, uma apenas com a digestão por *AluI*, outra apenas com a digestão por *MboI* e a terceira com a digestão de ambas as enzimas. Foram considerados acertos quando o resultado mostrado na tabela de “COIsearcher” possuía apenas a espécie da amostra. Por outro lado, foram considerados erros quando o resultado não possuía a espécie da amostra ou a possuía, mas mostrava também outras espécies.

### 3.4 Avaliações executadas com dados geradas por digestão *in vitro*

As duas ferramentas foram projetadas para serem usadas por pesquisadores que buscam identificar seus espécimes por meio da análise de padrões de bandas gerados a partir da digestão de “amplicons” *in vitro*. No caso da ferramenta “TickCutter 16S”, a validação do processo de identificação foi realizada sistematicamente em duas etapas (DE ABREU, 2019). No momento de iniciar o presente estudo, a mesma estratégia de duas etapas foi planejada para a validação da ferramenta baseada no marcador COI. Infelizmente, em decorrência das limitações impostas ao acesso à infraestrutura do LBioMol, em resposta ao COVID-19, não foi possível realizar a extensa análise *in vitro* necessária para validar o sistema.

Sendo assim, a análise *in vitro* limitou-se ao exame de um relativamente pequeno número de “amplicons” digeridos com as duas enzimas (*AluI* e *MboI*), que haviam sido identificadas por análise de digestão *in silico*. No entanto, uma série de deficiências, tanto quantitativas quanto qualitativas, no conjunto de dados *in silico*, juntamente com a incapacidade de realizar análises adicionais, significaram que a avaliação realizada dos dados *in vitro* foi essencialmente preliminar. Na tentativa de contornar essas limitações e transformá-las em uma oportunidade de pesquisa, focou-se na execução de uma análise comparativa detalhada dos métodos utilizados para avaliar e determinar os dados do padrão de bandas.

Primeiro foi necessário preparar o material de teste, para isso, amostras de DNA mantidas na Coleção de Ácidos Nucléicos de Artrópodes do LBioMol/DPA/UFRRJ, foram empregadas como molde no PCR para ampliação do marcador COI. A identificação de cada DNA foi registrada no momento de sua inclusão na coleta, por meio do sequenciamento de “amplicons” de 16S rDNA e em alguns casos COI. Representantes, das seguintes espécies de carrapatos foram incluídos na presente validação; *A. aureolatum*, *A. auricularium*, *A. brasiliense*, *A. cajennense sensu stricto*, *A. calcaratum*, *A. coelebs*, *A. dubitatum*, *A. geayi*, *A. humerale*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. parvum*, *A. romarioi*, *A. romitii*, *A. sculptum*, *A. triste*, *A. tigrinum*, *A. varium*, *D. nitens*, *H. leporispalustris*, *Ixodes* spp. oriundo de ave, *R. microplus* e *R. sanguineus*.

A produção de “amplicons” para posterior digestão foi realizada empregando os “primers” LepF/LepR desenvolvido originalmente para “barcoding” de lepidópteros, com a

geração de produto esperado de 709 pb (HAJIBABAEI et al., 2006). As reações de PCR (25 µl), contiveram 2,5 µl de Tampão (10X) Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Brasil), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 10 picomoles de cada “primer”, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase e 2 µl de DNA molde, como relatado por Varela (2016). O protocolo usado para amplificação foi o mesmo relatado por Varela (2016); Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos constituídos por: Desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundo. O processo terminou depois de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações, diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) de controle positivo quantificados de *Amblyomma longirostre* foram utilizadas para garantir o limite de detecção de cada PCR, fornecendo um meio para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Adicionalmente, incorporou-se ainda dois controles negativos, onde o DNA molde foi substituído pela mesma quantidade de H<sub>2</sub>O ultrapura. Uma das amostras negativas foi preparada em ambiente livre de DNA, onde os “Master-mixes” para cada reação de PCR foram confeccionadas e distribuídas. O segundo controle negativo foi finalizado juntamente com a adição de DNA molde em cada microtubo de reação, do lado externo da cabine de preparo. Desta forma, seria possível detectar casos de contaminação durante o processo de preparação da reação de PCR, desconsiderando os resultados então obtidos, e implementando medidas corretivas.

Para análise da amplificação resultante, um total de 5 µl do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5%), utilizando o tampão de corrida Tris- Acetato EDTA (TAE) (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 min. A determinação dos tamanhos do produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific). Os géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume sobressalente de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores.

As reações monoenzimáticas para clivagem de produtos de amplificação de COI previamente obtidos utilizando as enzimas escolhidas ocorreu em um volume final de 12 µl, contendo de 4 a 9 µl do produto de PCR a ser clivado, de acordo com a qualidade da amplificação e intensidade da banda resultante em análise prévia, 1,2 µl do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µl de soro albumina bovina (0,1 mg/ml), com posterior adição de H<sub>2</sub>O ultrapura para alcançar o volume final desejado. As reações foram incubadas a 37 °C durante 3 h. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em quatro géis de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (44,5 mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 120 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR. Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcadores de peso molecular (Synapse 50bp ladder M1041 e LGC biotec 100 bp ladder).

Esse conjunto de géis possui 51 amostras digeridas *in vitro* com *AluI* divididas em dois géis e as mesmas 51 amostras digeridas com *MboI* em mais dois géis. Cada gel também incorporou um “amplicon” de controle não digerido de 709 pb, gerado usando DNA de *A. longirostre* como molde. Os tamanhos dos fragmentos digeridos foram avaliados por comparação com bandas de mobilidade conhecida, usando uma variedade de abordagens em diferentes períodos e quantidade de padrões disponíveis no banco de dados de “COIsearcher”, conforme descrito abaixo.

A avaliação inicial foi feita por meio do programa GelAnalyzer 2010a disponível em <http://gelanalyzer.com/index.html>. (LAZAR JUNIOR, I. & LAZAR, I., 2010), empregando os

marcadores de peso molecular como parâmetro para a calibração do software e posterior predição dos tamanhos de fragmentos visualizados. Este é o método recomendado para uso com o módulo “TickCutter 16S” e as medições seguiram as instruções fornecidas no tutorial para uso de GelAnalyzer 2010a (DE ABREU, 2019) disponível, com imagens, em “TickCutter” na aba “Tutoriais” e opção “GelAnalyzer 2010a” ou também acessível diretamente em <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter/interpretacao-do-gel>. Entretanto, a etapa 6 do tutorial (comparação das amostras de teste com perfis de bandas gerados por espécies conhecidas de carrapatos) não foi seguida, por ser opcional. Devido ao número limitado de sequências de COI (e consequentemente o número de perfis de bandas previstos) disponíveis na versão do banco de dados do módulo “COIsearcher” testado nessa fase, apenas 37 das 51 amostras puderam ser avaliadas. Os tamanhos estimados pelo GelAnalyzer, em comparação com as bandas nos marcadores de peso molecular, foram inseridos na ferramenta “COIsearcher para identificação das espécies.

Com o intuito de aperfeiçoar os resultados do teste anterior uma segunda análise com GelAnalyzer foi executada com base no tutorial, entretanto, foi utilizado a etapa 6 do tutorial, para correção de possível distorção nos géis. As bandas usadas para a correção foram as três primeiras de *A. romarioi* e três primeiras de *A. nodosum*. Esse teste examinou as mesmas 37 amostras. Novamente os tamanhos apontados pelo programa foram inseridos na ferramenta “COIsearcher” para identificação.

Uma terceira avaliação dos géis foi efetuada manualmente com auxílio do programa PowerPoint. Essa estratégia foi incluída como alternativa ao programa GelAnalyzer no módulo “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019). Mais uma vez, a análise seguiu as instruções fornecidas no tutorial Powerpoint fornecido na ferramenta “TickCutter 16S”. Esse se encontra na aba “Tutoriais” e opção “Análise Manual”, acessível diretamente em <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter/analise-manual>.

Uma quarta avaliação dos padrões de bandas gerados *in vitro* novamente empregou o programa GelAnalyzer de acordo com o tutorial presente no “website”. Porém usando apenas o “ladder” de 50 pb em cada gel e sem utilizar o passo opcional. Além disso, esta avaliação utilizou apenas as duas bandas maiores geradas para cada enzima, marcando na ferramenta a opção “Todos os tamanhos” no “dropdown” na terceira banda.

Pensando na possibilidade de os marcadores moleculares migrarem mais rápido que as amostras testes e isso causar problemas na medição das bandas, decidiu-se realizar uma quinta avaliação, sem comparação com as bandas dos marcadores. Assim, no lugar dos marcadores foram empregadas amostras com os tamanhos das bandas conhecido (uma vez que essas têm sido sequenciados no LBioMol). Especificamente foram escolhidas as maiores e menores bandas das amostras 24 e 28 (de *A. romarioi* e *A. oblongoguttatum*, respectivamente). Nessa análise 43 das 51 amostras foram incluídas na análise devido à adição de novas sequências e perfis de bandas no conjunto de dados “COIsearcher”. Após o programa calcular os tamanhos esses foram inseridos em “COIsearcher” como anteriormente.

### **3.5 Escolha de Terceira Enzima de Restrição**

Com base nos resultados da análise de gel *in vitro*, observou-se que algumas amostras não puderam ser identificadas com segurança no nível de espécie usando o sistema enzimático duplo devido à geração de perfis de bandas altamente semelhantes entre duas ou, em algumas ocasiões, três espécies distintas. O uso de uma terceira enzima de restrição como solução para esse tipo de conflito, já havia sido empregado em um número limitado de casos no módulo “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019).

Para definir quais grupos finais de digestão e suas espécies formam conjuntos todos os grupos foram organizados em duas planilhas, uma para *AluI* e outra para *MboI*, em ordem

decrecente de tamanho das bandas de *AluI*. A organização utilizou essa enzima pois é a que possui maior variação de tamanho de bandas, o que permite achar mais rapidamente semelhanças entre os grupos. A procura por padrões semelhantes envolveu separar uma coluna da planilha para cada tamanho oferecido para o usuário escolher em “COIsearcher” e marcar para cada grupo todas as colunas com tamanhos iguais ou acima da opção “10X” que o grupo possui no banco de dados. Com as planilhas prontas foi comparado manualmente a planilha de *AluI* e os grupos finais das diferentes espécies que foram considerados muito semelhantes foram anotados para serem comparados posteriormente na planilha de *MboI*. Após comparação na segunda planilha os grupos gerando perfis conflitantes foram anotados para identificar uma possível terceira enzima capaz de resolver os conflitos.

Por questões de praticidade e limitações de recursos, as enzimas de restrição examinadas já se encontram disponíveis nos estoques do LBioMol. Essas enzimas se encontram no Quadro 2. Os conjuntos formados por grupos finais de espécies diferentes que precisam de terceira enzima para serem separados entre si foram abertos no programa MEGA X e após alinhamento pelo modo descrito anteriormente os sítios de restrição foram procurados através da busca do programa. As enzimas que geram padrões distintos para as amostras conflitantes foram anotadas para prosseguir com a seleção. Um representante de cada um dos grupos foi digerido *in silico* com as enzimas candidatas através do programa NEBcutter.

**Quadro 1.** Enzimas de restrição utilizadas na seleção de terceira enzima da ferramenta.

<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	<i>SphI</i>
<i>BccI</i>	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>
<i>DdeI</i>	<i>KpnI</i>	<i>TaqI</i>
<i>DraI</i>	<i>MspI</i>	<i>VspI</i>
<i>EcoRI</i>	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>
<i>EcoRV</i>	<i>PstI</i>	<i>XhoI</i>
<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>	
<i>HhaI</i>	<i>SacI</i>	

A partir disso todas as sequências que pertencem ao conjunto foram alinhadas no MEGA X e a localização dos sítios das enzimas selecionadas para aquele conjunto foi buscado usando busca do programa. Isso foi feito para todos os conjuntos formados. Desse modo foi observado um ou mais padrões de digestão com aquela enzima para cada grupo e um representante de cada padrão do grupo foi selecionado para digestão com a enzima. Isso foi feito para todas as enzimas selecionadas para o conjunto. Após as digestões foram escolhidas enzimas de digestão oficiais em “COIsearcher” para cada conjunto. Essa escolha novamente teve como critério bandas de fácil diferenciação entre espécies, priorizando uma diferenciação ainda maior que na etapa anterior, e, se possível, que não formem o padrão da outra espécie ao perder sítio.

Havia indícios que o método usado para formar conjuntos que precisam de terceira enzima de restrição não foi o método mais adequado. Por isso, uma nova busca por grupos finais que precisam de terceira enzima foi realizada. Nesse novo método foi usado o agrupamento “<10X ou Não possui”.

Todos os grupos finais foram organizados em uma planilha com cada coluna representando uma opção de tamanho de “COIsearcher”. Porém, apenas os tamanhos reconhecidos para a primeira banda de *AluI* foram inseridos na planilha. Os grupos foram organizados então em ordem decrescente de tamanho. Grupos que tiveram sobreposição de ao menos um tamanho com outro grupo de uma espécie diferente foram separados em blocos para facilitar as próximas etapas, enquanto os grupos que não tiveram nenhum tipo de sobreposição com grupos de outras espécies foram descartados. Os blocos foram então inseridos em outra

planilha e os grupos dentro de cada bloco foram organizados em ordem decrescente da segunda banda de *AluI* e divididos em blocos ainda menores a partir da sobreposição, sempre descartando os grupos que não sobrepõem. Esse passo-a-passo foi repetido para a terceira banda de *AluI* e depois para as três bandas de *MboI*. Após passar pela terceira banda de *MboI* os blocos foram colocados em nova planilha com os tamanhos de todas as bandas de *AluI* daqueles grupos, o que permitiu remover grupos que não realmente precisam de terceira enzima, mas deram a impressão de precisar ao serem analisados banda por banda. Os restantes foram para nova planilha semelhante à anterior, mas com *MboI* e novamente mais grupos foram removidos. Deixando apenas os que de fato precisam de terceira enzima e já separados por conjuntos.

### 3.6 Atualização de “COIsearcher” com Terceira Enzima

Após ser estabelecida a necessidade de utilizar terceira enzima de restrição para identificação em alguns casos, foi necessário inserir em “COIsearcher” a capacidade de reconhecer e identificar espécies a partir de terceira enzima em uma ferramenta complementar. Para isso foi primeiro criada uma planilha contendo a espécie, enzima usada, tamanhos das bandas geradas, e faixa de detecção na ferramenta e conjunto a que pertence. As faixas de detecção foram criadas como descrito anteriormente para o banco de dados principal, incluindo o agrupamento para bandas menores que 100 pb e outro para as menores que 50 pb.

O conteúdo da planilha foi então inserido em um novo banco de dados, intitulado “COI3enzima”. Logo após foi adicionado na mesma página de “COIsearcher” um tutorial separado para a ferramenta, denominada complementar, com explicação de qual enzima usar para qual conjunto, cinco menus “dropdown” sendo um para escolha da enzima, outro para escolha do conjunto e os três restantes para escolha das três primeiras bandas vistas de cima para baixo no gel de agarose. Os “dropdown” de bandas possuem as mesmas opções que os presentes na ferramenta principal. Também foi adicionado à página botão para apagar os dados inseridos nos menus e botão para iniciar a busca, além da tabela, conectada ao banco de dados “COI3enzima”, necessária para o usuário visualizar o resultado.

Foi preciso adicionar código para a nova ferramenta, esse foi inserido embaixo do código já presente na página e consiste de uma cópia das duas funções “export function button#\_click(event) {}”, porém com os campos referentes a colunas e “dropdown” modificados com os nomes da nova ferramenta. Além de um comando “.contains(“Coluna”, \$w(“Dropdown”).value)” a menos, já que a ferramenta complementar possui cinco dropdown enquanto a principal possui seis.

Após a segunda formação de conjuntos de espécies que precisam de terceira enzima, o banco de dados “COI3enzima”, o “dropdown” de enzimas e o “dropdown” de conjuntos foram atualizados a partir de adição de novos dados e remoção dos dados obsoletos, entretanto o banco de dados permaneceu com as mesmas colunas e mesma organização de faixa de detecção de quando foi criado. O tutorial da ferramenta complementar também recebeu alterações para mostrar todos os conjuntos e quais enzimas usar em cada um deles.

### 3.7 Atualização da Ferramenta “TickCutter 16S”

Buscando atualizar o banco de dados da ferramenta “TickCutter 16S”, foi feito levantamento de sequências de “amplicons” de 16S e genomas mitocondriais de Ixodídeos brasileiros (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019, LABRUNA et al., 2020; ONOFRIO et al., 2020) depositadas no GenBank entre 06/09/2019 até 08/03/2021.

No caso das sequências de 16S de espécies já incorporados no banco de dados, as novas sequências foram comparadas com amostras correspondente aos grupos de digestão identificados anteriormente (DE ABREU, 2019) através do MEGA X conforme descrito

anteriormente, com o objetivo de identificar novos perfis de bandas para inclusão no banco de dados da ferramenta. Enquanto sequências de espécies ainda não presentes tiveram representantes de grupos escolhidos através do MEGA X sem comparação com sequências antigas. Em ambos os casos MEGA X foi utilizado do mesmo modo que descrito anteriormente para as sequências de COI.

Após padronização dos tamanhos dos “amplicons” virtuais (404 a 410 pb) por adição de trechos de sequências semelhantes da mesma espécie e adição do par de “primers” usado por de Abreu (2019), as sequências foram digeridas *in silico* com *DraI* e *VspI* através de NEBcutter. Os tamanhos das bandas geradas pelas digestões foram usados para formar as faixas de detecção e estas foram inseridas no banco de dados do módulo “TickCutter 16S”.

Após a atualização do banco de dados para carrapatos Ixodidae, decidiu-se avaliar o risco de identificação incorreta pela ferramenta “TickCutter 16S” caso um usuário analise sequências oriundas de membros da família Argasidae, uma vez que o banco de dados original (De ABREU, 2019), não possui perfis de bandas para carrapatos dessa família. Para isso, 75 sequências de 16S pertencentes a 22 das 25 espécies de carrapatos Argasídeos registrados no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019), foram baixadas do GenBank no formato FASTA e usadas para gerar “amplicons” virtuais usando os mesmos “primers” citados anteriormente. Em seguida os “amplicons” foram digeridos *in silico* com as enzimas *DraI* e *VspI*, e os dados referente aos perfis de bandas foram então inseridos no banco de dados do módulo “TickCutter 16S”.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Levantamento de Sequências

#### 4.1.1 Aquisição e caracterização de sequências COI e de genomas mitocondriais de membros do gênero *Amblyomma*

As espécies de carrapato procuradas no levantamento dos bancos de dados públicos e do LBioMol, além da quantidade de sequências levantadas por espécie estão disponíveis na Tabela 1.

**Tabela 1.** Todas as 51 espécies de ixodídeos procuradas no levantamento e total de sequências COI usadas nesse estudo, incluindo aquelas não depositadas em bancos de dados públicos.

Espécies procuradas	Sequências encontradas	
	Quantidade	Porcentagem
<i>Amblyomma aureolatum</i>	4	0,47%
<i>Amblyomma auricularium</i>	6	0,71%
<i>Amblyomma brasiliense</i>	5	0,59%
<i>Amblyomma cajennense s.s.</i>	13	1,53%
<i>Amblyomma calcaratum</i>	8	0,94%
<i>Amblyomma coelebs</i>	3	0,35%
<i>Amblyomma dissimile</i>	21	2,47%
<i>Amblyomma dubitatum</i>	0	0%
<i>Amblyomma fuscum</i>	0	0%
<i>Amblyomma geayi</i>	7	0,82%
<i>Amblyomma goeldii</i>	1	0,12%
<i>Amblyomma humerale</i>	3	0,35%
<i>Amblyomma incisum</i>	0	0%
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	2	0,24%
<i>Amblyomma longirostre</i>	16	1,88%
<i>Amblyomma naponense</i>	7	0,82%
<i>Amblyomma nodosum</i>	7	0,82%
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	13	1,53%
<i>Amblyomma ovale</i>	23	2,70%
<i>Amblyomma pacaе</i>	1	0,12%
<i>Amblyomma parkeri</i>	2	0,24%
<i>Amblyomma parvum</i>	49	5,76%
<i>Amblyomma pictum</i>	0	0%
<i>Amblyomma pseudoconcolor</i>	0	0%
<i>Amblyomma romarioi</i>	2	0,24%
<i>Amblyomma romitii</i>	2	0,24%
<i>Amblyomma rotundatum</i>	8	0,94%
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	2	0,24%
<i>Amblyomma sculptum</i>	4	0,47%
<i>Amblyomma tigrinum</i>	9	1,06%
<i>Amblyomma triste</i>	51	5,99%
<i>Amblyomma varium</i>	12	1,41%

<i>Amblyomma yucumense</i>	0	0%
<i>Dermacentor nitens</i>	35	4,11%
<i>Haemaphysalis cinnabarina</i>	0	0%
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	5	0,59%
<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	15	1,76%
<i>Ixodes amarali</i>	0	0%
<i>Ixodes auritulus</i>	1	0,12%
<i>Ixodes bocatorensis</i>	0	0%
<i>Ixodes catarinensis</i>	0	0%
<i>Ixodes fuscipes</i>	0	0%
<i>Ixodes lasallei</i>	0	0%
<i>Ixodes longiscutatus</i>	0	0%
<i>Ixodes loricatus</i>	0	0%
<i>Ixodes luciae</i>	0	0%
<i>Ixodes paranaensis</i>	0	0%
<i>Ixodes schulzei</i>	0	0%
<i>Ixodes spinosus</i>	0	0%
<i>Rhipicephalus microplus</i>	302	35,49%
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	212	24,91%
<b>Total</b>	<b>851</b>	<b>100%</b>

O levantamento inicial dos bancos de dados GenBank e BOLD recuperou um total de 227 sequências, identificadas como derivadas de 24 das 33 espécies do gênero *Amblyomma* reconhecidas no Brasil. Uma parte das sequências (71/226) tinha 658 pb de tamanho e correspondia a amplicons sem a inclusão das sequências de “primers” LepF/LepR. A minoria das sequências (5/226) era maior que 658 pb e continha números variáveis de nucleotídeos derivados dos “primers”. Em contraste, a maioria das sequências (151/226) eram menores que 658 bp. As sequências foram baixadas e salvas no formato FASTA para posterior análise molecular (geração de “amplicons” virtuais e digestão *in silico*). Informações adicionais em relação às sequências (espécie, número de acesso, banco de dados hospedeiro, tamanho em pb e país de origem) foram obtidas e anotadas. Os dados foram inicialmente organizados em um arquivo Excel, em preparação para sua inclusão na plataforma “TickCutter”. O exame das 227 sequências por alinhamento (baseado nos nomes das espécies fornecidos), indicou que a sequência TJS001-14 de BOLD, depositada como originária de *A. longirostre*, não se alinhava com nenhuma outra sequência. Os resultados de uma pesquisa BLAST demonstraram que esta sequência era na verdade o resultado da amplificação não específica de um fungo da espécie *Calonectria colhounii*. Essa sequência foi removida do conjunto de dados reduzindo o número de sequências para 226.

O levantamento inicial de sequências não incluiu 5 sequências de *A. cajennense sensu stricto* (KF200160.1; KF200130.1; KF200124.1; KF200098.1; KF200097.1) depositadas por pesquisadores do Panamá. As razões para esta exclusão serão apresentadas na seção de discussão. No entanto, apesar de algumas ressalvas, essas sequências foram posteriormente adicionadas ao conjunto de dados. Como resultado, o número de sequências derivadas de bancos de dados públicos aumentou para 231. A minoria (60/231) das sequências era de carrapatos brasileiros, com os demais espécimes depositados por pesquisadores de países da América do Sul e Central (Argentina, Panamá, Colômbia, Bolívia, Guiana Francesa, Peru, Costa Rica, Uruguai) e do Canadá e Israel, não foram fornecidos detalhes da origem geográfica para 4 amostras.

Além das sequências publicamente disponíveis, um total de 50 sequências (todas com 658 pb de tamanho) foram obtidas do banco de dados de sequências do LBioMol. A identidade das espécies dos carrapatos utilizados para gerar as sequências COI foi previamente estabelecida através do sequenciamento do marcador 16S rDNA. Representantes das seguintes espécies foram incluídos nesta análise: *A. aureolatum*, *A. auricularium*, *A. brasiliense*, *A. calcaratum*, *A. dissimile*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. parvum*, *A. romarioi*, *A. romitii*, *A. rotundatum*, *A. sculptum*, *A. triste* e *A. varium*. A inclusão dessas sequências aumentou o número de espécies para 27 e aumentou o tamanho do conjunto de dados de sequência para 281. A maioria (38/50) das amostras de LBioMol foi coletada no Brasil. A exceção foi *A. parvum*, onde a maioria das amostras (12/14) teve origem na Argentina. A quantidade de sequências para cada espécie e banco de dados se encontra na Tabela 2.

**Tabela 2.** Quantidade de sequências de COI e mitocondrial de *Amblyomma* utilizadas nesse estudo por banco de dados de onde foram coletadas.

Espécies	Quantidade de sequências			
	GenBank	BOLD	LBioMol	Total
<i>Amblyomma aureolatum</i>	0	0	4	4
<i>Amblyomma auricularium</i>	2	0	4	6
<i>Amblyomma brasiliense</i>	4	0	1	5
<i>Amblyomma cajennense s.s.</i>	13	0	0	13
<i>Amblyomma calcaratum</i>	5	0	3	8
<i>Amblyomma coelebs</i>	3	0	0	3
<i>Amblyomma dissimile</i>	19	1	1	21
<i>Amblyomma geayi</i>	7	0	0	7
<i>Amblyomma goeldii</i>	1	0	0	1
<i>Amblyomma humerale</i>	3	0	0	3
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	2	0	0	2
<i>Amblyomma longirostre</i>	13	0	3	16
<i>Amblyomma naponense</i>	7	0	0	7
<i>Amblyomma nodosum</i>	6	0	1	7
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	11	1	1	13
<i>Amblyomma ovale</i>	16	0	7	23
<i>Amblyomma pacae</i>	1	0	0	1
<i>Amblyomma parkeri</i>	0	0	2	2
<i>Amblyomma parvum</i>	35	0	14	49
<i>Amblyomma romarioi</i>	0	0	2	2
<i>Amblyomma romitii</i>	1	0	1	2
<i>Amblyomma rotundatum</i>	7	0	1	8
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	2	0	0	2
<i>Amblyomma sculptum</i>	3	0	1	4
<i>Amblyomma tigrinum</i>	8	1	0	9
<i>Amblyomma triste</i>	50	0	1	51
<i>Amblyomma varium</i>	8	1	3	12
<b>Total</b>	<b>227</b>	<b>4</b>	<b>50</b>	<b>281</b>

#### 4.1.2 Aquisição e caracterização de sequências COI de membros dos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*

Um total de 570 sequências derivadas de outras espécies da família Ixodidae (*D. nitens* (35 sequências), *H. juxtakochi* (5), *H. leporispalustris* (15), *I. auritulus* (1), *R. microplus* (302) e *R. sanguineus* (212)), foram extraídos dos bancos de dados GenBank e BOLD. Dado o grande número de sequências coletadas, optou-se por subdividir cada espécie em haplótipos e incluir um representante de cada haplótipo no conjunto de dados de sequências. Os haplótipos foram identificados usando a função de alinhamento de sequências no programa Sequencher. Um total de 6 haplótipos (A até F) foram identificados para *D. nitens*, 3 haplótipos (A até C) foram identificados para *H. juxtakochi*, 2 haplótipos (A e B) foram identificados para *H. leporispalustris*, 7 haplótipos (A até G) foram registrados para *R. microplus* e 10 haplótipos (A até J) foram identificados para *R. sanguineus*.

#### 4.1.3 Aquisição e caracterização de sequências 16S rDNA de carrapatos das famílias e Argasidae e Ixodidae

Um total de 76 sequências foram obtidas para 22 das 25 espécies de Argasidae pesquisadas. Não existiam sequências no banco de dados do GenBank para as espécies *Antricola inexpectata*, *Ornithodoros rudis* e *Ornithodoros stageri*. A separação em haplótipos para as 22 espécies foi realizada usando o programa Sequencher para selecionar sequências representativas para comparação no módulo “TickCutter 16S”. A maioria das espécies continha 1 ou 2 haplótipos. As exceções foram *Ornithodoros marinkellei* com 3 haplótipos (A até C) e *O. mimon* que apresentou 7 haplótipos (A até G).

Um total de 363 sequências produzidas a partir de carrapatos Ixodidae e depositadas no GenBank depois de 09/06/19 foram identificadas e caracterizadas incluindo sequências para espécies não incluídas anteriormente no conjunto de dados 16S. Especificamente, sequências das espécies: *Ixodes bocatorensis*, *Ixodes catarinensis*, *Ixodes paranaensis* e *Ixodes spinosus*. Novas sequências também foram depositadas para as seguintes espécies já incluídas no banco de dados; *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. coelebs*, *A. dissimile*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. parvum*, *A. romarioi*, *A. rotundatum*, *A. sculptum*, *A. tigrinum*, *A. varium*, *D. nitens*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes amarali*, *Ixodes auritulus*, *Ixodes loricatus*, *Ixodes luciae*, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

#### 4.2 Preparação de “amplicons” virtuais de COI e digestão *in silico*

A maioria das sequências recuperadas das bases de dados públicas carecia de um número variável de nucleotídeos em uma ou ambas as extremidades. No entanto, com a inclusão de sequências do banco de dados LBioMol, as sequências completas estavam disponíveis para pelo menos um representante da maioria das diferentes espécies de carrapatos (a única exceção sendo *A. tigrinum*). As sequências incompletas KF200126.1 (*A. auricularium*), MF363087.1 (*A. cajennense sensu stricto*), KF200130.1 (*A. cajennense sensu stricto*), MT180846.1 (*A. nodosum*), KF200129.1 (*A. ovale*), KT820398.1 (*A. parvum*), KT820386.1 (*A. parvum*), KT820382.1 (*A. parvum*), KY595140.1 (*A. sculptum*), KT820366.1 (*A. sculptum*) e KU306550.1 (*A. triste*) foram alinhados com os “amplicons” completos no programa MEGA X e as extremidades foram preenchidas. O número de nucleotídeos adicionados variou de 14 a 169. A sequência KX622791, representando o genoma mitocondrial (*A. sculptum*), por outro lado, foi reduzida em 14122 pb no Sequencher.

Uma complicação adicional para a preparação de amplicons virtuais foi o fato de que sequências da Guiana Francesa para as espécies *A. cajennense sensu stricto*, *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. goeldii*, *A. humerale*, *A. latepunctatum*, *A. oblongoguttatum*, *A. pacae*, *A. romitii* e *A. sculpturatum* possuem os dois primeiros nucleotídeos da região 5' da região alvo de 658 pb ausentes em relação aos amplicons gerados com os “primers” LepF/LepR e foram preenchidos com dois nucleotídeos do “primer” utilizado durante a amplificação destes sequências.

Um caso mais complicado foi a situação encontrada com as 9 sequências depositadas por vários pesquisadores para *A. tigrinum*. Oito destas sequências tinham um tamanho de 605 pb e uma tinha 527 pb. Como solução, a sequência completa de *A. triste* de LBioMol foi usada para preencher as sequências de *A. tigrinum* até atingirem o tamanho desejado. Os possíveis problemas com essa abordagem serão discutidos na discussão.

A digestão inicial *in silico* de “amplicons” virtuais de COI foi realizada utilizando o programa NEBcutter V2.0 com o objetivo de identificar duas enzimas com potencial para fornecer identificação em nível de espécie das 23 espécies de carrapatos *Amblyomma* identificadas no levantamento preliminar do GenBank e bancos de dados BOLD. Os resultados dessa análise indicaram que as enzimas *AluI* e *MboI* possuíam o maior potencial para a geração de perfis de bandas diferenciais e, como tal, foram selecionadas para produzir os dados do perfil de bandas para inserção no conjunto de dados “COIsearcher”. Todos os amplicons virtuais baseados em sequências COI que foram posteriormente incorporadas ao estudo (incluindo os híbridos *A. triste/A. tigrinum*) foram digeridos *in silico* com ambas as enzimas e seus perfis de bandas foram adicionados ao conjunto de dados “COIsearcher”.

No decorrer desta análise, foi encontrado um problema para duas sequências que tinham sido depositadas com bases degeneradas localizadas em potenciais locais de reconhecimento para *AluI* ou *MboI*. No primeiro caso, a sequência KF200130.1 de *A. cajennense sensu stricto* possui um N em um dos sítios de *AluI*, formando AGCN no lugar de AGCT. Em situação semelhante à sequência KF200107.1 de *A. naponense* possui um R em um dos sítios da enzima *MboI*, formando RATC no lugar de GATC. Para resolver este problema foram produzidos dois amplicons virtuais para cada uma das sequências, em que a primeira variante da sequência possuía o sítio de reconhecimento, enquanto o sítio estava ausente na segunda variante. Os perfis de bandas gerados para todas as quatro variantes foram incorporados ao conjunto de dados. Os perfis de bandas inseridos no banco de dados foram aqueles derivados dos “amplicons” virtuais preparados usando as 50 sequências obtidas do banco de dados LBioMol. Esses dados resultaram na identificação de 65 perfis de bandas, apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2.** Perfis de bandas produzidos de “amplicons” virtuais (709 pb) de COI usando as enzimas *AluI* e *MboI* para 27 espécies de *Amblyomma*.

<i>Amblyomma</i>	Perfil	Digestão com <i>AluI</i>	Digestão com <i>MboI</i>
<i>A. aureolatum</i>	Aur1A	274, 206, 180, 49	364, 128, 98, 77, 42
<i>A. aureolatum</i>	Aur1B	386, 274, 49	364, 128, 98, 77, 42
<i>A. auricularium</i>	Auri1A	342, 243, 124	406, 128, 77, 53, 45
<i>A. auricularium</i>	Auri2B	156, 144, 124, 99, 99, 87	328, 128, 122, 78, 53
<i>A. auricularium</i>	Auri2C	156, 144, 118, 99, 99, 87, 6	328, 128, 122, 78, 53
<i>A. brasiliense</i>	Bra1A	295, 258, 156	406, 128, 122, 53
<i>A. cajennense s.s.</i>	Caj1A	367, 107, 99, 87, 49	456, 78, 77, 53, 45
<i>A. cajennense s.s.</i>	Caj1B	367, 194, 99, 49	456, 78, 77, 53, 45
<i>A. cajennense s.s.</i>	Caj2C	414, 177, 118	328, 128, 122, 78, 53
<i>A. cajennense s.s.</i>	Caj2D	414, 295	328, 128, 122, 78, 53
<i>A. calcaratum</i>	Cal1A	295, 288, 72, 54	328, 128, 78, 77, 53, 45
<i>A. calcaratum</i>	Cal1C	360, 274, 54, 21	328, 128, 78, 77, 53, 45
<i>A. calcaratum</i>	Cal2B	288, 274, 72, 54, 21	328, 128, 98, 78, 77
<i>A. calcaratum</i>	Cal3C	360, 274, 54, 21	406, 128, 77, 53, 45
<i>A. coelebs</i>	Coe1A	269, 226, 134, 59, 21	461, 77, 48, 45, 42, 36
<i>A. dissimile</i>	Dis1A	274, 156, 99, 87, 72, 21	316, 98, 90, 77, 77, 51
<i>A. geayi</i>	Gea1A	258, 156, 150, 118, 21, 6	341, 193, 98, 77
<i>A. geayi</i>	Gea1C	258, 156, 156, 118, 21	341, 193, 98, 77
<i>A. geayi</i>	Gea2B	268, 186, 156, 72, 21, 6	406, 128, 77, 53, 27, 18
<i>A. goeldii</i>	Goe1A	446, 263	323, 138, 78, 77, 48, 45
<i>A. humerale</i>	Hum1A	290, 129, 99, 72, 60, 59	328, 155, 133, 93
<i>A. humerale</i>	Hum1B	290, 189, 99, 72, 59	328, 155, 133, 93
<i>A. latepunctatum</i>	Lat1A	163, 161, 144, 122, 113, 6	328, 155, 133, 93
<i>A. longirostre</i>	Lon1A	258, 171, 156, 118, 6	456, 78, 77, 53, 45
<i>A. naponense</i>	Nap1A	295, 156, 99, 87, 72	328, 128, 77, 53, 42, 36, 27, 18
<i>A. naponense</i>	Nap2A	295, 156, 99, 87, 72	328, 128, 78, 77, 53, 27, 18
<i>A. nodosum</i>	Nod1A	274, 192, 189, 54	328, 155, 128, 98
<i>A. nodosum</i>	Nod1B	381, 274, 54	328, 155, 128, 98
<i>A. nodosum</i>	Nod2A	274, 192, 189, 54	328, 128, 98, 78, 77
<i>A. oblongoguttatum</i>	Obl1A	414, 171, 118, 6	456, 155, 53, 27, 18
<i>A. oblongoguttatum</i>	Obl1B	414, 171, 124	456, 155, 53, 27, 18
<i>A. oblongoguttatum</i>	Obl2A	414, 171, 118, 6	456, 155, 71, 27
<i>A. oblongoguttatum</i>	Obl3B	414, 171, 124	483, 128, 98
<i>A. ovale</i>	Ova1A	466, 156, 87	318, 155, 138, 53, 45
<i>A. ovale</i>	Ova2A	466, 156, 87	318, 138, 78, 77, 53, 45
<i>A. ovale</i>	Ova3A	466, 156, 87	318, 155, 138, 98
<i>A. ovale</i>	Ova4A	466, 156, 87	318, 138, 98, 78, 77
<i>A. ovale</i>	Ova5A	466, 156, 87	318, 155, 138, 71, 27
<i>A. ovale</i>	Ova6B	258, 171, 156, 118, 6	456, 78, 77, 53, 45
<i>A. pacae</i>	Pac1A	263, 248, 192, 6	497, 77, 66, 42, 27
<i>A. parkeri</i>	Par1A	244, 171, 171, 123	497, 119, 66, 27
<i>A. parkeri</i>	Par2A	244, 171, 171, 123	364, 133, 119, 66, 27
<i>A. parvum</i>	Parv1A	295, 156, 99, 87, 72	328, 128, 98, 78, 77
<i>A. parvum</i>	Parv1C	342, 177, 118, 72	328, 128, 98, 78, 77

<i>A. parvum</i>	Parv2B	342, 243, 124	406, 128, 98, 77
<i>A. parvum</i>	Parv3A	295, 156, 99, 87, 72	456, 98, 78, 77
<i>A. parvum</i>	Parv4D	294, 157, 99, 87, 72	406, 133, 93, 77
<i>A. parvum</i>	Parv5D	294, 157, 99, 87, 72	328, 133, 93, 78, 77
<i>A. parvum</i>	Parv6C	342, 177, 118, 72	328, 128, 78, 77, 53, 45
<i>A. parvum</i>	Parv7E	343, 177, 117, 72	328, 133, 78, 77, 48, 45
<i>A. romarioi</i>	Roma1A	365, 171, 123, 50	412, 104, 85, 66, 42
<i>A. romitii</i>	Rom1A	268, 186, 102, 99, 54	406, 128, 77, 53, 45
<i>A. romitii</i>	Rom1B	268, 186, 156, 99	406, 128, 77, 53, 45
<i>A. rotundatum</i>	Rot1A	274, 186, 102, 93, 54	418, 193, 53, 45
<i>A. scalpturatum</i>	Sca1A	Não digere	405, 93, 78, 77, 56
<i>A. sculptum</i>	Scu1A	295, 243, 171	406, 128, 77, 53, 27, 18
<i>A. sculptum</i>	Scu2A	295, 243, 171	328, 128, 78, 77, 53, 27, 18
<i>A. tigrinum</i>	Tig1A	274, 156, 87, 78, 76, 21, 17	456, 78, 77, 53, 45
<i>A. tigrinum</i>	Tig2B	274, 243, 93, 78, 21	318, 138, 78, 77, 53, 45
<i>A. tigrinum</i>	Tig2C	274, 156, 93, 87, 78, 21	318, 138, 78, 77, 53, 45
<i>A. tigrinum</i>	Tig2D	274, 108, 93, 87, 78, 48, 21	318, 138, 78, 77, 53, 45
<i>A. tigrinum</i>	Tig3C	274, 156, 93, 87, 78, 21	318, 216, 77, 53, 45
<i>A. triste</i>	Tri1A	274, 243, 93, 78, 21	318, 138, 122, 78, 53
<i>A. triste</i>	Tri1B	336, 274, 78, 21	318, 138, 122, 78, 53
<i>A. varium</i>	Var1A	295, 243, 99, 72	483, 128, 53, 45

Todas as sequências, com exceção dos dois representantes de *A. scalpturatum* (MH513238.1 e MH513239.1), foram digeridas pelas duas enzimas. As sequências de *A. scalpturatum* não apresentaram sítio de reconhecimento para *AluI*, mas mostraram o mesmo perfil de bandas para *MboI*.

A maioria (16/27) das espécies de *Amblyomma* gerou mais de um perfil de bandas para pelo menos uma das enzimas. Para muitas espécies, a proporção de perfis de bandas por sequência foi de mais ou menos 1:2. Este foi o caso de *A. aureolatum* (2 perfis/4 sequências), *A. auricularium* (3 perfis/6 sequências), *A. calcaratum* (4 perfis/8 sequências), *A. geayi* (3 perfis/7 sequências), *A. nodosum* (3 perfis/7 sequências), *A. sculptum* (2 perfis/4 sequências) e *A. tigrinum* (5 perfis/9 sequências). Para outras espécies, incluindo *A. cajennense sensu stricto* (4 perfis/13 sequências), *A. naponense* (2 perfis/7 sequências) e *A. oblongoguttatum* (4 perfis/13 sequências) a proporção de perfis de bandas: número de espécies foi por volta de 1:3.

As espécies *A. parvum* (49 sequências) e *A. ovale* (23 sequências), produziram 8 e 6 perfis respectivamente. No entanto, as frequências (1:6 para *A. parvum* e 1:4 para *A. ovale*) em que os perfis foram registrados foram menores do que para as demais espécies. Porém, no caso destas duas espécies representadas por números elevados de sequências, a distribuição dos perfis não foi tão uniforme como observado nos exemplos anteriores. Especificamente notou-se que a maioria (9/23) dos *A. ovale* pertencia ao perfil Ova2A, com o perfil Ova4A observado para apenas 1 sequência. No caso de *A. parvum*, os perfis de bandas predominantes foram Parv1A e Parv1C, com 20/49 e 16/49 respectivamente, enquanto todos os outros perfis foram registrados para uma minoria das sequências.

Apesar de produzir uma gama bastante ampla de perfis de bandas, a maioria dos padrões de *Amblyomma* pode ser facilmente distinguido, com apenas uma minoria (19/65) exigindo o uso de uma terceira enzima, para fornecer uma identificação única em nível de espécie. Os resultados dessas análises serão relatados posteriormente.

Em contraste com a extensa variação nos padrões de bandas registrados para várias espécies, 6 espécies apresentaram pouca ou nenhuma diferença intraespecífica nos perfis de

digestão, apesar de demonstrarem graus variados de polimorfismo em suas sequências. A estabilidade completa nos padrões de digestão foi registrada para *A. brasiliense* (5 sequências), *A. dissimile* (21 sequências), *A. longirostre* (16 sequências), *A. rotundatum* (8 sequências) e *A. varium* (12 sequências). Além disso, um alto grau de estabilidade de perfil foi registrado para *A. triste* onde 2 perfis distintos foram registrados entre as 51 sequências incluídas na análise. O perfil dominante foi Tri1B que foi mostrado por 37/51 das sequências. Essa diferença foi associada à perda de um dos sítios para *AluI*. Observou-se que o perfil de Tri1A para *AluI* foi idêntico ao observado para um dos perfis (Tig2B), derivada da espécie aparentada *A. tigrinum*. No entanto, apesar de os padrões de bandas produzidos por *MboI* parecerem capazes de diferenciar as duas sequências, existe a possibilidade de que as bandas de 138 e 122 pb produzidas a partir de Tri1A possam não aparecer como bandas separadas em géis de agarose e, como tal, poderiam ser interpretadas como uma única banda de 138 pb, resultando em uma sobreposição com o perfil de bandas registrado para *A. tigrinum* Tig2B. Por essa razão, foi procurada uma terceira enzima que pudesse resolver este problema potencial.

A espécie *A. sculptum* apresentou dois perfis de bandas, ambos distintos dos quatro padrões observados para *A. cajennense sensu stricto*, o que indicou que o alvo COI seria capaz de diferenciar as duas espécies. No entanto, deve ser considerada a possibilidade de que as cinco sequências depositadas como *A. cajennense sensu stricto* por investigadores do Panamá, podem ter sido erroneamente identificadas, como será discutido mais adiante. Além disso, o fragmento de 658 pb de COI que foi gerado a partir de um genoma mitocondrial (número de acesso JX573118.1) depositado como derivado de um espécime de *A. cajennense sensu lato* (de origem geográfica indeterminada) apresentou níveis de similaridade de nucleotídeos entre 97,6% e 98,8% com as sequências de COI de *A. sculptum* examinadas neste estudo enquanto o nível de similaridade observado com as outras sequências depositadas como *A. cajennense sensu stricto* foi de apenas 87,8%. Esse resultado sugere que a sequência pode ter sido produzida a partir de um espécime de *A. sculptum*. Esta hipótese é reforçada pelo fato da sequência JX573118.1 ter sido depositada antes da descrição do complexo *A. cajennense sensu lato* por Nava et al. (2014). Devido à incerteza na identificação da sequência JX573118.1 a mesma não foi utilizada nesse estudo.

A haplotipagem do grande número de sequências disponíveis para os carrapatos pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus* revelou um grau substancial de polimorfismo de sequência e a existência de numerosos haplótipos. A digestão de amplicons virtuais gerados a partir de representantes de cada haplótipo revelou a existência de múltiplos perfis de bandas, que foram registrados e incluídos no banco de dados de “COIsearcher”. No caso de *Dermacentor nitens*, 3 perfis de bandas foram registrados para seis haplótipos. Em relação ao gênero *Haemaphysalis*, 2 perfis de bandas facilmente diferenciados, causados pela perda de um único sítio de reconhecimento *AluI* foram registrados entre os 3 haplótipos de *H. juxtakochi*, e dois padrões de bandas distintos (com diferenças para ambas as enzimas) foram registrados para os dois haplótipos de *H. leporispalustris*.

As sequências COI derivadas do gênero *Rhipicephalus* contiveram 7 haplótipos para *R. microplus* que geraram cinco perfis de bandas distintos. No entanto, o maior grau de polimorfismo de sequência intraespecíficas e variação nos perfis de bandas foi registrado para *R. sanguineus*, onde um total de 10 haplótipos e 10 padrões de bandas distintos foram registrados. O único representante do gênero *Ixodes* incluído neste estudo foi *I. auritulus* que gerou um padrão de bandas único.

Os 23 padrões de bandas das espécies de outros gêneros foram todos únicos e permitiram a identificação diferencial de cada haplótipo de cada espécie. No entanto, a comparação dos perfis de bandas dessas espécies de carrapatos com os 65 perfis gerados para as 27 espécies de *Amblyomma*, demonstrou que o padrão de bandas Mic5A de *R. microplus* pode ser

erroneamente identificado como *A. geayi* (perfil Gea2B) e também com *A. romitii* (perfil Rom1B).

Os dados apresentados no Quadro 1 e Quadro 2 serviram de base para o módulo “COIsearcher”. Os resultados da digestão *in silico* de “amplicons” virtuais de COI produzidos a partir de sequências de outras espécies da família Ixodidae registradas no Brasil são apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3.** Perfis de bandas produzidos de “amplicons” virtuais (709 pb) de COI utilizando as enzimas *AluI* e *MboI* para espécies de *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*.

<b>Espécie</b>	<b>Perfil</b>	<b>Digestão com <i>AluI</i></b>	<b>Digestão com <i>MboI</i></b>
<i>D. nitens</i>	Nit1A	414, 295	492, 119, 98
<i>D. nitens</i>	Nit2B	295, 243, 171	364, 128, 119, 98
<i>D. nitens</i>	Nit2A	414, 295	364, 128, 119, 98
<i>H. juxtakochi</i>	Jux1A	381, 274, 54	252, 240, 119, 98
<i>H. juxtakochi</i>	Jux1B	288, 274, 93, 54	252, 240, 119, 98
<i>H. leporispalustris</i>	Lep1A	255, 180, 126, 124, 18, 6	492, 77, 53, 45, 42
<i>H. leporispalustris</i>	Lep2B	201, 180, 150, 124, 54	364, 128, 98, 77, 42
<i>I. auritulus</i>	Iau1A	159, 156, 150, 124, 87, 21, 12	406, 128, 77, 71, 27
<i>R. microplus</i>	Mic1A	274, 180, 157, 98	406, 175, 128
<i>R. microplus</i>	Mic2B	297, 255, 157	406, 128, 98, 77
<i>R. microplus</i>	Mic3C	255, 180, 157, 117	483, 128, 53, 45
<i>R. microplus</i>	Mic4D	274, 255, 180	483, 128, 98
<i>R. microplus</i>	Mic5A	274, 180, 157, 98	406, 128, 77, 53, 45
<i>R. sanguineus</i>	San1A	342, 157, 138, 72	364, 77, 77, 53, 51, 42, 27, 18
<i>R. sanguineus</i>	San2B	295, 217, 171	364, 77, 77, 49, 42, 29, 27, 18
<i>R. sanguineus</i>	San3C	295, 258, 156	441, 77, 71, 51, 42, 27
<i>R. sanguineus</i>	San4D	243, 171, 171, 124	364, 98, 77, 77, 51, 42
<i>R. sanguineus</i>	San5E	295, 171, 156, 87	364, 77, 77, 53, 51, 45, 42
<i>R. sanguineus</i>	San1C	295, 258, 156	364, 77, 77, 53, 51, 42, 27, 18
<i>R. sanguineus</i>	San4E	295, 171, 156, 87	364, 98, 77, 77, 51, 42
<i>R. sanguineus</i>	San5A	342, 157, 138, 72	364, 77, 77, 53, 51, 45, 42
<i>R. sanguineus</i>	San6F	342, 295, 72	492, 77, 71, 42, 27
<i>R. sanguineus</i>	San7G	342, 156, 118, 72, 21	441, 98, 77, 51, 42

#### 4.3 Expansão da Plataforma “TickCutter” para inclusão da ferramenta “COIsearcher”

A ferramenta “COIsearcher” foi criada de modo bastante semelhante a ferramenta “TickCutter 16S” e aproveitou de algumas das soluções elaboradas para a resolução de problemas encontrados durante o desenvolvimento do módulo 16S. Uma vez que o módulo “COIsearcher” deve ser considerado como representando uma obra em construção ele ainda não é acessível pelo menu principal de “TickCutter” e por isso, deve ser acessado diretamente através do link <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter/coi>.

As faixas de detecção estabelecidas para o módulo “TickCutter 16S” funcionam de uma forma muito eficiente (DE ABREU, 2019), motivo pelo qual as mesmas foram incorporadas na ferramenta “COIsearcher”. Entretanto, devido ao tamanho maior dos “amplicons” virtuais de

COI algumas adaptações foram necessárias. A primeira alteração foi em relação as bandas de 500 pb ou maiores, os quais foram agrupadas na faixa “>=50X” pois poucas bandas atingem esse tamanho e a inclusão de faixas até 709 pb resultaria em um excesso de opções de utilidade limitada nos menus “dropdown”, o que poderia dificultar o uso da ferramenta por exigir que os usuários passem mais tempo vasculhando as diversas opções. A segunda alteração referente as faixas de detecção foram em relação às bandas menores que 50 pb e inexistentes. A inclusão desta faixa foi motivada devido à dificuldade de visualizar bandas muito pequenas nos poucos géis examinados nas análises de digestão *in vitro* enquanto. No caso da ferramenta “TickCutter 16S” bandas menores que 70 pb e inexistentes foram agrupadas juntas pelo mesmo motivo (DE ABREU, 2019). No entanto, mesmo com esses agrupamentos existem 48 opções por menu “dropdown”. Adicionalmente foi tomada a decisão de manter o método de considerar bandas com diferença entre 10 a 19 pb como bandas iguais e ao mesmo tempo distintas. Apesar de aumentar a complexidade do banco de dados, observou-se que, assim como no caso do “TickCutter 16S”, esse método proporcionou maior fluidez ao processo de identificação.

O banco de dados de “COIsearcher” não é divulgado por completo ao público, apenas algumas colunas aparecem na tabela de “COIsearcher”, enquanto outras são ocultadas. Entretanto, parte do banco de dados pode ser visto nos Quadros 2 e 3, que além de mostrar as três colunas visíveis no site também mostra a coluna de grupos finais (padrões), uma coluna ocultada no “website”.

Devido às limitações da plataforma Wix, durante a criação do banco de dados foi preciso criar duas colunas contendo o nome da espécie. Esta necessidade refletiu o fato de que os bancos de dados Wix possuem uma coluna irremovível e com nome e formato imutáveis. Desse modo, foi considerado preferível adicionar todas as colunas da planilha mais a coluna permanente. A coluna para nome da espécie foi feita no formato “Rich text”, uma vez que este formato é o único que suporta letras em itálico, enquanto a coluna permanente que recebeu os mesmos nomes sem itálico foi aproveitada para organizar os dados em ordem alfabética.

Devido as peculiaridades de como Wix funciona, cada página da plataforma possui seu próprio código JavaScript (além do código HTML usado em toda a plataforma e imutável pelo responsável pelo “site”), de modo que o código da ferramenta “TickCutter 16S” funciona apenas na página daquela ferramenta. De fato, esse foi um dos principais motivos pelo qual foi necessário criar um código específico para “COIsearcher”. Enquanto um outro motivo foi o fato de as ferramentas usarem bancos de dados únicos. O código da página de “COIsearcher”, que inclui o código da ferramenta principal junto com o código desenvolvido da ferramenta complementar (sistema empregando as terceiras enzimas requeridas para identificação em nível de espécie), está apresentado no Anexo A.

Um dos aspectos mais interessantes, porém, ao mesmo tempo complexo do uso das ferramentas “TickCutter 16S” e “COIsearcher” é o fato que ambas utilizam dados gerados por digestão *in silico* para interpretação de dados oriundos de digestões executadas *in vitro*, os quais possuem bastante variação na sua interpretação dependendo da experiência do pesquisador e o grau de padronização aplicado na execução das diversas etapas experimentais (quantidade de “amplicon digerido, preparação do gel, espessura do gel, aplicação das amostras, tempo de corrida, coloração com brometo de etídio). As falhas na execução podem ter diversos impactos sobre a qualidade das imagens dos géis, com esses efeitos sendo particularmente evidentes em relação das bandas menores de 100 bp, que tendem a ficar de difícil interpretação. Para reduzir o possível impacto destes fatores a versão atual de “COIsearcher” foi adaptada para incluir a faixa “<10X ou Não possui”, onde bandas menores que 100 pb ou inexistentes foram juntadas. Este aspecto aumentou a complexidade do banco de dados após ser adicionado a “COIsearcher”. Entretanto, esse novo agrupamento oferece maior flexibilidade ao usuário. Caso o usuário tenha como discriminar bandas pequenas (porém nítidas) no gel, ele possui a opção de usar seus valores específicos para bandas menores que 100 pb e maiores que 50 pb, o

que retornará um resultado mais preciso ao usuário, com menos chance de aparecer mais de uma possível espécie na identificação (ou seja, menos chance de requerer uma terceira enzima). Porém, em situações onde as bandas ficaram difíceis de enxergar, é possível agrupar todas as bandas pequenas na opção “<10X ou Não possui”, o que dará um resultado com mais chance de ter mais de uma espécie, apesar de ter a espécie correta no resultado. Nesses casos, o usuário possui a opção de repetir o processo (para tentar produzir bandas claras) ou seguir as instruções para a seleção de uma terceira enzima capaz de fornecer uma identificação diferencial da amostra. Caso o usuário não consiga chegar à espécie de um exemplar, uma das possibilidades é que aquele exemplar possua um padrão de digestão desconhecido. Por isso, foi adicionado à página instruções explicando como enviar a sequência daquele espécime para a equipe do “site” “TickCutter”, que após avaliação irá adicionar o novo padrão ao banco de dados, dando os devidos créditos ao responsável pelo envio da sequência. Essas instruções foram criadas pelo doutor Daniel Paiva Barros de Abreu para a ferramenta “TickCutter 16S”.

O comando “.ascending()” adicionado posteriormente ao código de ambas as ferramentas resolveu o problema de mostrar as espécies fora de ordem alfabética na tabela de resultados. Antes da adição deste comando os resultados eram mostrados em ordem de criação, o que deixava os resultados bastante confuso em situações que muitas espécies eram mostradas.

O resultado da avaliação do tutorial por alguém fora do público-alvo permitiu identificar e alterar os aspectos do texto que apresentavam frases confusas e/ou ambíguas. Na opinião do voluntário o texto era claro e fácil de seguir. A única parte que causou alguma dificuldade foi em relação ao modo como as três primeiras bandas eram descritas. A mudança foi de “três primeiras bandas em ordem decrescente de tamanho” para “três primeiras bandas de cima para baixo no gel”.

Parte da página atual de “COIsearcher”, mostrando a ferramenta principal com o tutorial, os seis menus “dropdown”, os dois botões e a tabela, se encontra na Figura 1.

## Ferramenta principal

### Tutorial:

**Etapa 1.** Selecione os tamanhos (em pares de bases) das bandas visualizadas em gel de agarose após digestão enzimática com *AluI* (**primeira, segunda, e/ou terceira banda** no gel de cima para baixo);

**Observação 1.** Objetivando ampliar a segurança da ferramenta de caracterização, os fragmentos determinados *in silico* foram convertidos em faixas de interpretação mais abrangentes, por isso os campos de seleção de tamanho das bandas abaixo possuem um X na casa das unidades.

**Observação 2.** Bandas de tamanhos muito pequenos podem ser difíceis de observar. Por isso a ferramenta agrupa bandas menores que 50 pares de bases e bandas inexistentes em uma única opção ("**<05X ou Não Possui**"). Entretanto, para géis com bandas fracas recomendamos utilizar a opção "**<10X ou Não Possui**" para todas as bandas abaixo de 100 pares de bases ou inexistentes. Reduzindo assim a sensibilidade da ferramenta em troca de uma identificação mais segura.

**Observação 3.** A ferramenta trata bandas duplas no gel como uma única banda, ou seja, se por exemplo o gel possuir duas bandas de por volta de 200 pares de bases coloca-se apenas uma banda desse tamanho na ferramenta.

**Etapa 2.** Realize o mesmo procedimento da Etapa 1 para os dados referentes a enzima *MboI* (**primeira, segunda, e/ou terceira banda** no gel de cima para baixo);

**Observação 4.** Caso você tenha a sua disposição apenas dados de uma enzima de restrição, mantenha a opção "**Todos os tamanhos**" para as bandas da outra enzima;

**Etapa 3.** Clique em "**Identificar**".

**Observação 5.** Caso precise fazer várias identificações, é possível apagar os resultados e tamanhos selecionados da identificação anterior ao clicar em "**Limpar**".

Primeira banda <i>AluI</i>		Segunda banda <i>AluI</i>		Terceira banda <i>AluI</i>	
Primeira banda	▼	Segunda banda	▼	Terceira banda	▼
Primeira banda <i>MboI</i>		Segunda banda <i>MboI</i>		Terceira banda <i>MboI</i>	
Primeira banda	▼	Segunda banda	▼	Terceira banda	▼

Espécie	Bandas <i>AluI</i>	Bandas <i>MboI</i>
<i>Amblyomma aureolatum</i>	386, 274, 49	364, 128, 98, 77, 42
<i>Amblyomma aureolatum</i>	274, 206, 180, 49	364, 128, 98, 77, 42
<i>Amblyomma auricularium</i>	156, 144, 124, 99, 99, 87	328, 128, 122, 78, 53
<i>Amblyomma auricularium</i>	342, 243, 124	406, 128, 77, 53, 45

**Figura 1.** Imagem da página incluída na plataforma “TickCutter” incluindo o tutorial para o uso da ferramenta principal de COIsearcher.

#### 4.4 Verificação com os padrões de bandas gerados por digestão *in silico*

A plataforma “TickCutter” foi projetada para funcionar como uma alternativa flexível à identificação de espécies baseada em sequenciamento. Nesse contexto, um dos aspectos-chave do sistema é a capacidade de atualizar constantemente a plataforma, através da introdução de novos padrões de bandas e determinar até que ponto (se houver) novos padrões comprometem a identificação diferencial de espécies. O conjunto de dados presente na versão atual de “COIsearcher” foi desenvolvido gradualmente ao longo do projeto o que resultou na execução

de várias avaliações do conjunto de dados. Assim, os resultados dos testes realizados com os dados *in silico* não envolveram todos os padrões de digestão ou algumas das espécies presentes atualmente no banco de dados, uma vez que foram adicionados após a execução das avaliações *in silico*.

O primeiro teste foi baseado em apenas 31 amostras. Quando as duas enzimas foram empregadas em conjunto houve 31 acertos ou seja 100%. Em contraste, os resultados gerados cortando com uma única enzima mostrou-se menos eficiente. Especificamente, foi observado que a enzima *AluI* teve 24/31 acertos (77,5%), enquanto *MboI* identificou apenas 35,4% (11/31) das amostras corretamente. O segundo teste foi executado usando um total de 51 amostras. Neste caso *AluI* possuiu 32/51 acertos (62,7%), enquanto *MboI* identificou 16/35 amostras (31,3%). Mais uma vez, o uso das duas enzimas em conjunto ofereceu um poder de discriminação superior à digestão monoenzimática. Especificamente foi determinado a capacidade de identificar 92,1% das espécies (47/51). No entanto, esta avaliação logo indicou que o amplo grau de polimorfismo observado nas sequências COI causa complicações na identificação de algumas espécies, nomeadamente *A. geayi* (Gea2B) com *A. romitii* (Rom1B) e *A. longirostre* com *A. ovale* (Ova6B).

Dados parecidos foram registrados durante o desenvolvimento da ferramenta “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019) e uma solução eficiente foi encontrada através da identificação de uma terceira enzima capaz de gerar padrões distintos para as espécies não identificadas com o sistema de duas enzimas. Detalhes dos achados em relação ao uso de enzimas adicionais serão apresentados mais em frente.

#### 4.5 Avaliação de padrões de bandas produzido por digestão *in vitro*

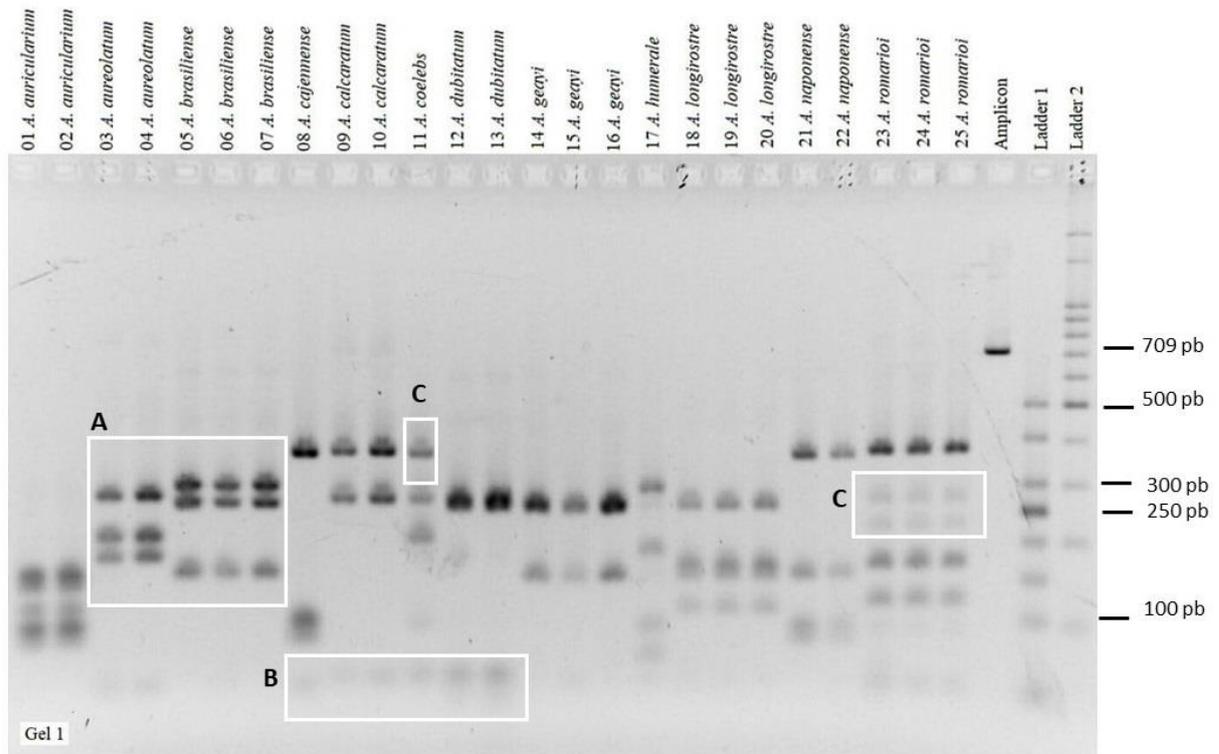
A execução e avaliação da digestão *in vitro* de “amplicons” COI ou 16S representa um componente chave da plataforma “TickCutter”. Infelizmente, devido às restrições impostas ao uso das instalações laboratoriais da UFRRJ, em resposta à pandemia de COVID-19, não foi possível realizar o número de experimentos que seriam necessários para validar integralmente a ferramenta “COIsearcher”, especificamente em termos de sua capacidade de identificar corretamente cada espécie, com base em dados recuperados de digestões *in vitro*.

Os padrões de bandas produzidos após digestão *in vitro* com *AluI* e *MboI* de 48 amplicons representando 22 espécies de carrapatos *Amblyomma*, 2 amplicons produzidos a partir de espécimes de *H. leporispalustris* e um único espécime de *R. microplus* são apresentados nas figuras 2a a 2d.

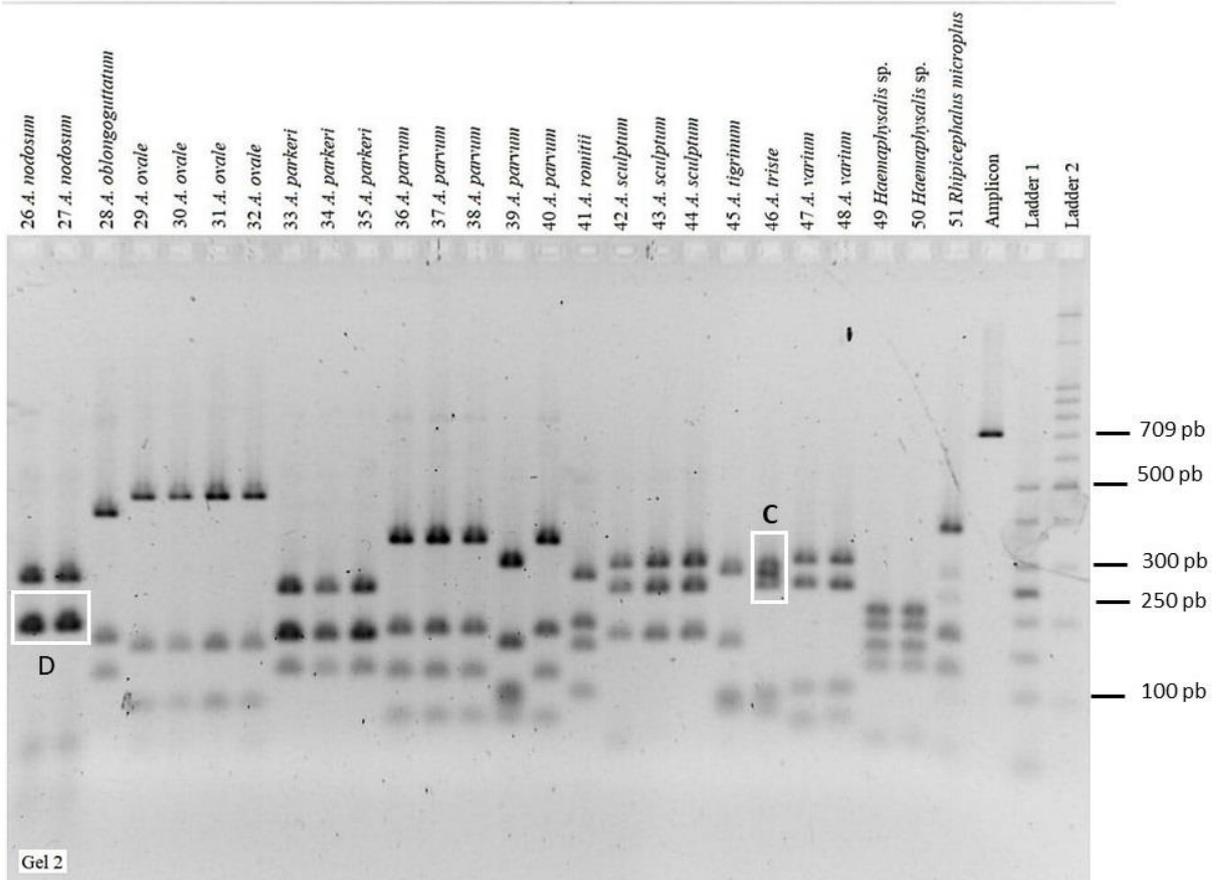
Conforme explicado nos Materiais e Métodos, esses foram os únicos géis produzidos no decorrer do projeto e, como resultado, várias formas de análise foram realizadas na tentativa de aumentar a precisão do processo de identificação. É importante notar que esses experimentos foram conduzidos em paralelo com o desenvolvimento do módulo “COIsearcher” e, como tal, o número de sequências que puderam ser identificadas foi limitado pela quantidade de perfis de bandas que estavam presentes no banco de dados “COIsearcher”. As amostras utilizadas nesta análise foram todas identificadas previamente pelo sequenciamento do 16S rDNA e, em alguns casos, o sequenciamento do amplicon COI também foi realizado.

Em alguns casos, foram produzidas bandas bem separadas para ambas as enzimas, o que facilitou muito sua análise (como por exemplo *A. aureolatum* e *A. brasiliense*, mostrados no quadrante A nas figuras 2 e 4). No caso de *A. brasiliense* digerido com *MboI* (Fig. 4), duas das amostras apresentaram banda dupla (com tamanhos de aproximadamente 120 pb, indicado como quadrante D, que não foram separadas pelas condições de eletroforese utilizadas). Um exemplo adicional do fenômeno de bandas duplas é mostrado na Figura 3, onde ambas as amostras de *A. nodosum* apresentaram uma banda dupla de ~190 pb. O quadrante B na figura 2 fornece um exemplo de bandas de menos de 100 pb que não puderam ser avaliadas. Em

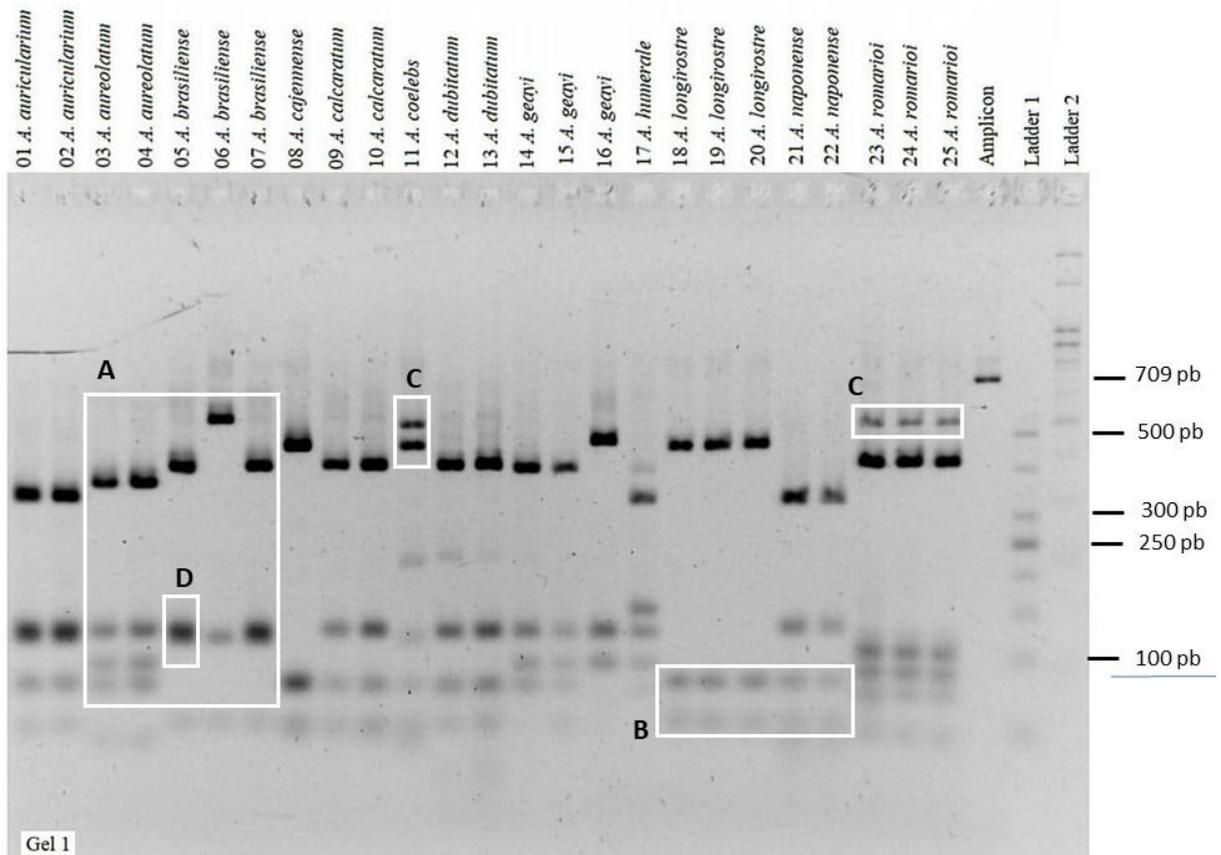
contraste, o quadrante B mostrado na figura 4 fornece exemplos de bandas de menos de 100 pb que eram claramente visíveis nas digestões *MboI* de *A. longirostre* e *A. naponense* e, como tal, poderiam ser incluídas nas análises. Exemplos de digestão parcial, resultando em perfis de difícil avaliação são mostrados nos Quadrantes C presentes nas figuras 2, 3 e 4. No caso de amplicons gerados a partir de *A. coelebs* e *A. romarioi*, a digestão parcial foi registrada para ambas as enzimas (Figuras 2 e 4). No caso de *A. triste*, a digestão parcial foi claramente visível para *AluI*, mas não foi detectada quando a mesma quantidade de DNA foi digerida com *MboI*.



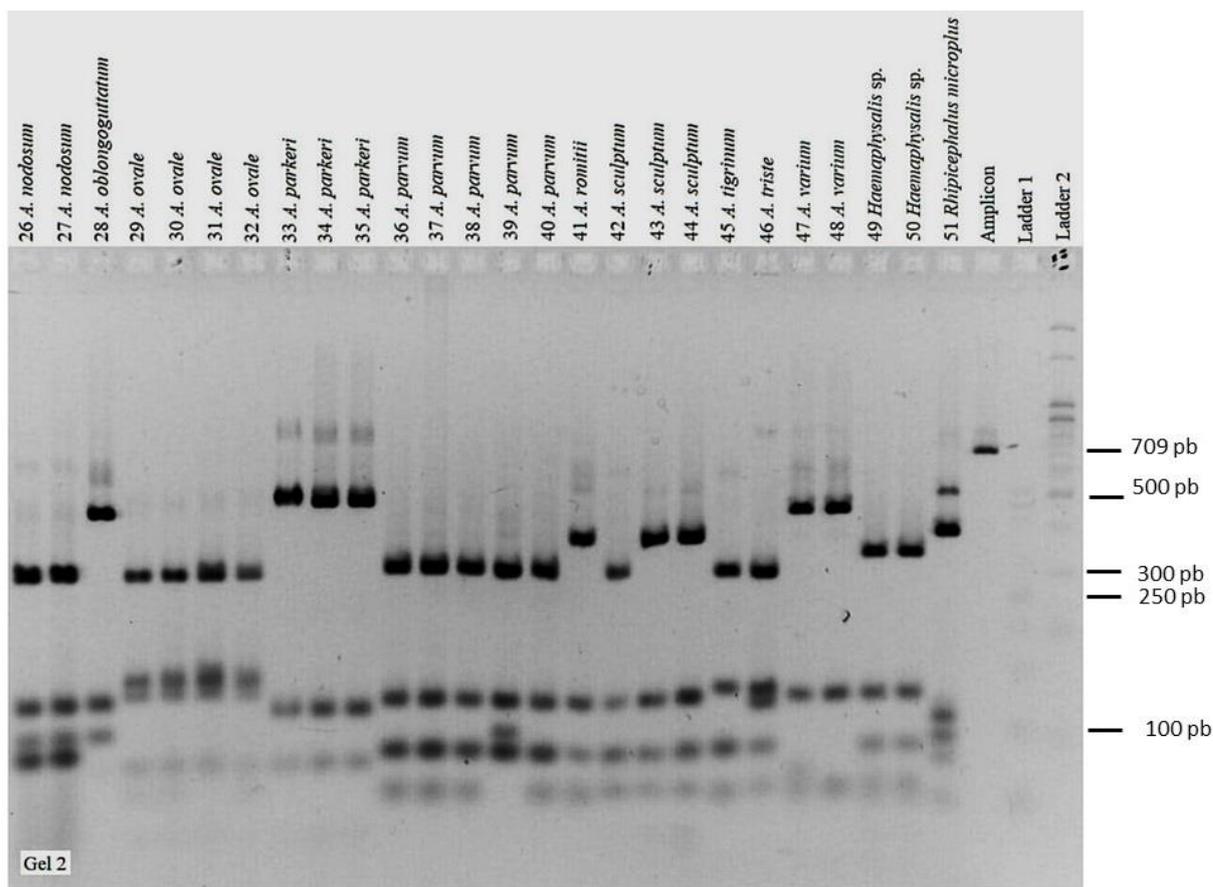
**Figura 2.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *AluI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 25 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041/M1042; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas claramente separadas (A), bandas de menos de 100 pb que não podem ser medidas com segurança (B) e bandas sugestivas de digestão parcial (C).



**Figura 3.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *AluI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 23 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*, dois exemplares de *H. leporispalustris* (marcado como *Haemaphysalis* sp.) e uma única amostra de *R. microplus*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041/M1042; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas sugestivas de digestão parcial (C), e a presença de bandas não separadas de tamanhos semelhantes (D).



**Figura 4.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *MboI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 25 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041/M1042; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem. Os quadrantes indicam exemplos de bandas claramente separadas (A), bandas de menos de 100 pb que puderam ser medidas com confiança (B), bandas sugestivas de digestão parcial (C) e a presença de bandas não separadas de tamanhos semelhantes (D).



**Figura 5.** Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com a endonuclease de restrição *MboI* em “amplicons” gerados do gene COI (709 pb) de 23 exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma*, dois exemplares de *H. leporispalustris* (marcado como *Haemaphysalis* sp.) e uma única amostra de *R. microplus*. Os nomes das espécies examinadas estão fornecidos na parte superior do gel. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x, 5 volts/cm durante 90 min) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos marcadores de 50 pb e 100 pb (Ladder 1 = Synapse 50bp ladder M1041/M1042; Ladder 2 = LGC biotec 100 bp ladder). Amplicon = produto de PCR sem digestão. Os tamanhos das bandas de referência (em pb) estão indicados no lado direito da imagem.

Um total de cinco avaliações diferentes foram realizadas com os quatro géis. Os resultados dessas análises refletem o ponto do projeto em que foram conduzidos (por dependerem do número de perfis de bandas que foram incluídos no banco de dados “COIsearcher” naquele momento). Pelo mesmo motivo cada avaliação utilizou apenas amostras pertencentes a espécies depositadas no banco de dados naquele momento, apesar de cada enzima possuir 51 amostras nos géis.

A primeira avaliação resultou na identificação bem sucedida de 14 das 37 amostras testadas (37,8%), quando os dados das duas enzimas foram incluídos no teste (os dados de digestão *in vitro* de exemplares das espécies *A. brasiliense*, *A. cajennense sensu stricto*, *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. romitii*, *A. triste* e *A. varium* não resultaram em uma identificação, uma vez que poucos dados de digestão *in silico* estavam disponíveis naquele momento do estudo para essas espécies). Observando os erros de identificação foi notado que a maioria dos erros se devem a presença de uma banda nos perfis obtidos com uma das enzimas, geralmente *MboI*, que possui tamanho

levemente diferente do que estava incluído no banco de dados e com isso fogem da faixa de detecção da ferramenta. Em outros casos uma das enzimas (amostra 41 – *A. romitii* na digestão por *MboI*, figura 5) ou ambas (amostra 11 – *A. coelebs*, amostras 26 e 27 – *A. oblongoguttatum* e amostra 28 – *A. ovale*) possuem todas as bandas com tamanhos diferentes dos valores presente no banco de dados de “COIsearcher” e em um caso (amostra 33 – *A. parkeri*, figura 5) uma amostra possuía apenas duas bandas, enquanto que todos os padrões identificados daquela espécie, através de análises *in silico*, possuem três bandas.

Conforme sugerido anteriormente é possível que os erros foram causados pela existência de perfis de digestão não conhecidos presentes nos géis e provavelmente pela qualidade inferior dos géis de *MboI*, que possuem diversas bandas de fraca intensidade e de difícil visualização quando com menos de 100 pb. No entanto, foi considerado que o principal fator para o baixo número de identificações com duas enzimas resultou-se pelo uso das bandas presentes nos dois marcadores de peso molecular para medição das bandas dentro do programa GelAnalyzer. Neste contexto, o marcador de peso molecular de 100 pb não apresentou bandas claras em ambos os géis (Figuras 4 e 5), e no caso do gel 2 (Figura 5) o marcador de 50 pb foi essencialmente inútil.

Um outro fator que possivelmente impactou nos resultados foi a decisão de não ter usado a opção “RF calibration mode” presente no programa GelAnalyzer. Para determinar até que ponto esse fator estava causando problemas a segunda avaliação foi executada usando a opção “RF calibration mode”. Contrariamente ao esperado, o uso dessa ferramenta resultou em menos sucesso que obtido na primeira avaliação. Especificamente, as duas enzimas em conjunto identificaram 10/37 (27%), um valor quase igual ao registrado usando apenas *MboI* (9/37) na primeira avaliação. Devido estas dificuldades a decisão foi tomada para executar uma terceira avaliação manual empregando o programa Powerpoint e evitar o uso de “RF calibration mode” nesses géis.

Mais uma vez a mudança no método, não resultou numa melhoria significativa. Assim, o uso dos dados para ambos as enzimas resultaram em 10/37 (27%) acertos. Esses dados foram interpretados como uma consequência da inexperiência do operador no uso desta técnica e a impossibilidade de receber treinamento presencialmente.

Na quarta avaliação a estratégia empregada foi o uso de apenas um dos marcadores moleculares (o ladder Synapse 50bp ladder M1041) como fonte das bandas de referência para o programa “GelAnalyzer” e também o uso de apenas duas bandas. Esta abordagem resultou em uma pequena melhoria nos resultados (apesar da hipótese que a inclusão da terceira banda deixaria “COIsearcher” mais específico). Com base nesta observação a decisão foi tomada de criar a faixa de agrupamento de bandas menores que 100 pb e inexistentes em uma única opção na ferramenta, conforme relatado anteriormente. Nessa avaliação as duas enzimas em conjunto resultaram em 13/37 (35,1%) acertos. Apesar do número de identificações em nível de espécies continuar longe do ideal, os resultados foram considerados em concordância com os dados registrados previamente *in silico*, onde a enzima *AluI* gerou um número de acertos superior a *MboI*, porém inferior à quantidade de acertos registrados quando as enzimas foram usadas em combinação. Entre os possíveis motivos para o ainda baixo sucesso na identificação obtida na quarta avaliação, estão a existência de perfis de bandas desconhecidos, a dificuldade de interpretar amostras onde ocorreu digestão parcial e a alta semelhança entre alguns padrões gerados *in vitro* onde a uso de uma terceira enzima seria necessário para produzir uma identificação diferencial. Além disso, foi considerado possível que diferenças na mobilidade das bandas presentes nos marcadores de peso molecular, em comparação às bandas presentes nas amostras testes, introduziram uma distorção na interpretação dos padrões, tanto para o programa “GelAnalyzer” quanto para um operador tentando avaliar os géis manualmente com Powerpoint. Uma solução para este problema foi proposta dentro do módulo “TickCutter 16S”, através do uso de bandas presentes em algumas das amostras testes (previamente sequenciadas

e assim de tamanho garantido) como bandas de referência, em vez das bandas presentes nos marcadores de peso molecular.

A quinta e última avaliação foi conduzida usando a estratégia de amostras testes como fonte das bandas de referência, e incorporou um maior número (43) de perfis de digestão que nos testes anteriores. Esta combinação de mudanças resultou num aumento na quantidade de identificações corretas quando as duas enzimas foram combinadas. Assim, a enzima *AluI* gerou 11/43 (25,5%) acertos, *MboI* acertou apenas 3/43 (6,9%), e as enzimas em conjunto acertaram 26/43 (60,4%) amostras. Apesar de o resultado ainda ser longe do ideal, essa avaliação foi a única onde mais que a metade das amostras foram identificadas e foi visto como oferecendo o caminho a ser seguido e aprimorado em futuras análises *in vitro*. Vale a pena ressaltar, que tais análises não foram possíveis devido as restrições impostas pela pandemia COVID-19.

As amostras que não foram capazes de ser identificadas podem ser divididas em quatro grupos. Primeiro, teve uma espécie (*A. dubitatum*) para qual não existe sequências de COI depositados em nenhum banco de dados (incluindo o banco do LBioMol). Em segundo teve espécies identificadas por sequenciamento do gene 16S (assim sem confirmação da sequência COI), onde um ou mais exemplares geraram um padrão de bandas *in vitro*, que foi distinto dos perfis identificados pelas análises *in silico*. Um exemplo deste fenômeno foi *A. brasiliense* digerido com *MboI* (amostra 6 no gel 4). O terceiro grupo se refere especificamente aos perfis de *A. cajennense sensu stricto* do Panamá, devido a possibilidade/probabilidade de esses perfis não representarem esta espécie. O quarto e maior grupo foi formado por espécies que geraram perfis de digestão altamente similares e que assim necessitaram do uso de uma terceira enzima para conseguir uma identificação em nível de espécie. Detalhes deste grupo estão apresentados abaixo.

#### **4.6 Identificação de enzimas alternativas (terceiras enzimas) para complementar os perfis de bandas geradas por *AluI* e *MboI***

O uso da primeira técnica elaborada para a assimilação de conjuntos de perfis (gerados com *AluI* e *MboI*) que não puderam ser separados por “COIsearcher”, resultou na identificação de seis conjuntos. Estes conjuntos, foram (1) *A. nodosum* (Nod1B) e *A. calcaratum* (Cal1C); (2) *A. parvum* (Parv5D e Parv1A) e *A. naponense* (Nap1A e Nap2A); (3) *A. triste* (Tri1A) e *A. tigrinum* (Tig2B); *A. geayi* (Gea2B) e *A. romitii* (Rom1B); (4) *A. longirostre* (Lon1A) e *A. ovale* (Ova6B); (5) *A. latepunctatum* (Lat1A) e *A. auricularium* (Auri2B e Auri2C) e (6) *A. auricularium* (Auri1A) e *A. parvum* (Parv2B).

Conforme explicado nos Materiais e Métodos a segunda abordagem aplicada na identificação de conjuntos que necessitam de uma terceira enzima foi mais elaborada e cautelosa que a primeira e conseqüentemente assimilou um total de 8 conjuntos, os quais incorporam um número maior de possíveis conflitos. Os resultados empregando a segunda técnica para examinar os 65 perfis de bandas identificados para *Amblyomma* (através de digestão com *AluI* e *MboI*) e exame posterior dos 23 perfis (também por digestão com *AluI* e *MboI*) de outros gêneros de carrapatos estão apresentados na Tabela 3. As enzimas identificadas como sendo capazes (com uma única exceção), de fornecer uma identificação diferencial de cada conjunto também estão incluídos na Tabela 3. No caso do conjunto 7, uma identificação foi possível usando mais de uma enzima. Assim, *A. auricularium* (Auri1A) e *A. parvum* (Parv2B), são separados usando as enzimas *TaqI* ou *BccI*. Vale a pena ressaltar que a seleção das enzimas ficou limitada às disponíveis nos estoques do LBioMol.

**Tabela 3.** Detalhes dos conjuntos de padrões de bandas que precisaram de uma terceira enzima para permitir uma identificação em nível de espécies usando a ferramenta “COIsearcher”.

<b>Padrões confundíveis entre si, formando o Conjunto 1</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. parvum</i>	Parv4D	<i>MspI</i>	270, 228, 112, 99
<i>A. romitii</i>	Rom1A	<i>MspI</i>	600, 109
<b>Conjunto 2</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. parvum</i>	Parv5D e Parv1A	<i>MspI</i>	340, 270, 99
		<i>MspI</i>	270, 228, 112, 99
		<i>MspI</i>	337, 273, 99
		<i>MspI</i>	273, 228, 109, 99
<i>A. naponense</i>	Nap1A e Nap2A	<i>MspI</i>	600, 109
<i>A. tigrinum</i>	Tig2C e Tig2D	<i>MspI</i>	366, 343
<b>Conjunto 3</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. tigrinum</i>	Tig2B	<i>MspI</i>	366, 343
<i>A. triste</i>	Tri1A	<i>MspI</i>	463, 246
<b>Conjunto 4</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. geayi</i>	Gea2B	<i>TaqI</i>	614, 95
<i>A. romitii</i>	Rom1B	<i>TaqI</i>	446, 263
<i>R. microplus</i>	Mic5A	<i>TaqI</i>	525, 95, 89
<b>Conjunto 5</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. longirostre</i>	Lon1A	<i>DdeI</i>	644, 65
		<i>DdeI</i>	494, 150, 65
		<i>DdeI</i>	494, 215
<i>A. ovale</i>	Ova6B	<i>DdeI</i>	494, 150, 65
<i>A. tigrinum</i>	Tig1A	<i>DdeI</i>	381, 278, 50
<i>A. parvum</i>	Parv3A	<i>DdeI</i>	709 (Não digere)
<b>Conjunto 6</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. humerale</i>	Hum1B	<i>MspI</i>	441, 268
<i>A. nodosum</i>	Nod1A	<i>MspI</i>	337, 239, 70, 63
<b>Conjunto 7</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. auricularium</i>	Auri1A	<i>TaqI</i>	374, 263, 72
<i>A. parvum</i>	Parv2B	<i>TaqI</i>	446, 263
<b>Conjunto 7 (enzima alternativa)</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. auricularium</i>	Auri1A	<i>BceI</i>	404, 305
<i>A. parvum</i>	Parv2B	<i>BceI</i>	345, 305, 59
<b>Conjunto 8</b>			
<b>Espécie</b>	<b>Padrão com <i>AluI</i> e <i>MboI</i></b>	<b>Enzima</b>	<b>Bandas formadas</b>
<i>A. brasiliense</i>	Bra1A	<i>MspI</i>	600, 109
<i>A. sculptum</i>	Scu1A	<i>MspI</i>	343, 210, 156
		<i>MspI</i>	499, 210

Conforme mostrados na Tabela 3, as enzimas recomendadas para permitir a resolução dos perfis conflitantes foram as seguintes: (1) *MspI* para conjuntos 1, 2, 3 e 6; (2) *TaqI* para conjunto 4; (3) conjunto 5 usando *DdeI* e (4) conjunto 7 empregando *BccI* ou *TaqI*. No caso do conjunto 5, a enzima de restrição *DdeI* foi incapaz de separar completamente as sequências de *A. longirostre* (todas com o mesmo perfil com *AluI* e *MboI*) de *A. ovale* (Ova6B). Apesar de nosso desejo de trabalhar exclusivamente com enzimas já disponíveis no LBioMol, uma busca usando outras enzimas incluídas em NEBcutter V2.0 foi executada, mas falhou na identificação de uma enzima capaz de ultrapassar este problema. Além disso, foi observado que a enzima *DdeI* não corta o grupo de *A. parvum* (Parv3A) também presente no conjunto 5. Isso foi visto como uma complicação adicional para este conjunto, uma vez que a análise baseada na não digestão pode ser considerada não ideal, pois a falta de digestão poderia ser o resultado de algum problema no preparo da amostra e não da falta de um local de ação da enzima.

Como um total, a inclusão da terceira enzima foi considerada muito eficaz. Assim, 86/88 perfis (agrupados com base nas bandas geradas com *AluI* e *MboI*) foram identificados em nível de espécie. A única exceção, que resultou por causa de um polimorfismo presente em uma única sequência derivada de *A. longirostre*, serviu como uma alerta da possível fragilidade de um sistema construído na técnica de PCR-RFLP e reforçou a necessidade de continuamente atualizar os bancos de dados através da adição de novas sequências.

A capacidade do módulo “COIsearcher” de discriminar entre os vários gêneros de Ixodidae com apenas uma identificação conflitante (entre *R. microplus*, *A. geayi* e *A. romitii*), que foi resolvida através do uso da enzima *TaqI*, representou um excelente resultado. No entanto, deve ser notado que o banco de dados do “COIsearcher” não inclui faixas para discriminar bandas acima de 500 pb. Assim, a completa separação entre *R. microplus* e *A. geayi* não foi possível ao usar a ferramenta. Porém, dado a extensa variação entre as bandas maiores (614 pb em *A. geayi* e 525 pb em *R. microplus*) presente em cada perfil, foi considerado provável que esta limitação seja facilmente resolvida observando a posição das bandas em relação à amostra “ladder” no gel.

#### **4.7 Expansão do módulo “COIsearcher” para permitir identificação em nível de espécie empregando uma terceira enzima**

A adição de um novo banco de dados à página de “COIsearcher”, para permitir a avaliação de digestão com uma terceira enzima através de uma ferramenta auxiliar, foi executado de uma forma semelhante ao processo descrito anteriormente para a ferramenta principal. A aparência da ferramenta nova, junto com seu tutorial, dentro da plataforma “TickCutter” está apresentada na Figura 3. O fato de que as duas ferramentas são apresentadas separadamente, mas na mesma página, não afetou o desempenho delas. Neste contexto, apesar da ferramenta complementar depender do resultado da ferramenta principal para a seleção do conjunto no menu “dropdown”, ela foi desenvolvida pensando-se na anotação do resultado obtido no primeiro passo pelo usuário. Com base neste resultado o usuário seria direcionado para o tutorial onde teria como selecionar a(s) enzima(s) apropriada(s) para executar a digestão *in vitro* e posteriormente introduzir seus achados na ferramenta complementar.

## Ferramenta complementar

Essa ferramenta tem o propósito de resolver problemas de identificação que não puderam ser resolvidos utilizando apenas duas enzimas, desse modo essa ferramenta oferece a possibilidade de usar uma terceira enzima na identificação. Os problemas de identificação foram agrupados em grupos que podem ser visualizados abaixo:

**Grupo 1:** *Amblyomma parvum* e *Amblyomma romitii*. Solucionado com *Mspl*.

**Grupo 2:** *Amblyomma naponense*, *Amblyomma parvum* e *Amblyomma tigrinum*. Solucionado com *Mspl*.

**Grupo 3:** *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma triste*. Solucionado com *Mspl*.

**Grupo 4:** *Amblyomma geayi* e *Amblyomma romitii*. Solucionado com *TaqI*.

**Grupo 5:** *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum* e *Amblyomma tigrinum*. Solucionado parcialmente com *Ddel*.

**Grupo 6:** *Amblyomma humerale* e *Amblyomma nodosum*. Solucionado com *Mspl*.

**Grupo 7:** *Amblyomma auricularium* e *Amblyomma parvum*. Solucionado com *Bccl* ou *TaqI*.

**Grupo 8:** *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma sculptum*. Solucionado com *Mspl*.

### Tutorial:

**Etapa 1.** Selecione o **grupo** que deseja identificar (baseando-se na identificação com *AluI* e *Mbol* e na descrição dos grupos acima);

**Etapa 2.** Selecione a **enzima** que deseja usar nesse grupo (essa etapa é obrigatória mesmo que o grupo seja solucionado por apenas uma enzima, como no caso do grupo 1 por exemplo);

**Etapa 3.** Selecione os tamanhos (em pares de bases) das bandas visualizadas em gel de agarose após digestão enzimática com a enzima escolhida (**primeira, segunda, e/ou terceira banda** no gel de cima para baixo);

**Observação 1.** Objetivando ampliar a segurança da ferramenta de caracterização, os fragmentos determinados *in silico* foram convertidos em faixas de interpretação mais abrangentes, por isso os campos de seleção de tamanho das bandas abaixo possuem um X na casa das unidades.

**Observação 2.** Bandas de tamanhos muito pequenos podem ser difíceis de observar. Por isso a ferramenta agrupa bandas menores que 50 pares de bases e bandas inexistentes em uma única opção ("**<05X ou Não Possui**"). Entretanto, para géis com bandas fracas recomendamos utilizar a opção "**<10X ou Não Possui**" para todas as bandas abaixo de 100 pares de bases ou inexistentes. Reduzindo assim a sensibilidade da ferramenta em troca de uma identificação mais segura.

**Observação 3.** A ferramenta trata bandas duplas no gel como uma única banda, ou seja, se por exemplo o gel possuir duas bandas de por volta de 200 pares de bases coloca-se apenas uma banda desse tamanho na ferramenta.

**Etapa 4.** Clique em "Identificar".

**Observação 4.** Caso precise fazer várias identificações, é possível apagar os resultados e tamanhos selecionados da identificação anterior ao clicar em "Limpar".

Grupo  Enzima

Primeira banda  Segunda banda  Terceira banda

Espécie	Enzima	Bandas
<i>Amblyomma auricularium</i>	TaqI	374, 263, 72
<i>Amblyomma auricularium</i>	Bccl	404, 305
<i>Amblyomma brasiliense</i>	Mspl	600, 109
<i>Amblyomma geayi</i>	TaqI	614, 95

### Não foi possível caracterizar o seu exemplar?

A detecção de novos padrões de corte pode ocorrer em decorrência de espécies não consideradas em nosso banco de dados (novas espécies ou espécies não reportadas previamente no Brasil), ou resultado do polimorfismo do alvo molecular considerado. Saiba como contribuir com a atualização de nossa ferramenta de identificação [aqui](mailto:tickcutter@gmail.com) ou fale conosco pelo e-mail: [tickcutter@gmail.com](mailto:tickcutter@gmail.com).

**Figura 6.** Imagem da página incluída na plataforma “TickCutter” incluindo o tutorial para o uso da ferramenta complementar do módulo “COIsearcher” para identificação através do uso de uma terceira enzima.

#### 4.9 Atualização da Ferramenta “TickCutter 16S”

Um dos aspectos centrais da plataforma “TickCutter” é a capacidade de atualizar os bancos de dados continuamente para identificar novos perfis de digestão e de determinar qual seria o possível impacto destes em relação ao poder discriminatório da ferramenta. A atualização do módulo “TickCutter 16S” resultou na identificação de 35 novos padrões de bandas procedentes de 78 das 363 sequências de 16S rDNA depositados para carrapatos da família Ixodidae no GenBank de 06/09/2019 até 08/03/2021. Estes padrões foram gerados através de digestão *in silico* de “amplicons” virtuais e em seguida comparados com os perfis existentes no banco de dados da ferramenta “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019), para identificar novos perfis e avaliar possíveis conflitos na identificação em nível de espécies. Quatro dos perfis pertencem a espécies do gênero *Ixodes* (*Ixodes bocatorensis*, *Ixodes catarinensis*, *Ixodes paranaensis* e *Ixodes spinosus*), que não foram incluídas previamente na ferramenta por serem espécies novas ou reinstauradas (LABRUNA et al., 2020; ONOFRIO et al., 2020). No caso da espécie *Ixodes lasallei*, a nova sequência depositada no GenBank originou no Brasil e aumentou o número de representantes deste espécies para três, sendo que houve apenas um perfil de bandas para a espécie.

Os outros novos padrões de bandas foram gerados para as espécies: *A. dissimile* (2 perfis), *A. longirostre* (1 perfil), *A. ovale* (8 perfis), *A. parkeri* (1 perfil), *A. parvum* (1 perfil), *Haemaphysalis juxtakochi* (2 perfis), *Haemaphysalis leporispalustris* (3 perfis), *Ixodes amarali* (1 perfil), *Ixodes auritulus* (3 perfis), *Ixodes loricatus* (1 perfil), *Rhipicephalus microplus* (3 perfis) e *Rhipicephalus sanguineus* (4 perfis). A introdução dos novos perfis não interferiu no funcionamento da ferramenta, que manteve o poder discriminatório registrado anteriormente. Porém, foi notado que conforme observado previamente, os padrões registrados para os membros do gênero *Ixodes* não permitiram uma identificação em nível de espécie para várias espécies que ficaram registradas com *Ixodes* spp.

Os últimos resultados de destaque em relação à atualização do banco de dados dos carrapatos Ixodidae, são os registrados em relação à espécie *A. ovale* onde foi registrada a existência de 8 novos perfis de bandas, aumentando a quantidade de padrões para 12. Devido ao amplo grau de polimorfismo presente nas sequências de 16S, esta espécie tem sido destacada como uma possível fonte de perfis conflitantes, os quais podem ser resolvidos através de digestão com a enzima *XbaI* (DE ABREU, 2019). Digestão das novas sequências depositadas para esta espécie com *XbaI* identificou duas sequências (MK792953.1 do padrão Oval\_D1 e MN171341.1 do padrão Oval\_J1) que foram imunes à ação desta enzima.

A plataforma “TickCutter” foi desenvolvida originalmente com o intuito de permitir a identificação de carrapatos da família Ixodidae, com ênfase nos membros do gênero *Amblyomma*, devido a predominância deste gênero nas infestações de aves silvestres, os quais representam o foco das investigações desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa. No entanto, ficou óbvio que para virar uma ferramenta de valor para todos os acarologistas brasileiros seria necessário a ampliação da plataforma através da inclusão de perfis de bandas procedentes de sequências de 16S rDNA depositados no GenBank por espécies da família Argasidae. Um total de 75 sequências (na forma de “amplicons” virtuais), representando 22/25 das espécies de Argasídeos reconhecidos no Brasil foram avaliadas *in silico* com *DraI* e *VspI*, resultando na identificação de 31 perfis, apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Padrões de bandas geradas através de digestão in silico com as enzimas *DraI* e *VspI* de “amplicons” virtuais de sequencias de 16S rDNA derivadas de 22 espécies da família Argasidae.

Argasídeos		Bandas formadas por digestão (pb)	
Espécie	Padrão	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>
<i>Antricola delacruzii</i>	Ade1A	199, 92, 67, 58, 23, 17, 17	Não digere
<i>Antricola guglielmonei</i>	Agu1A	201, 92, 67, 57, 23, 17, 17	284, 190
<i>Argas miniatus</i>	Ami1A	200, 138, 48, 29, 17, 17	206, 151, 92
<i>Nothoaspis amazoniensis</i>	Nam1A	160, 125, 115, 30, 17, 17, 12	Não digere
<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	Obr1A	191, 133, 48, 38, 30, 17, 17	Não digere
<i>Ornithodoros capensis</i>	Ocap1A	172, 92, 69, 46, 30, 23, 17, 17, 9	Não digere
<i>Ornithodoros capensis</i>	Ocap1B	202, 92, 69, 45, 23, 17, 17, 10	Não digere
<i>Ornithodoros cavernicolous</i>	Ocav1A	204, 115, 102, 23, 17, 16	Não digere
<i>Ornithodoros cerradoensis</i>	Oce1A	201, 122, 98, 17, 17, 15	Não digere
<i>Ornithodoros faccinii</i>	Ofa1A	185, 161, 63, 30, 21, 17	351, 126
<i>Ornithodoros fonsecai</i>	Ofon1A	188, 92, 58, 30, 26, 23, 22, 19, 17	323, 152
<i>Ornithodoros fonsecai</i>	Ofon1B	172, 102, 92, 30, 23, 22, 17, 16	322, 152
<i>Ornithodoros guaporensis</i>	Ogu1A	171, 98, 74, 65, 30, 17, 17	Não digere
<i>Ornithodoros hasei</i>	Oha1A	172, 124, 115, 30, 17, 17	323, 152
<i>Ornithodoros kohlsi</i>	Oko1A	202, 124, 115, 17, 17	Não digere
<i>Ornithodoros marinkellei</i>	Oma1A	133, 124, 92, 56, 30, 17, 17, 6	Não digere
<i>Ornithodoros marinkellei</i>	Oma1B	189, 124, 98, 30, 17, 17	Não digere
<i>Ornithodoros marinkellei</i>	Oma1C	313, 98, 30, 17, 17	Não digere
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi1A	239, 199, 17, 17	259, 213
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi1B	199, 115, 103, 21, 17, 17	259, 213
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi2B	199, 115, 104, 21, 17, 17	381, 92
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi3C	203, 124, 115, 17, 17	324, 152
<i>Ornithodoros peropteryx</i>	Ope1A	201, 197, 44, 17, 17	308, 168
<i>Ornithodoros rietcorreai</i>	Ori1A	172, 98, 66, 58, 30, 17, 17, 17	239, 236
<i>Ornithodoros rietcorreai</i>	Ori1B	172, 125, 115, 30, 17, 17	240, 236
<i>Ornithodoros rondoniensis</i>	Oron1A	190, 142, 98, 30, 17	286, 191
<i>Ornithodoros rostratus</i>	Oros1A	173, 125, 48, 30, 23, 22, 20, 17, 16	261, 168, 45
<i>Ornithodoros rostratus</i>	Oros2A	173, 125, 48, 30, 23, 22, 20, 17, 16	306, 168
<i>Ornithodoros saraivai</i>	Osa1A	170, 115, 79, 43, 30, 17, 16	Não digere
<i>Ornithodoros setosus</i>	Ose1A	172, 125, 115, 30, 17, 17	384, 92
<i>Ornithodoros tabajara</i>	Ota1A	235, 98, 57, 53, 17, 17	385, 92

Uma avaliação destes perfis em comparação ao banco de dados referente a família Ixodidae, revelou que 24 padrões não foram identificados (retornaram resultados em branco) pela ferramenta “TickCutter 16S”, mostrando que eles não teriam nenhum impacto sobre o poder discriminatório do módulo. No entanto, sete padrões de seis espécies (*Antricola guglielmonei*, *Ornithodoros capensis*, *Ornithodoros guaporensis*, *Ornithodoros kohlsi*, *Ornithodoros marinkellei* e *Ornithodoros mimon*) geraram problemas de identificação com

perfis dos seguintes carrapatos da família Ixodidae: *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. tigrinum*, *Dermacentor nitens*, *H. leporispalustris*, *I. auritulus* e *R. microplus*. Detalhes dos perfis conflitantes estão apresentados na Tabela 5. Devido a necessidade de executar uma análise mais profunda sobre estes perfis, com o intuito de achar soluções para os problemas de identificação e o fato de que várias sequencias não são digeríveis com a enzima *VspI*, a decisão foi tomada a não incluir os perfis dos Argasídeos no banco de dados no momento.

**Tabela 5.** Perfis de digestão gerados por carrapatos da família Argasidae que geraram identificações conflitantes com membros da família Ixodidae.

<b>Argasídeos conflitantes com Ixodídeos</b>		
<b>Argasídeo</b>	<b>Padrão</b>	<b>Ixodídeo</b>
<i>Antricola guielmonei</i>	Agu1A	<i>A. parkeri</i> (Park_B2)
<i>Ornithodoros capensis</i>	Ocap1A	<i>A. tigrinum</i> (Tigr_A1 e Tigr_B1) <i>R. microplus</i> (Micr_B2)
<i>Ornithodoros guaporensis</i>	Ogu1A	<i>A. geayi</i> (Geay_C3), <i>A. tigrinum</i> (Tigr_A1 e Tigr_B1) <i>R. microplus</i> (Micr_B2)
<i>Ornithodoros kohlsi</i>	Oko1A	<i>I. auritulus</i> (Iaur_E1)
<i>Ornithodoros marinkellei</i>	Oma1C	<i>D. nitens</i> (Nite_A1)
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi1A	<i>H. leporispalustris</i> (Lepo_A1)
<i>Ornithodoros mimon</i>	Omi1B	<i>A. coelebs</i> (Coel_A1)

## 5 DISCUSSÃO

É notável o avanço da medicina veterinária no diagnóstico e tratamento das doenças infectocontagiosas e parasitárias nas últimas décadas (HOWSON et al., 2017; HOLM et al., 2019; NZELU; KATO; PETERS, 2019). Atualmente, a detecção e diagnóstico de agentes etiológicos contam com vários métodos laboratoriais, além de informações sobre os sintomas e históricos clínicos (PAULINO et al., 2021; VIEIRA et al., 2019; KHAN; ZAHOOOR, 2018; ROSTAMI et al., 2018; PRIBUL et al., 2017). O advento da era da biologia molecular na década de 1950 e o posterior surgimento de novas tecnologias, teve impactos altamente positivos em quase todas as áreas da biologia e revolucionou o estudo das ciências veterinárias, particularmente em relação ao diagnóstico de doenças e tipagem genética de patógenos e parasitos. A descoberta da reação em cadeia de polimerase (PCR) em 1985 (SAIKI et al., 1985) e o desenvolvimento do método de Sanger para sequenciamento de DNA na década de 1970 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), foram avanços marcantes que transformaram todos os campos das ciências de vida e agrárias. A importância e relevância da PCR em particular, é em parte devido às melhorias subsequentes (por exemplo, PCR em tempo real) e às modificações para adaptar o método para objetivos diversos, que vão desde sequenciamento de genomas completos à rápida detecção de agentes patogênicos e quantificação de cargas parasitárias e virais. Além disto, graças às melhorias nas técnicas de sequenciamento e a criação de bancos de dados de DNA específicos como, por exemplo o GenBank, o potencial de sequenciamento em grande escala empregando sequências que são filogeneticamente relevantes, resultou na quantificação e caracterização de uma gama de parasitos e patógenos como demonstrado em vários estudos (PEIXOTO et al., 2021; VAN DIJK et al., 2018; EMAMEH et al 2018; JEX; GASSER; SCHWARZ, 2019; LUZ et al., 2017).

A necessidade de estudar a vida selvagem como fonte potencial de patógenos zoonóticos e/ou de parasitos e microrganismos capazes de causar doenças em animais domésticos (principalmente animais de produção), ganhou maior destaque como resultado da pandemia de COVID-19 (PERVEEN; MUZAFFAR; AL-DEEB, 2021; LAWLER; ALLAN; BAXTER, 2021). A ameaça percebida de agentes zoonóticos com potencial pandêmico (especificamente gripe aviária e outros vírus respiratórios, incluindo os coronavírus), foi a principal motivação por trás do renascimento do antigo conceito de saúde única em 2004 (OSTERHAUS et al., 2020). O conceito de saúde única também destacou a necessidade de abordar os riscos associados às doenças emergentes transmitidas por vetores, que mostraram um crescimento explosivo durante o século 21 e representam uma ameaça real e atual à saúde humana e animal em muitas regiões do globo, mas principalmente no mundo em desenvolvimento (FABURAY, 2015; LEAL FILHO et al., 2018; PETERSEN; BEARD; VISSER, 2019). Como foi claramente demonstrado pelo surgimento do SARS-CoV-2 em 2019, a ciência moderna tem a capacidade de responder de forma rápida e eficaz (através do desenvolvimento de testes de diagnóstico, terapias e vacinas) assim que um novo patógeno for identificado (NOWAKOWSKA et al., 2020; DAHLKE et al., 2021). Assim, embora ainda considerado pela OMS como uma ameaça significativa para a humanidade, particularmente as populações não vacinadas do mundo em desenvolvimento, o impacto do SARS-CoV-2 em termos de mortalidade e ruptura econômica foi reduzido, com a transição de pandemia para endemia considerada por especialistas como provável até o final de 2022 (TORJESEN, 2021).

Investimentos na caracterização genética de patógenos potenciais sem considerar os fatores ecológicos só podem esperar fornecer uma percepção limitada e técnica, em vez de holística, do problema das doenças infecciosas e parasitárias emergentes (BONILLA-ALDANA; DHAMA; RODRIGUEZ-MORALES, 2020). Esta importante lição deve ser aprendida, principalmente por pesquisadores localizados em países de baixa e média renda,

incluindo o Brasil, onde a necessidade de desenvolver e conduzir programas de vigilância eficazes para doenças existentes e potenciais é criticamente importante, mas onde os recursos para realizar a pesquisa básica e aplicada necessária para validar esses programas é inadequada (DE VRIES et al., 2021).

A pandemia de COVID-19 demonstrou claramente ao mundo que a ameaça de doenças emergentes, algumas com potencial pandêmico é real e provável de ocorrer com maior frequência como consequência dos impactos negativos exercidos sobre o meio ambiente como resultado de atividades antrópicas (WILKE; BENELLI; BEIER, 2021; LAWLER; ALLAN; BAXTER, 2021). Também ilustrou claramente que o conceito de saúde única pode ser o único caminho viável através do qual a ciência pode tentar desenvolver efetivamente os recursos necessários para se preparar para futuras epidemias e pandemias de origem zoonótica (FERRI; LLOYD-EVANS, 2021; KANAMORI; BABA; WEBER, 2021). Além disso, o COVID-19 revelou que o desenvolvimento de medidas para prever e prevenir futuras pandemias será significativamente mais desafiador do que simplesmente se preparar para lidar com um problema assim que ele surgir (KHOR; HEYMANN, 2021).

A necessidade de programas eficazes e em larga escala para a vigilância de reservatórios de vida selvagem de grupos prioritários de patógenos (por exemplo, gripe aviária) tem sido o cerne das estratégias de preparação empregadas pela OMS durante as duas primeiras décadas do século XXI (HOOD et al., 2021). No entanto, é evidente que esses programas devem ser complementados com investimentos significativos em pesquisa básica, realizada na interface homem-vida selvagem, para fornecer dados sobre os riscos de surgimento de doenças ainda desconhecidas de importância para a saúde humana ou que possam impactar sobre a saúde dos animais de produção, resultando em riscos para a segurança alimentar (SHAW; CATTERUCCIA, 2019; DE THOISY et al., 2021; BROOKS et al., 2021).

As doenças transmitidas por carrapatos que afetam os seres humanos não são um tema prioritário de saúde para a maioria das nações do mundo desenvolvido e são ainda menos nos países em desenvolvimento. No entanto, como foi revelado pelo surgimento e subsequente expansão da doença de Lyme na América do Norte, as doenças transmitidas por carrapatos e originárias da vida selvagem podem se tornar graves problemas de saúde pública (MATTINGLY; SHERE-WOLFE, 2020). Devido à sua importância econômica, as doenças transmitidas por carrapatos que afetam os animais de produção recebem uma parcela substancial do investimento em pesquisa parasitológica na América Latina. Em contraste, com a possível exceção da pesquisa sobre febre maculosa (causada por *Rickettsia rickettsii*), o financiamento disponível para investigar o potencial de surgimento de ameaças à saúde por carrapatos associados a animais selvagens tem sido tradicionalmente muito limitado e prevê-se que seja ainda mais reduzido no mundo pós COVID-19, onde é provável que o financiamento para a vigilância de doenças emergentes de origem zoonótica seja focado na ameaça oferecida pelos vírus respiratórios (FACCINI et al., 2020; CARLSON et al., 2021).

Em resposta a esse dilema, nosso grupo de pesquisa iniciou um plano em 2016, que buscou examinar a possibilidade de desenvolver um método alternativo para complementar a identificação baseada em sequenciamento, de carrapatos associados a animais silvestres (principalmente aves silvestres) no Brasil. A necessidade de desenvolver tal estratégia foi motivada em resposta aos cortes drásticos no financiamento da pesquisa que começaram em 2015 e infelizmente continuam até os dias atuais (MAGNUSSON et al., 2018; ANGELO, 2019; IDROVO; MANRIQUE-HERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ NIÑO, 2021). O impacto dessa crise financeira foi sentido por todos os cientistas brasileiros, mas foi particularmente prejudicial para os pesquisadores que empregaram métodos moleculares em suas investigações. Como resultado da falta de fundos, o uso de sequenciamento para identificação rotineira de carrapatos imaturos foi essencialmente impossibilitado pelos custos envolvidos.

O resultado do nosso esforço de pesquisa foi o desenvolvimento da plataforma “TickCutter”, um sistema “on-line” construído sobre o conceito de inovação frugal (DE ABREU, 2019), que consiste basicamente em encontrar novas aplicações de menor custo para tecnologias existentes como alternativa ao uso de tecnologias novas, mas inacessíveis (HINDOCHA et al., 2021). A tecnologia empregada no sistema “TickCutter” é o PCR-RFLP (método de baixo custo desenvolvido na década de 1990). O método pode processar confortavelmente até 100 amostras por semana a um custo 97% menor do que o uso de serviços de sequenciamento fornecidos por terceiros. A tecnologia é fácil de usar (a plataforma fornece tutoriais) e acessível, pois a maioria dos laboratórios que realizam pesquisas básicas de biologia molecular possuem a infraestrutura necessária para realizar PCR, digestão de restrição de “amplicons” e eletroforese em gel. A análise dos padrões de bandas pode ser realizada manualmente ou usando “software” de bioinformática gratuito (GelAnalyzer). A plataforma é adaptável, sendo a atualização do conjunto de dados simples e pode receber módulos adicionais baseados em alvos moleculares alternativos, conforme demonstrado no projeto atual. Adicionalmente os dados gerados pelos usuários são facilmente transferíveis entre laboratórios. A plataforma também possui a vantagem de não ser necessário a identificação de todas as amostras nas ferramentas, pois é provável que muitas amostras apresentem o mesmo perfil, desse modo identificar apenas um exemplar permitirá identificar todas as amostras com perfil idêntico, reduzindo o tempo para identificação de todas as amostras. Entretanto, no caso de o exemplar necessitar de terceira enzima para sua caracterização é recomendado digerir com terceira enzima todas as amostras com aquele perfil, para confirmar se de fato pertencem à mesma espécie.

A ferramenta de identificação da família Ixodidae baseada em 16S rDNA foi submetida a um extenso processo de validação em 2 etapas, que confirmou seu elevado potencial como método para identificação em nível de espécie (DE ABREU, 2019). No entanto, o sistema não está isento de limitações, algumas das quais estão ligadas a peculiaridades associadas ao uso do gene 16S rDNA como alvo para PCR, mas também porque o conjunto de dados carece da inclusão de perfis de bandas derivados de carrapatos Argasídeos. O objetivo geral do presente trabalho foi encontrar formas de corrigir essas limitações.

A primeira etapa do processo de atualização da ferramenta “TickCutter 16S” foi tecnicamente simples e envolveu a coleta de novas sequências de 16S rDNA depositadas para carrapatos da família Ixodidae no GenBank, seguida da produção de “amplicons” virtuais, digestão *in silico* e inserção dos perfis de bandas no banco de dados da ferramenta. A influência potencial dos novos padrões sobre o poder discriminatório da ferramenta foi posteriormente avaliada. A segunda fase da atualização envolveu as mesmas etapas acima, com exceção da adição ao banco de dados, mas utilizou sequências derivadas de carrapatos da família Argasidae. A decisão de não incluir sequências da família Argasidae na versão original da ferramenta foi motivada pela observação de que relatos de carrapatos moles em associação com aves silvestres no Brasil são extremamente raros. Dessa forma, considerou-se improvável que interferissem na identificação de carrapatos Ixodidae. No entanto, relatórios (RAMOS et al., 2015) da associação de *Ornithodoros mimon* com aves silvestres em diferentes regiões do Brasil questionaram a validade de nossa suposição. Assim, a adaptação da ferramenta para incluir dados de Argasídeos passou a ser considerada essencial, apesar da capacidade de diferenciação das famílias Ixodidae e Argasidae a partir de caracteres morfológicos.

A introdução dos novos padrões de bandas registrados para Ixodidae aumentou o tamanho do banco de dados, sendo este efeito mais notável no caso de espécies do gênero *Ixodes*. Conforme observado em nosso trabalho anterior, os dados de sequenciamento para os membros deste gênero são escassos em comparação com os outros gêneros da família Ixodidae. A descoberta mais significativa da atualização foi a constatação de que a inclusão de novos padrões de bandas não reduziu o poder discriminatório da ferramenta “TickCutter 16S”. No

entanto, um achado secundário importante (que estendeu as observações anteriores) foi o fato de que os perfis de bandas produzidos para espécies do gênero *Ixodes* não foram capazes de diferenciar efetivamente essas espécies, resultado em casos de identificação apenas a nível de gênero. Pesquisas futuras se concentrarão na identificação de potenciais terceiras enzimas capazes de resolver essa limitação. A possibilidade de que o uso de um único alvo (mesmo quando cortado com 2 enzimas) não fosse capaz de produzir identificações definitivas em nível de espécie foi sugerida como uma possível fraqueza potencial (DE ABREU, 2019) e foi a principal motivação para os experimentos realizados com o Marcador COI no projeto atual.

É interessante notar que o valor da PCR-RFLP como um método eficiente e de custo-benefício para o nível de espécie de carrapatos *Haemaphysalis* para ajudar no monitoramento de *Haemaphysalis longicornis* foi relatado em 2020 por pesquisadores dos EUA (THOMPSON et al., 2020). O sistema desenvolvido nesse estudo foi baseado no uso do marcador 16S, (com um sistema envolvendo o uso de COI não sendo completado), cada um digerido com uma única enzima (*DraI* para 16S e *AluI* para COI). Uma diferença notável entre esse estudo e “TickCutter” é observada na escolha de Thompson et al. (2020) em utilizar apenas a enzima *DraI* na digestão de 16S e apenas *AluI* na digestão de COI, enquanto “TickCutter 16S” utiliza *DraI* e *VspI* como enzimas principais e outras enzimas como terciárias (DE ABREU, 2019), com a mesma abordagem sendo observado em “COIsearcher”.

Os resultados da análise realizada com as sequências coletadas de Argasidae demonstraram que a maioria dos perfis de bandas foram únicos e que não impactaram na capacidade da ferramenta “TickCutter” em identificar corretamente os carrapatos Ixodidae. No entanto, seis perfis (incluindo 2 produzidos a partir de *O. mimon*) foram caracterizados como geradores de identificações conflitantes com espécies da família Ixodidae. Como foi sugerido para os carrapatos do gênero *Ixodes*, pesquisas futuras se concentrarão na identificação de enzimas alternativas que poderão resolver os dados conflitantes. Permitindo assim a adição dessa família no banco de dados de “TickCutter 16S”. No entanto, é pertinente observar que uma solução mais simples para este problema poderia ser alcançada através de modificações no protocolo utilizado para a eletroforese (concentração do gel e tempo de corrida) dos “amplicons” 16S produzidos como etapa inicial dos experimentos de digestão *in vitro*, anteriormente à digestão com enzimas de restrição. Neste contexto, os amplicons produzidos a partir dos carrapatos Argasídeos têm tamanho de 470 a 480 pb, enquanto os dos Ixodidae são de 450 a 460 bp. Essa pequena diferença de tamanho seria difícil de detectar usando o protocolo padrão para confirmar a amplificação das amostras, mas seria facilmente visível se usando géis com 2% de agarose e aumentando o tempo de eletroforese para 75 minutos. A inclusão dessas informações será adicionada ao tutorial no site “TickCutter” e será implementada como o novo protocolo padronizado em nosso laboratório.

O componente principal do projeto envolveu a expansão da plataforma “TickCutter” para incluir dados de PCR-RFLP baseados em perfis de bandas gerados pela digestão de “amplicons” de tamanho 709 bp produzidos a partir do gene COI. No entanto, deve-se ressaltar que, conforme explicado na revisão de literatura, esse marcador molecular não tem sido amplamente adotado pelos acarologistas brasileiros, que preferem o marcador 16S rDNA e, quando necessário, utilizam a sequência 12S rDNA como alternativa, por exemplo, nos casos quando a amplificação do marcador primário não for bem sucedida (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2009; NAVA et al., 2010; MARTINS et al., 2019; ONOFRIO et al., 2020). Como resultado dessa distorção, o número de sequências COI depositadas para exemplares brasileiros de Ixodidae é limitado. Da mesma forma, praticamente não há sequências de COI depositadas para as 25 espécies de carrapatos Argasídeos reconhecidas no Brasil.

À luz dessas limitações, o desenvolvimento da nova ferramenta “COIsearcher” foi iniciado com base na análise de 65 padrões de bandas gerados a partir de 281 sequências

depositadas para membros do gênero *Amblyomma* e posteriormente complementado com 23 perfis de bandas derivados da análise de 570 sequências depositadas para outros membros da família Ixodidae. Em comum com a ferramenta “TickCutter 16S”, o novo módulo foi projetado para combinar perfis de bandas, gerados através da digestão *in silico* de “amplicons” virtuais com duas enzimas, neste caso *AluI* e *MboI*.

Apesar de conter um número menor de perfis de bandas, a ferramenta de dupla enzima “COIsearcher” produziu um número maior de identificações conflitantes do que havia sido observado com a ferramenta “TickCutter 16S”. Ainda, é importante destacar que, com exceção de um padrão de *A. ovale* e algumas sequências de *A. longirostre*, o uso de uma terceira enzima foi capaz de superar essa limitação. Apesar de representar um resultado altamente satisfatório, deve-se lembrar que esta análise foi preliminar e limitada a perfis gerados *in silico*. Além disso, há alguns aspectos que devem ser cuidadosamente considerados.

A primeira questão a ser examinada é a composição do banco de dados em termos do número de sequências por espécie, que foram utilizadas para estabelecer o poder discriminatório da ferramenta. Nesse contexto, grande parte das espécies de *Amblyomma* foi representada por apenas uma ou duas sequências, sendo muitas das sequências originárias de outros países que não o Brasil. Em contraste, outras espécies (por exemplo, *A. parvum* e *A. triste*) foram super-representadas no banco de dados de sequências. No entanto, no caso dessas espécies, uma quantidade razoável das sequências foi depositada para exemplos de carrapatos brasileiros (18/49 e 26/51 respectivamente).

Adicionalmente, o uso de sequências originadas de outros países pode afetar negativamente o banco de dados ao introduzir padrões não observados em território brasileiro. Esse fenômeno foi observado com *A. romitii*, em que as duas sequências usadas são de países diferentes (Brasil e Guiana Francesa) e cada uma possui um padrão próprio. Entretanto, devido ao baixo número de sequências depositadas do Brasil, foi tomada a decisão de incluir sequências de outros países considerando a possibilidade de compartilharem padrões com Brasil.

Um fator adicional que não pode ser negligenciado foi o tamanho em pares de bases de muitas das sequências que foram coletadas em bancos de dados públicos. A região flanqueada pelos “primers” LepF e LepR (usados nesse estudo) tem tamanho de 658 pb, com o “amplicon” (incluindo “primers”) tendo um tamanho padrão de 709 pb. As bases de dados GenBank e BOLD recomendam que as sequências sejam depositadas após a remoção das sequências de “primers” e, de fato, apenas uma pequena parte das sequências coletadas incluiu alguns nucleotídeos “extras” derivados dos “primers”. Este erro foi facilmente resolvido pela remoção dos pedaços de “primers” para produzir fragmentos de 658 pb, aos quais as sequências de “primers” LepF e LepR foram introduzidas para produzir “amplicons” virtuais de 709 pb. O mesmo procedimento foi usado com as sequências que foram depositadas como fragmentos de 658 pb. No entanto, devido a variações na qualidade da sequência e/ou uso de “primers” que amplificavam regiões internas aos “primers” LepF/LepR, a maioria das sequências teve tamanho inferior a 658 pb. Como resultado, foi necessário estender essas sequências para 658 bp, para permitir a produção de “amplicons” virtuais. Infelizmente, não foi possível realizar uma análise de polimorfismo entre sequências nas extremidades 3' e 5' e a identificação de sítios reais ou possíveis para as enzimas *AluI* e *MboI* nessas regiões para a maioria das espécies para as quais as sequências COI estavam disponíveis devido ao baixo número de sequências para a espécie e, como tal, a validade dos “amplicons” virtuais pode ser questionada. O exemplo mais extremo disso foi o caso de *A. triste* e, conseqüentemente, de *A. tigrinum*. A maioria das sequências disponíveis para ambas as espécies foi depositada no GenBank como parte de um estudo que examinou a variação genética no complexo *Amblyomma maculatum* (LADO et al., 2018). No entanto, essas sequências foram geradas usando “primers” que flanqueiam uma região de 527 pb (que é interna à região de 658 pb) e, como tal, nenhuma sequência completa

esteve disponível no GenBank para desenvolver um modelo de "preenchimento final". Evidentemente, dado o grande número de sequências, teria sido imprudente simplesmente descartar essa fonte de dados. Felizmente, uma sequência completa (658 pb), produzida a partir de um espécime brasileiro de *A. triste* está disponível no banco de dados do LBioMol e foi usada como molde para produzir sequências virtuais de 658 pb através da adição de 77 nucleotídeos no terminal 5' e 54 nucleotídeos para a extremidade 3' das sequências mais curtas. A adição subsequente das sequências de "primers" resultou na produção de "amplicons" virtuais que foram digeridos com as enzimas *AluI* e *MboI*.

No caso de *A. tigrinum* uma sequência incompleta (KU302505), de 605bp de tamanho, foi gerada por pesquisadores bolivianos usando o "primer" LepF e o "primer" reverso empregado no estudo de Lado et al., (2018). Esta sequência foi completa no terminal 5', mas faltou 54 nucleotídeos no terminal 3'. Na ausência de um fragmento completo (658 pb) para *A. tigrinum*, optou-se por preencher a extremidade 3' com 54 nucleotídeos obtidos da sequência completa de *A. triste*, resultando na construção de um amplicon híbrido. As demais 8 sequências de *A. tigrinum* tem originalmente 527 nucleotídeos de tamanho e foram preenchidas nas extremidades com os primeiros 74 nucleotídeos da sequência boliviana e com os 54 nucleotídeos derivados de *A. triste*. Embora longe de ser ideal, esta estratégia foi considerada de valor dada a escassez de sequências COI.

Um segundo grupo de padrões de bandas que devem ser avaliados com cautela são aqueles que foram depositados como originários de *A. cajennense sensu stricto*. Em um caso a localização geográfica não foi fornecida e no caso das cinco sequências depositadas por pesquisadores do Panamá, as amostras foram depositadas antes a avaliação do complexo *A. cajennense sensu lato* (NAVA et al., 2014). Os achados de Nava et al., demonstraram que a espécie *A. cajennense sensu lato* era de fato um complexo de 6 espécies, cada uma com uma distribuição geográfica específica, em toda a região neotropical. Como resultado, todas as sequências depositadas antes de 2014 foram descritas como originárias de *A. cajennense sensu lato*. Esses achados de Nava et al., 2014 representaram um marco para a acarologia latino-americana e demonstraram muitas das limitações da identificação de carrapatos com base apenas na caracterização morfológica. Assim, ao utilizar sequências depositadas anteriores a 2014, é imprescindível dispor de dados relativos à localização geográfica precisa onde o carrapato foi coletado. Isso é particularmente importante para pesquisadores brasileiros, onde *A. cajennense sensu stricto* e a espécie reinstaurada *A. sculptum* (Nava et al., 2014) apresentam padrões de distribuição distintos em todo o país, com níveis muito limitados de sobreposição em locais altamente específicos (MARTINS et al., 2016). Com base nos dados de Nava et al., (2014), *A. cajennense sensu stricto* não existe no Panamá, mas o membro do complexo encontrado naquele país é a espécie *A. mixtum*. Como sequências de *A. cajennense sensu stricto*, essas possuem um perfil único, o que reforça que provavelmente não sejam de *A. cajennense sensu stricto*, embora não seja uma prova definitiva, uma vez que indivíduos da mesma espécie em regiões diferentes podem sofrer variações ambientais diferentes e apresentar diferença no perfil devido a polimorfismo nas sequências. Com base em uma pesquisa do BLAST, observou-se que as espécies panamenhas apresentaram níveis elevados de similaridade de sequências (98,5 a 99%), com sequências depositadas como *A. mixtum* originárias de Cuba e da Colômbia. Um alto nível de similaridade (99,8%) também foi registrado em comparação com a sequência MT549811, depositada em 2021 por pesquisadores chineses como originária de um espécime *A. cajennense sensu lato* coletado de um hospedeiro animal não identificado durante um processo de quarentena (*A. cajennense sensu lato* é exótico na China, motivo pelo qual essa sequência não foi incluída no presente trabalho) e mais uma vez foi quase certamente identificado erroneamente. Em conjunto, a confusão em torno desse complexo é um problema acadêmico, mas também uma preocupação para a saúde pública e animal, devido ao papel dos membros desse complexo como vetores de uma variedade de parasitos e patógenos.

Quando observado objetivamente, fica evidente que o maior obstáculo para o desenvolvimento de programas eficazes de vigilância molecular para carrapatos na América Latina são as limitações, tanto quantitativas quanto qualitativas, nos conjuntos de dados de sequências existentes. No entanto, resolver isso exigirá investimento sustentável em projetos de sequenciamento em um momento em que o financiamento para ciência está em um nível historicamente baixo.

Um componente chave de qualquer método de detecção/vigilância é a validação. A ferramenta “TickCutter 16S” foi validada usando padrões de bandas gerados *in vitro* (separados em géis de agarose), obtidos de “amplicons” 16S (principalmente de espécies de *Amblyomma* coletadas de aves selvagens). O processo de validação foi executado em duas etapas, primeiramente os “amplicons” previamente sequenciados foram digeridos *in vitro* e os padrões de bandas resultantes foram identificados para confirmar a precisão e reprodutibilidade dos protocolos de análise. Na segunda etapa, o processo foi invertido e os “amplicons” foram identificados com base nos padrões de bandas antes de serem identificados via sequenciamento (DE ABREU, 2019).

Infelizmente, devido às limitações impostas em resposta à pandemia de COVID-19, não foi possível realizar uma validação profunda da ferramenta “COIsearcher” usando a abordagem descrita acima. No entanto, alguns pontos interessantes surgiram da limitada experimentação *in vitro* que foi realizada no presente estudo. Em primeiro lugar, parte das amostras testadas *in vitro* (identificadas pelo sequenciamento de 16S rDNA) produziram os padrões de bandas previstos e foram identificados corretamente pela nova ferramenta. Em segundo lugar, o uso de marcadores de peso molecular comercialmente disponíveis como bandas de referência não forneceu o grau de precisão necessário para garantir identificações precisas em nível de espécie. Observações semelhantes foram registradas durante o desenvolvimento do módulo “TickCutter 16S” (DE ABREU, 2019). Uma solução para esse problema foi encontrada na utilização de bandas de tamanho conhecido geradas a partir de amplicons COI que foram sequenciados.

Um terceiro resultado, e totalmente esperado, foi a observação de perfis de bandas detectados *in vitro* para algumas espécies (por exemplo, *A. brasiliense*) que divergiram dos padrões registrados para essas espécies com base na análise *in silico* de amplicons virtuais. Um problema que, em outras situações, seria facilmente contornado pelo sequenciamento da amostra. De acordo com as recomendações incluídas no módulo “TickCutter 16S” e posteriormente no módulo “COIsearcher”, amostras geradoras de padrões de bandas não presentes no conjunto de dados devem ser sequenciadas e enviadas para a equipe da plataforma para inclusão no conjunto de dados. Neste contexto, a obrigatoriedade de atualização constante da base de dados da plataforma “TickCutter” e a avaliação dos possíveis impactos dessas atualizações representam uma das características mais fortes do sistema.

Apesar das inúmeras dificuldades associadas à execução de um projeto de investigação no decurso de uma pandemia global, sem acesso a um laboratório, os dados gerados foram considerados extremamente relevantes e sem dúvida contribuirão para o objetivo a longo prazo de melhoria da plataforma “TickCutter”. Em primeiro lugar, a expansão do módulo 16S com novas sequências para Ixodidae confirmou a robustez do sistema, mas ao mesmo tempo destacou a potencial fragilidade de um sistema onde um único polimorfismo pode alterar a validade de uma identificação em nível de espécie. Como na maioria das pesquisas, muitas vezes são os dados que não correspondem completamente aos resultados hipotéticos que servem de motivação para elucidar as causas dos dados conflitantes e desenvolver soluções. Espera-se que a capacidade de examinar os dados divergentes em estudos futuros servirá para fornecer as soluções necessárias para validar totalmente o sistema.

É importante afirmar que a plataforma “TickCutter” não foi desenvolvida como meio de erradicar completamente o uso de identificação baseada em sequência, sua própria existência e melhorias contínuas dependem de sequências. Tampouco foi intenção utilizar a plataforma

como substituto da caracterização morfológica. Nesse contexto, todos os carrapatos utilizados nos estudos *in vitro* foram inicialmente identificados morfolologicamente em nível de gênero e no caso de adultos em nível de espécie.

A ferramenta “COIsearcher” mostra-se significativamente promissora como método complementar para identificação de carrapatos em nível de espécie em situações em que a análise de sequências de 16S não é possível ou inconclusiva. A principal limitação do sistema é a falta de um conjunto de dados robusto de amplicons completos (658 pb) e o pequeno número de sequências que foram depositadas por pesquisadores brasileiros. Pesquisas futuras devem ter como objetivo reverter essa situação. No entanto, dada a predileção dos pesquisadores brasileiros pelo uso do 16S rDNA como marcador molecular de escolha, e a crise financeira em curso, parece provável que a resolução dessa deficiência não seja produzida em um futuro próximo.

A pandemia de COVID-19 destacou muitas das deficiências na forma como a pesquisa sobre doenças infecciosas emergentes é realizada. Devido a pandemia foi possível constatar que, para serem eficazes, todos os dados sobre a evolução de uma doença endêmica ou pandêmica devem ser disponibilizados de forma livre e completa à comunidade científica. Esses dados devem ser compartilhados, assim como os detalhes de como os dados foram produzidos, e essas informações devem ser disponibilizadas sem a necessidade de aguardar a aprovação dos estudos para publicação por meio do processo tradicional de revisão por pares empregado em publicações científicas. Isso foi claramente exemplificado pelo crescimento exponencial do número de artigos em relação ao COVID-19 que foram produzidos na forma de pre-prints, o que resultou na concretização do conceito de revisão por pares pela comunidade científica em tempo real, como alternativa ao processo lento de revisão por pares tradicional, conduzido ao longo de semanas ou meses por um editor e dois ou três revisores. Por um lado, pode-se argumentar que essa transição será apenas temporária e que nasceu da necessidade de lidar com uma emergência global. Além disso, dificilmente se estenderá na mesma escala a outras áreas de pesquisa, incluindo o estudo de doenças transmitidas por carrapatos. Por outro lado, os benefícios óbvios do compartilhamento de dados provavelmente se tornarão um componente estabelecido da pesquisa sobre doenças emergentes. A plataforma “TickCutter” foi desenvolvida para se tornar uma ferramenta interativa, e as melhorias introduzidas neste estudo contribuirão para o objetivo de longo prazo do nosso grupo de pesquisa, que é estabelecer o uso da tecnologia econômica de PCR-RFLP como um componente central de programas de vigilância, executadas em escala larga, de doenças transmitidas por carrapatos no Brasil.

A parasitologia da fauna silvestre é vista como um tópico altamente relevante, que aborda as ameaças à saúde na interface homem-animal-ecossistema (OTRANTO et al., 2021). No caso específico das doenças parasitárias dos animais silvestres no Brasil, nosso conhecimento sobre a distribuição, bioecologia, interações parasito-hospedeiro e impacto sobre a saúde humana e animal ainda é fragmentado. Para resolver esta situação, nestes tempos de austeridade fiscal, será necessário maximizar o retorno de cada centavo investido. O presente projeto visou fazer exatamente isso, construindo sobre uma plataforma sólida de produção de pesquisa gerada na última década, utilizando infraestrutura e conhecimento adquiridos através de investimentos em ciência pela sociedade brasileira. Em vez de tentar fornecer dados de baixa reprodutibilidade e de difícil validação empregando abordagens “high-tech” que, por motivos de custo, só podem ser aplicadas ao exame de um número limitado de amostras, o estudo tentou fornecer dados reproduzíveis e validados de alta qualidade, gerados através da aplicação de um método molecular “low-tech”.

## 6 CONCLUSÃO

O banco de dados de “TickCutter 16S” foi atualizado com êxito, sem redução da sua capacidade de identificação, o que permitirá a correta identificação a nível de espécie de diversas espécies de ixodídeos brasileiros pela ferramenta “TickCutter 16S”.

A percepção dos problemas de identificação em “TickCutter 16S” causados pela família Argasidae e pelo gênero *Ixodes* irá nortear pesquisas futuras no LBioMol.

Apesar da necessidade de testes posteriores envolvendo um maior número de amostras, o módulo “COIsearcher” se mostrou suficientemente capazes de identificar Ixodídeos brasileiros, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Amblyomma*, esse fator combinado com a expansão para englobamento de outros gêneros de ixodídeos permitirá que “COIsearcher” seja usado como alternativa à ferramenta “TickCutter 16S” em casos de difícil amplificação do alvo 16S rDNA.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AARESTRUP, F. M.; BONTEN, M.; KOOPMANS, M. Pandemics–One Health preparedness for the next. **The Lancet Regional Health-Europe**, v. 9, Out. 2021.

ABOUELHASSAN, E. M.; EL-GAWADY, H. M.; ABDEL-AAL, A. A.; EL-GAYAR, A. K.; ESTEVE-GASSENT, M. D. Comparison of some molecular markers for tick species identification. **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 13, n. 2, p. 153–164, Jun. 2019.

ADRION, E. R.; AUCOTT, J.; LEMKE, K. W.; WEINER, J. P. Health care costs, utilization and patterns of care following Lyme disease. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. 1-14, Fev. 2015.

ALMAZÁN, M. C.; COPA, G. N.; LAUTHIER, J. J.; GIL, J. F.; QUIROGA, I. L.; HOYOS, C. L.; FERNÁNDEZ, M. E.; NASSER, J. R.; KORENAGA, M.; MARCO, J. D.; BARROSO, P. A. Sand fly typing: A simple and morphologically-supported method based on polymorphism of 18S rRNA gene in a Leishmaniasis endemic area of Argentina. **Acta Tropica**, v. 211, Nov. 2020.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Out. 1990.

ANGELO, C. Brazil's government freezes nearly half of its science spending. **Nature**, v. 568, n. 7751, p. 155-157, Abr. 2019.

ARSHAD, M. I.; KHAN, H. A.; ASLAM, B.; KHAN, J. A. Appraisal of One Health approach amid COVID-19 and zoonotic pandemics: insights for policy decision. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 1-2, Mar. 2021.

BARBIERI, A. R. M.; SZABÓ, M. P. J.; COSTA, F. B.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; PASCOLI, G.; TORGA, K.; SARAIVA, D. G.; RAMOSA, V. N.; OSAVA, C.; GERARDI, M.; DIAS, R. A.; MORAES JÚNIOR, E. A.; FERREIRA, F.; CASTRO, M. B.; MARCELO B. LABRUNA, M. B. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 442–453, Fev. 2019.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox, 2006. p. 1-239.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 268, 2015.

BEEBE, N. W. DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 622-633, Abr. 2018.

BERMÚDEZ, S.; DOMÍNGUEZ, L.; TROYO, A.; VENZAL, J. M. Ticks infesting humans in Central America: A review of their relevance in public health. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 2. 2022.

BINETRUY, F.; CHEVILLON, C.; DE THOISY, B.; GARNIER, S.; DURON, O. Survey of ticks in French Guiana. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 1, p. 77-85, Jan. 2019.

BINETRUY, F.; BUYSSE, M.; LEJARRE, Q.; BAROSI, R.; VILLA, M.; RAHOLA, N.; PAUPY, C.; AYALA, D.; DURON, O. Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. **Molecular ecology**, v. 29, n. 5, p. 1016-1029, Mar. 2020.

BISANZIO, D.; FERNÁNDEZ, M. P.; MARTELLO, E.; REITHINGER, R.; DIUK-WASSER, M. A. Current and future spatiotemporal patterns of Lyme disease reporting in the Northeastern United States. **JAMA network open**, v. 3, n. 3, Mar. 2020.

BITENCOURTH, K.; AMORIM, M.; DE OLIVEIRA, S. V.; VOLOCH, C. M.; GAZÊTA, G. S. Genetic diversity, population structure and rickettsias in *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 2, p. 256–268, Jun. 2019.

BONILLA-ALDANA, D. K.; DHAMA, K.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Revisiting the one health approach in the context of COVID-19: a look into the ecology of this emerging disease. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 8, n. 3, p. 234-237, Jan. 2020.

BORSOI, A. B.; BITENCOURTH, K.; DE OLIVEIRA, S. V.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. Human parasitism by *Amblyomma parkeri* ticks infected with *Candidatus* Rickettsia paranaensis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, Dez. 2019.

BOWSHER, G.; MCNAMARA, T.; BERNARD, R.; SULLIVAN, R. Veterinary intelligence: integrating zoonotic threats into global health security. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 114, n. 12, p. 545-548, Dez. 2021.

BRETTSCHNEIDER, R. RFLP analysis. *In*: KARP, A.; ISAAC, P. G.; INGRAM, D. S. **Molecular tools for screening biodiversity**. Springer, 1998. p. 85-95.

BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P.; BOEGER, W. A.; TRIVELLONE, V. Emerging infectious disease: an underappreciated area of strategic concern for food security. **Transboundary and Emerging Diseases**, Fev. 2021.

BUCZEK, A.; BUCZEK, W. Importation of ticks on companion animals and the risk of spread of tick-borne diseases to non-endemic regions in Europe. **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1-15, Jan. 2021.

BUDDHACHAT, K.; MEEROD, T.; PRADIT, W.; SIENGDEE, P.; CHOMDEJ, S.; NGANVONGPANIT, K. Simultaneous differential detection of canine blood parasites: Multiplex high-resolution melting analysis (mHRM). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 3, Maio. 2020.

BURGDORFER, W.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; BENACH, J. L.; GRUNWALDT, E.; DAVIS, J. P. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis?. **Science**, v. 216, n. 4552, p. 1317-1319, Jun. 1982.

BURIAN, A. N.; ZHAO, W.; LO, T. W.; THURTLER-SCHMIDT, D. M. Genome sequencing guide: an introductory toolbox to whole-genome analysis methods. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 5, p. 815-825, Set. 2021.

CALVANO, M. P.; BRUMATTI, R. C.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; MARTINS, K. R.; ANDREOTTI, R. Bioeconomic simulation of *Rhipicephalus microplus* infestation in different beef cattle production systems in the Brazilian Cerrado. **Agricultural Systems**, v. 194, Dez. 2021.

CARLSON, C. J.; FARRELL, M. J.; GRANGE, Z.; HAN, B. A.; MOLLENTZE, N.; PHELAN, A. L.; RASMUSSEN, A. L.; ALBERY, G. F.; BETT, B.; BRETT-MAJOR, D. M.; COHEN, L. E. The future of zoonotic risk prediction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1837, Nov. 2021.

CHARLES, R. A.; BERMÚDEZ, S.; BANOVIĆ, P.; ALVAREZ, D. O.; DÍAZ-SÁNCHEZ, A. A.; CORONA-GONZÁLEZ, B.; ETTER, E. M.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, I.; GHAFAR, A.; JABBAR, A.; MOUTAILLER, S. Ticks and tick-borne diseases in Central America and the Caribbean: A one health Perspective. **Pathogens**, v. 10, p. 1-22, Out. 2021.

CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; SAYERS, E. W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D67-D72, Jan. 2016.

COCCIA, M. Preparedness of countries to face COVID-19 pandemic crisis: Strategic positioning and factors supporting effective strategies of prevention of pandemic threats. **Environmental Research**, v. 203, Jan. 2022.

CUTLER, S. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; ESTRADA-PEÑA, A.; POTKONJAK, A.; MIHALCA, A. D.; ZELLER, H. Tick-borne diseases and co-infection: current considerations. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 1, Jan. 2021.

DAHLKE, J.; BOGNER, K.; BECKER, M.; SCHLAILE, M. P.; PYKA, A.; EBERSBERGER, B. Crisis-driven innovation and fundamental human needs: A typological framework of rapid-response COVID-19 innovations. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 169, Ago. 2021.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, n. 1, p. 30-46, Jun. 2009.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, Out. 2012a.

DANTAS-TORRES, F.; ALÉSSIO, F. M.; SIQUEIRA, D. B.; MAUFFREY, J.; MARVULO, M. F. V.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 83-91, Jan. 2012b

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**, v. 10, n. 6, Out. 2019.

DE ABREU, D. P. B. **Inovação Frugal Aplicada ao Desenvolvimento de Recursos Moleculares para o Estudo Bioecológico de Carrapatos Ixodídeos e Bactérias *Rickettsia* spp. Associadas em Território Brasileiro**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

DE ABREU, D. P. B.; PEIXOTO, M. P.; LUZ, H. R.; ZERINGOTA, V.; SANTOLIN, Í. D.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 6, Out. 2019.

DE LA FUENTE, J.; ANTUNES, S.; BONNET, S.; CABEZAS-CRUZ, A.; DOMINGOS, A. G.; ESTRADA-PEÑA, A.; JOHNSON, N.; KOCAN, K. M.; MANSFIELD, K. L.; NIJHOF, A. M.; PAPA, A.; RUDENKO, N.; VILLAR, M.; ALBERDI, P.; TORINA, A.; AYLLÓN, N.; VANCOVA, M.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; CARACAPPA, S.; FOOKS, A. R.; GORTAZAR, C.; REGO, R. O. M. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 7–8, p. 401–409, Abr. 2017.

DE THOISY, B.; DURON, O.; EPELBOIN, L.; MUSSET, L.; QUÉNEL, P.; ROCHE, B.; BINETRUY, F.; BRIOLANT, S.; CARVALHO, L.; CHAVY, A.; COUPPIÉ, P. Ecology, evolution, and epidemiology of zoonotic and vector-borne infectious diseases in French Guiana: Transdisciplinarity does matter to tackle new emerging threats. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, Set. 2021.

DE VRIES, L.; KOOPMANS, M.; MORTON, A.; VAN BAAL, P. The economics of improving global infectious disease surveillance. **BMJ Global Health**, v. 6, n. 9, Set. 2021.

DEROCLES, S. A.; BOHAN, D. A.; DUMBRELL, A. J.; KITSON, J. J.; MASSOL, F.; PAUVERT, C.; PLANTEGENEST, M.; VACHER, C.; EVANS, D. M. Biomonitoring for the 21st century: integrating next-generation sequencing into ecological network analysis. **Advances in ecological research**, v. 58, p. 1-62, Jan. 2018.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOETSCH, G.; BOISSIER, J.; DARRIET, F.; DUBOZ, P.; FRITSCH, C.; GIRAUDOUX, P.; LE ROUX, F.; MORAND, S.; PAILLARD, C. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. **Frontiers in veterinary Sciences**, v. 5, p. 1-13, Fev. 2018.

D'HUMIÈRES, C.; SALMONA, M.; DELLIÈRE, S.; LEO, S.; RODRIGUEZ, C.; ANGBAULT, C.; ALANIO, A.; FOURATI, S.; LAZAREVIC, V.; WOERTHER, P. L.; SCHRENZEL, J. The potential role of clinical metagenomics in infectious diseases: Therapeutic perspectives. **Drugs**, v. 81, n. 13, p. 1453-1466, Set. 2021.

DIAS, T. C.; STABACH, J. A.; HUANG, Q.; LABRUNA, M. B.; LEIMGRUBER, P.; FERRAZ, K. M.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; CORREA, L. R. Habitat selection in natural and human-modified landscapes by capybaras (*Hydrochoerus*

*hydrochaeris*), an important host for *Amblyomma sculptum* ticks. **PloS one**, v. 15, n. 8, Ago. 2020.

EDDENS, T.; KAPLAN, D. J.; ANDERSON, A. J.; NOWALK, A. J.; CAMPFIELD, B. T. Insights from the geographic spread of the Lyme disease epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 3, p. 426-434, Jan. 2019.

EMAMEH, R. Z.; PURMONEN, S.; SUKURA, A.; PARKKILA, S. Surveillance and diagnosis of zoonotic foodborne parasites. **Food science & nutrition**, v. 6, n. 1, p. 3-17, Jan. 2018.

ENGEL, M. S.; CERÍACO, L. M.; DANIEL, G. M.; DELLAPÉ, P. M.; LÖBL, I.; MARINOV, M.; REIS, R. E.; YOUNG, M. T.; DUBOIS, A.; AGARWAL, I.; LEHMANN, A. P. The taxonomic impediment: a shortage of taxonomists, not the lack of technical approaches. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 193, n. 2, p. 381-387, Out. 2021.

ESPINAZE, M. P.; HELLARD, E.; HORAK, I. G.; CUMMING, G. S. Domestic mammals facilitate tick-borne pathogen transmission networks in South African wildlife. **Biological Conservation**, v. 221, p. 228-236, Maio. 2018.

ESTEVE-GASSENT, M. D.; CASTRO-ARELLANO, I.; FERIA-ARROYO, T. P.; PATINO, R.; LI, A. Y.; MEDINA, R. F.; DE LEÓN, A. A. P.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Translating ecology, physiology, biochemistry, and population genetics research to meet the challenge of tick and tick-borne diseases in North America. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 92, n. 1, p. 1-30, Maio. 2016.

ESTRADA-PEÑA, A.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. Functional Redundancy and Ecological Innovation Shape the Circulation of Tick-Transmitted Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–11, Maio. 2017.

FABURAY, B. The case for a ‘one health’ approach to combating vector-borne diseases. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. 1, Jan. 2015.

FACCINI, J. L. H.; LUZ, H. R.; MCINTOSH, D.; LABRUNA, M. B. Tick-borne rickettsioses in Brazil: what lessons can be learned from the COVID-19 pandemic. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, Jul. 2020.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; KRAWCZAK, F. D.; OLIVEIRA, S. V.; LABRUNA, M. B.; ANGERAMI, R. N. Rickettsioses in Brazil: distinct diseases and new paradigms for epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1-2, Fev. 2021.

FECCHIO, A.; MARTINS, T. F.; BELL, J. A.; GABRIEL, M.; PINHO, J. B.; WECKSTEIN, J. D.; TKACH, V. V.; LABRUNA, M. B.; DIAS, R. I. Low host specificity and lack of parasite avoidance by immature ticks in Brazilian birds. **Parasitology research**, v. 119, n. 7, p. 2039-2045, Jul. 2020.

FERRI, M.; LLOYD-EVANS, M. The contribution of veterinary public health to the management of the COVID-19 pandemic from a One Health perspective. **One Health**, v. 12, Jun. 2021.

FILIFE, D.; PARREIRA, R.; PEREIRA, A.; GALVÃO, N.; CRISTÓVÃO, J. M.; NUNES, M.; VIEIRA, M. L.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Preliminary comparative analysis of the resolving power of *COX1* and *16S-rDNA* as molecular markers for the identification of ticks from Portugal. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, Abr. 2021.

FRISCHTAK, C. R. Science and innovation in Brazil: Where to now? 1. In: REYNOLDS, E. B.; SCHNEIDER, B. R.; ZYLBERBERG, E. **Innovation in Brazil**. Routledge, 2019. p. 93-119.

FRYXELL, R. T. T.; VOGT, J. T. Collaborative-tick surveillance works: an academic and government partnership for tick surveillance in the Southeastern United States (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 56, n. 5, p. 1411-1419, Set. 2019.

GENE CODES. **Sequencher**. Versão 5.4.6. Michigan, c2017. website Gene Codes. disponível em: <https://www.genecodes.com/>. Acesso em: 4 nov. 2021.

GHOSH, P. N.; FISHER, M. C.; BATES, K. A. Diagnosing emerging fungal threats: A one health perspective. **Frontiers in genetics**, v. 9, Set. 2018.

GILBERT, L. The impacts of climate change on ticks and tick-borne disease risk. **Annual Review of Entomology**, v. 66, p. 373-388, Jan. 2021.

GRENINGER, A. L. The challenge of diagnostic metagenomics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 18, n. 7, p. 605-615, Jul. 2018.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, Abr. 2014.

GRUETZMACHER, K.; KARESH, W. B.; AMUASI, J. H.; ARSHAD, A.; FARLOW, A.; GABRYSCH, S.; JETZKOWITZ, J.; LIEBERMAN, S.; PALMER, C.; WINKLER, A. S.; WALZER, C. The Berlin principles on one health – Bridging global health and conservation. **Science of The Total Environment**, v. 764, Abr. 2021.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273-288, Maio. 2003.

GUTIERREZ, M. A.; LOPEZ, R. O.; RAMOS, A. T.; VÉLEZ, I. D.; GOMEZ, R. V.; ARRIVILLAGA, J.; URIBE, S. DNA barcoding of *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae), suggests the existence of 8 candidate species. **Acta Tropica**, v. 221, Set. 2021.

GUZMAN, M.; OCAMPO, J. A.; STIGLITZ, J. E. Real exchange rate policies for economic development. **World Development**, v. 110, p. 51-62, Out. 2018.

Hajibabaei, M.; Janzen, D. H.; Burns, J. M.; Hallwachs, W.; Hebert, P. D. N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **PNAS**, v. 103, n. 4, p. 968-971, Jan. 2006.

Hassell, J. M.; Begon, M.; Ward, M. J.; Fèvre, E. M. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface. **Trends in ecology & evolution**, v. 32, n. 1, p. 55-67, Jan. 2017.

Hemming-Schroeder, E.; Lo, E.; Salazar, C.; Puente, S.; Yan, G. Landscape genetics: A toolbox for studying vector-borne diseases. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 1-11, Mar. 2018.

Herbert, P. D.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; Dewaard, J. R. DNA barcoding and diagnostic characters. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 275, p. 237-247, 2003.

Hindocha, C. N.; Antonacci, G.; Barlow, J.; Harris, M. Defining frugal innovation: a critical review. **BMJ Innovation**, Oct. 2021.

Holm, A.; Hill, R.; Farsang, A.; Jungbäck, C. Diagnostics in the veterinary field: The role in health surveillance and disease identification. **Biologicals**, v. 61, p. 80-84, Set. 2019.

Hood, G.; Roche, X.; Brioude, A.; Von Dobschuetz, S.; Fasina, F. O.; Kalpravidh, W.; Makonnen, Y.; Lubroth, J.; Sims, L. A literature review of the use of environmental sampling in the surveillance of avian influenza viruses. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 1, p. 110-126, Jan. 2021.

Horta, M. C.; Pinter, A.; Schumaker, T. T. S.; Labruna, M. B. Natural Infection, Transovarial Transmission, and Transstadial Survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 285–290, Oct. 2006.

Horton, S.; Sullivan, R.; Flanigan, J.; Fleming, K. A.; Kuti, M. A.; Looi, L. M.; Pai, S. A.; Lawler, M. Delivering modern, high-quality, affordable pathology and laboratory medicine to low-income and middle-income countries: a call to action. **The Lancet**, v. 391, n. 10133, p. 1953-1964, Maio. 2018.

Hotez, P. J. Chapter Two - Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. **Advances in parasitology**, v. 100, p. 29-38, Jan. 2018.

Howson, E. L.; Soldan, A.; Webster, K.; Beer, M.; Zientara, S.; Belák, S.; Sanchez-Vizcaino, J. M.; Van Borm, S.; King, D. P.; Fowler, V. L. Technological advances in veterinary diagnostics: opportunities to deploy rapid decentralised tests to detect pathogens affecting livestock. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 36, n. 2, p. 479-498, Ago. 2017.

Hurtado, O. J.; Giraldo-Ríos, C. Economic and health impact of the ticks in production animals. **Ticks and Tick-Borne Pathogens**, p. 1-9, Nov. 2018.

IDROVO, A. J.; MANRIQUE-HERNÁNDEZ, E. F.; FERNÁNDEZ NIÑO, J. A. Report from Bolsonaro's Brazil: The consequences of ignoring science. **International Journal of Health Services**, v. 51, n. 1, p. 31-36, Jan. 2021.

IGAWA, T.; TAKAHARA, T.; LAU, Q.; KOMAKI, S. An application of PCR-RFLP species identification assay for environmental DNA detection. **PeerJ**, v. 7, p. 1-13, Out. 2019.

JEGATHISAWARAN, J.; TSIPLOVA, K.; HAYEEMS, R.; UNGAR, W. J. Determining accurate costs for genomic sequencing technologies—a necessary prerequisite. **Journal of community genetics**, v. 11, n. 2, p. 235-238, Abr. 2020.

JENKINS, E. J.; SIMON, A.; BACHAND, N.; STEPHEN, C. Wildlife parasites in a One Health world. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 174-180, Maio. 2015.

JEX, A. R.; GASSER, R. B.; SCHWARZ, E. M. Transcriptomic resources for parasitic nematodes of veterinary importance. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 1, p. 72-84, Jan. 2019.

KADING, R. C.; GOLNAR, A. J.; HAMER, S. A.; HAMER, G. L. Advanced surveillance and preparedness to meet a new era of invasive vectors and emerging vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, Out. 2018.

KANAMORI, H.; BABA, H.; WEBER, D. J. Rethinking One Health approach in the challenging era of COVID-19 pandemic and natural disasters. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 11, n. 1, Jan. 2021.

KASHKYNBAYEV, A.; KOPTLEUOVA, D. Global dynamics of tick-borne diseases. **Mathematical Biosciences and Engineering**, v. 17, n. 4, p. 4064-4079, Jun. 2020.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; SEKI, C.; FURUMOTO, H.; MARTINI-ROBLES, L.; MUZZIO, J.; CALVOPÍÑA, M.; VELEZ, L.; KUBO, M.; TABBABI, A.; YAMAMOTO, D. S. PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, Maio. 2019.

KHAN, M. Z.; ZAHOOR, M. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 3, n. 2, Jun. 2018.

KHOR, S. K.; HEYMAN, D. L. Pandemic preparedness in the 21st century: which way forward?. **The Lancet Public Health**, v. 6, n. 6, p. 357-358, Jun. 2021.

KIM, D. W.; CHA, C. J. Antibiotic resistance from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 3, p. 301-309, Mar. 2021.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28-37, Jan. 2015.

KRAWCZAK, F. S.; MUÑOZ-LEAL, S.; GUZTZAZKY, A. C.; OLIVEIRA, S. V.; SANTOS, F. C. P.; ANGERAMI, R. N.; MORAES-FILHO, J.; DE SOUZA JÚNIOR, J. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551–553, Set. 2016.

KRECEK, R. C.; RABINOWITZ, P. M.; CONRAD, P. A. Demystifying and demonstrating the value of a One Health approach to parasitological challenges. **Veterinary Parasitology**, v. 287, Nov. 2020.

KUGELER, K. J.; SCHWARTZ, A. M.; DELOREY, M. J.; MEAD, P. S.; HINCKLEY, A. F. Estimating the frequency of Lyme disease diagnoses, United States, 2010–2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 616-619, Fev. 2021.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, Jun. 2018.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n.6, p. 1073–1081, Nov. 2004.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E. P. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-35, 2005a.

LABRUNA, M. B.; KEIRANS, J. E.; CAMARGO, L. M. A.; RIBEIRO, A. F.; SOARES, R. M.; CAMARGO, E. P. *Amblyomma latepunctatum*, a valid tick species (acari: ixodidae) long misidentified with both *Amblyomma incisum* and *Amblyomma scalpturatum*. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 527–541, Jul. 2005b.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of Sao Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869–873, Fev. 2007.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156–166, Jun. 2009a.

LABRUNA, M. B.; ONOFRIO, V. C.; BEATI, L.; ARZUA, M.; BERTOLA, P. B.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Redescription of the female, description of the male, and several new records of *Amblyomma parkeri* (Acari: Ixodidae), a South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, n. 3, p. 243-260, Nov. 2009b.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER, A. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829–834, Maio. 2011a.

LABRUNA, M. B.; MATTAR V, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; DE SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011b.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R. M.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 511, Set. 2016.

LABRUNA, M. B.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; GIANIZELLA, S. L.; VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A. Synonymy of *Ixodes aragaoi* with *Ixodes fuscipes*, and reinstatement of *Ixodes spinosus* (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 2, Mar. 2020.

LADO, P.; NAVA, S.; MENDOZA-URIBE, L.; CACERES, A. G.; DELGADO-DE LA MORA, J.; LICONA-ENRIQUEZ, J. D.; DELGADO-DE LA MORA, D.; LABRUNA, M. B.; DURDEN, L. A.; ALLERDICE, M. E.; PADDOCK, C. D. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: phenotypic plasticity or incipient speciation?. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-22, Dez. 2018.

LAMATTINA, D.; VENZAL, J. M.; TARRAGONA, E. L.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. *Amblyomma yucumense* Krawczak, Martins & Labruna, 2015 (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 5, p. 799-802, Maio. 2018.

LAWLER, O. K.; ALLAN, H. L.; BAXTER, P. W.; CASTAGNINO, R.; TOR, M. C.; DANN, L. E.; HUNGERFORD, J.; KARMACHARYA, D.; LLOYD, T. J.; LÓPEZ-JARA, M. J.; MASSIE, G. N. The COVID-19 pandemic is intricately linked to biodiversity loss and ecosystem health. **The Lancet Planetary Health**, v. 5, n. 11, p. 840-850, Nov. 2021.

LAZAR JUNIOR, I.; LAZAR, I. **GelAnalyzer**. Versão 2010a. [2010?]. website Gel Analyzer. disponível em: <http://gelanalyzer.com/index.html>. Acesso em: 4 nov. 2021.

LEAL FILHO, W.; BÖNECKE, J.; SPIELMANN, H.; AZEITEIRO, U. M.; ALVES, F.; DE CARVALHO, M. L.; NAGY, G. J. Climate change and health: An analysis of causal relations on the spread of vector-borne diseases in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 177, p. 589-596, Mar. 2018.

LEMES, L.; DE ANDRADE, A. F.; LOYOLA, R. Spatial priorities for agricultural development in the Brazilian Cerrado: may economy and conservation coexist?. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 5, p. 1683- 1700, Abr. 2020.

LEVI, T.; KILPATRICK, A. M.; MANGEL, M.; WILMERS, C. C. Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. 10942-10947, Jul. 2012.

LU, M.; WANG, X.; YE, H.; WANG, H.; QIU, S.; ZHANG, H.; LIU, Y.; LUO, J.; FENG, J. Does public fear that bats spread COVID-19 jeopardize bat conservation?. **Biological conservation**, v. 254, Fev. 2021.

LUGARINI, C.; MARTINS, T. F.; OGRZEWSKA, M.; DE VASCONCELOS, N. C. T.; ELLIS, V. A.; DE OLIVEIRA, J. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Rickettsial agents in avian ixodid ticks in northeast Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 364–375, Abr. 2015.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; LANDULFO, G. A.; BERTO, B. P.; FERREIRA, I. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 89–99, Set. 2012.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 657–665, 2017.

LUZ, H. R.; FURUSAWA, G. P.; FLAUSINO, W.; MCINTOSH, D.; FACCINI, J. L. H. A proposed description of the natural life cycle of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) in a primary Atlantic rainforest environment in Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 6, p. 1138, 2018a.

LUZ, H. R.; SILVA-SANTOS, E.; COSTA-CAMPOS, C. E.; ACOSTA, I.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; MCINTOSH, D.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing toads (*Rhinella marina*) in the northern Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 75, n. 3, p. 309–318, Jul. 2018b.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, T.; FENG, C.; JIA, G.; LIN, X. Development of a DNA barcoding system for the Ixodida (Acari: Ixodida). **Mitochondrial DNA**, v. 25, n. 2, p. 142–149, Abr. 2014a.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; JIA, G.; DENG, J.; WANG, C.; WANG, Q.; MEI, L.; XIANGMEI LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–11, Mar. 2014b.

MACDONALD, A. J.; LARSEN, A. E.; PLANTINGA, A. J. Missing the people for the trees: Identifying coupled natural–human system feedbacks driving the ecology of Lyme disease. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 2, p. 354–364, Fev. 2019.

MACHALABA, C.; UHART, M.; RYSER-DEGIORGIS, M. P.; KARESH, W. B. Gaps in health security related to wildlife and environment affecting pandemic prevention and preparedness, 2007–2020. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 99, n. 5, p. 342–350, Maio. 2021.

MADER, E. M.; GANSER, C.; GEIGER, A.; HARRINGTON, L. C.; FOLEY, J.; SMITH, R. L.; MATEUS-PINILLA, N.; TEEL, P. D.; EISEN, R. J. A survey of tick surveillance and control practices in the United States. **Journal of medical entomology**, v. 58, n. 4, p. 1503–1512, Jul. 2021.

MAGNARELLI, L. A. Global importance of ticks and associated infectious disease agents. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 5, p. 33–37, Mar. 2009.

MAGNUSSON, W. E.; GRELE, C. E.; MARQUES, M.; ROCHA, C. F.; DIAS, B.; FONTANA, C. S.; BERGALLO, H.; OVERBECK, G. E.; VALE, M. M.; TOMAS, W. M.; CERQUEIRA, R. Effects of Brazil's political crisis on the science needed for biodiversity conservation. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, Out. 2018.

MALLA, M. A.; DUBEY, A.; KUMAR, A.; YADAV, S.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 9, Jan. 2019.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, Jun. 2010.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKAC, R. L.; PACHECO, R. DE C.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, Mar. 2016.

MARTINS, T. F.; LUZ H. R.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ, D. G.; MILANELO, L.; MARQUES, S.; SANCHES, T. C.; ONOFRIO, V. C.; DA C. L. ACOSTA, I.; BENATTI, H. R.; MATURANO, R.; DE OLIVEIRA, P. B.; ALBUQUERQUE, G. R.; MARCILI, A.; FLAUSINO, W.; SILVEIRA, L. F.; MCINTOSH, D.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. A new species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) associated with monkeys and passerines of the Atlantic rainforest biome, Southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, Out. 2019.

MATTINGLY, T. J.; SHERE-WOLFE, K. Clinical and economic outcomes evaluated in Lyme disease: a systematic review. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-8, Dez. 2020.

MATURANO, R.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E.; FAZZA, P. O.; BASTOS, R. R. Additional information about tick parasitism in Passeriformes birds in an Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Parasitology research**, v. 114, n. 11, p. 4181-4193, Nov. 2015.

MCINTOSH, D.; BEZERRA, R. A.; LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; GAIOTTO, F. A.; GINÉ, G. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 879-883, Jul. 2015.

MICHALON, J. Accounting for One Health: Insights from the social sciences. **Parasite**, v. 27, n. 56, p. 1-10, Nov. 2020.

MIGUEL, D. C.; BRIOSCHI, M. B.; ROSA, L. B.; MINORI, K.; GRAZZIA, N. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect?. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 694-697, Ago. 2021.

MIRÓ, G.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 151-159, Abr. 2018.

MONTANEZ-GONZALEZ, R.; VALLERA, A. C.; CALZETTA, M.; PICHLER, V.; LOVE, R. R.; GUELBEOGO, M. W.; DABIRE, R. K.; POMBI, M.; COSTANTINI, C.; SIMARD, F.; DELLA TORRE, A. A PCR-RFLP method for genotyping of inversion 2Rc in *Anopheles coluzzii*. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, Dez. 2021.

MORITZ, C.; CICERO, C.; GODFRAY, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLoS biology**, v. 2, n. 10, Out. 2004.

MUÑOZ-LEAL, S.; MARTINS, M. M.; NAVA, S.; LANDULFO, G. A.; SIMONS, S. M.; RODRIGUES, V. S.; RAMOS, V. N.; SUZIN, A.; SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros cerradoensis* n. sp. (Acari: Argasidae), a member of the *Ornithodoros talaje* (Guérin-Méneville, 1849) group, parasite of rodents in the Brazilian Savannah. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 5, Set. 2020.

MUÑOZ-LEAL, S.; VENZAL, J. M.; JORGE, F. R.; TEIXEIRA, B. M.; LABRUNA, M. B. A new species of soft tick from dry tropical forests of Brazilian Caatinga. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 5, Set. 2021.

MURGIA, M.; BELL-SAKYI, L.; DE LA FUENTE, J.; KURTTI, T.; MAKEPEACE, B.; MANS, B.; MCCOY, K.; MUNDERLOH, U.; PLANTARD, O.; RISPE, C.; VALLE, M. R. Meeting the challenge of tick-borne disease control: a proposal for 1000 *Ixodes* genomes. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 1, p. 213-218, Jan. 2019.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n. 8, p. 2857-2877, Jan. 2009.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZÁLEZ, E. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, n. 4, p. 335-351, Ago. 2010.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. And *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, Abr. 2014.

NIERI-BASTOS, F. A.; SZABÓ, M. P. J.; PACHECO, R. C.; SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A.; LABRUNA, M. B. Comparative Evaluation of Infected and Noninfected *Amblyomma triste* Ticks with *Rickettsia parkeri*, the Agent of an Emerging Rickettsiosis in the New World. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, Jul. 2013.

NOWAKOWSKA, J.; SOBOCIŃSKA, J.; LEWICKI, M.; LEMAŃSKA, Ż.; RZYMSKI, P. When science goes viral: The research response during three months of the COVID-19 outbreak. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, Set. 2020.

NZELU, C. O.; KATO, H.; PETERS, N. C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, Nov. 2019.

OGDEN, N. H.; MECHAI, S.; MARGOS, G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 1-11, Ago. 2013.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic Forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 770-774, Jul. 2008.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; JENKINS, C. N.; LABRUNA, M. B. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. **EcoHealth**, v. 8, n. 3, p. 320-331, Set. 2011.

OHIOLEI, J. A.; YAN, H. B.; LI, L.; ALVI, M. A.; MUKU, R. J.; WU, Y. D.; ZHANG, N. Z.; LI, W. H.; GUO, A. M.; WANG, X. L.; FU, B. Q. PCR-RFLP assay confirms the existence of different mitochondrial lineages of *Taenia hydatigena* including a possible geographically restricted group. **Transboundary and Emerging Diseases**, Maio. 2021.

OLIVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, W. S.; BRITO, R. S.; LIMA, T. A.; GIANNELLI, A.; CARVALHO, G. A.; RAMOS, R. A. Ectoparasites infesting animals living in close contact with human beings: a real trouble for One Health perspective?. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 1, p. 55-61, Fev. 2021.

ONDREJICKA, D. A.; LOCKE, S. A.; MOREY, K.; BORISENKO, A. V.; HANNER, R. H. Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 12, p. 582-591, Dez. 2014.

ONMAZ, A. C.; BEUTEL, R. G.; SCHNEEBERG, K.; PAVALOIU, A. N.; KOMAREK, A.; VAN DEN HOVEN R. Vectors and vector-borne diseases of horses. **Veterinary research communications**, v. 37, n. 1, p. 65-81, Mar. 2013.

ONOFRIO, V. C.; GUGLIELMONE, A. A.; BARROS-BATTESTI, D. M.; GIANIZELLA, S. L.; MARCILI, A.; QUADROS, R. M.; MARQUES, S.; LABRUNA, M. B. Description of a new species of *Ixodes* (Acari: Ixodidae) and first report of *Ixodes lasallei* and *Ixodes bocatorensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, Jul. 2020.

OSTERHAUS, A. D.; VANLANGENDONCK, C.; BARBESCHI, M.; BRUSCHKE, C. J.; CHRISTENSEN, R.; DASZAK, P.; DE GROOT, F.; DOHERTY, P.; DRURY, P.; GMACZ, S.; HAMILTON, K. Make science evolve into a One Health approach to improve health and security: a white paper. **One Health Outlook**, v. 1, p. 1-32, Dez. 2020.

OTRANTO, D.; STRUBE, C.; XIAO, L. Zoonotic parasites: the One Health challenge. **Parasitology Research**, v. 120, p. 4073 - 4074, Jun. 2021.

PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; SEMEDO, T. B.; MORAIS, D. H.; SOARES, H. S.; MELO, A. L.; MINERVINO, A. H.; BERNARDI, L. F.; ACOSTA, I. D.; COSTA, F. B.; SOUSA, E. D. Richness of hard ticks (Acari: Ixodidae) from Eastern Brazilian Amazonia, state of Pará, Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 47, n. 2, p. 159-169, Fev. 2021.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, Mar. 2001.

PASCUCCI, I.; ANTOGNINI, E.; CANONICO, C.; MONTALBANO, M. G.; NECCI, A.; DI DONATO, A.; MORICONI, M.; MORANDI, B.; MORGANTI, G.; CROTTI, S.; GAVAUDAN, S. One Health Approach to Rickettsiosis: A Five-Year Study on Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks Collected from Humans, Animals and Environment. **Microorganisms**, v. 10, n. 35, p. 1-11, Jan. 2022.

PAULINO, P. G.; CAMILO, T. A.; MOTA JUNIOR, M. A.; SENNE, N. A.; RAMIREZ, O. L.; COSTA, R. L.; MASSARD, C. L.; SANTOS, H. A. New sensitive real-time PCR targeting p28 gene for detection of *Ehrlichia canis* in blood samples from dogs. **Ciência Rural**, v. 51, Jul. 2021.

PECKLE, M.; LUZ, H. R.; LABRUNA, M. B.; SERPA, M. C.; LIMA, S.; MATURANO, R.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Multi-locus phylogenetic analysis groups the New World bacterium *Rickettsia* sp. strain ApPR with the Old World species *R. africae*; proposal of “*Candidatus Rickettsia paranaensis*”. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 6, Out. 2019.

PEIXOTO, M. P.; LUZ, H. R.; DE ABREU, D. P. B.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Detection of *Rickettsia* sp. strain Itinguçú in *Ornithodoros faccinii* (Acari: Argasidae) parasitizing the toad *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 3, Maio. 2021.

PERVEEN, N.; MUZAFFAR, S. B.; AL-DEEB, M. A. Exploring human-animal host interactions and emergence of COVID-19: Evolutionary and ecological dynamics. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1417-1425, Fev. 2021.

PETERSEN, L. R.; BEARD, C. B.; VISSER, S. N. Combatting the increasing threat of vector-borne disease in the United States with a national vector-borne disease prevention and control system. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 2, Fev. 2019.

PLEY, C.; EVANS, M.; LOWE, R.; MONTGOMERY, H.; YACOUB, S. Digital and technological innovation in vector-borne disease surveillance to predict, detect, and control climate-driven outbreaks. **The Lancet Planetary Health**, v. 5, n. 10, Out. 2021.

POGORELOVA, E. V.; EFIMOVA, T. B. Digital transformation of education, science and innovations. *In*: ASHMARINA, S. I.; VOCHOZKA, M.; MANTULENKO, V. V. **Digital Age: Chances, Challenges and Future**. Springer, 2020. p. 54-61.

POLLEY, L.; THOMPSON, A. Parasites and wildlife in a changing world. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 123-124, Abr. 2015.

PRIBUL, B. R.; FESTIVO, M. L.; RODRIGUES, M. S.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, E. C.; DE SOUZA, M.; RODRIGUES, D. D. Characteristics of quinolone resistance in *Salmonella* spp. isolates from the food chain in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, Mar. 2017.

QIU, W. G.; DYKHUIZEN, D. E.; ACOSTA, M. S.; LUFT, B. J. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 833-849, Mar. 2002.

RAHIMI, H. M.; POURHOSSEINGHOLI, M. A.; YADEGAR, A.; MIRJALALI, H.; ZALI, M. R. High-resolution melt curve analysis: A real-time based multipurpose approach for diagnosis and epidemiological investigations of parasitic infections. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 67, Dez. 2019.

RAMOS, D. G.; MELO, A. L.; MARTINS, T. F.; ALVES, A. D.; PACHECO, T. D.; PINTO, L. B.; PINHO, J. B.; LABRUNA, M. B.; DUTRA, V.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Rickettsial infection in ticks from wild birds from Cerrado and the Pantanal region of Mato Grosso, midwestern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 836-842, Set. 2015.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, Maio. 2007.

RECK, J.; SOUZA, U.; SOUZA, G.; KIELING, E.; DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; MICHEL, T.; DOYLE, R.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MARKS, F. Records of ticks on humans in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 5, p. 1296-1301, Jul. 2018.

RIBEIRO, H. S.; PEREIRA, D. F.; MELO-JUNIOR, O.; DA SILVEIRA MARIANO, R. M.; LEITE, J. C.; DA SILVA, A. V.; DE OLIVEIRA, D. S.; GONÇALVES, A. A.; LAIR, D. F.; DOS SANTOS SOARES, I.; SANTOS, T. A. Vaccine approaches applied to controlling dog ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 3, Maio. 2021.

RIZAL, N. S. M.; NEOH, H. M.; RAMLI, R.; HANAFIAH, A.; ABDUL SAMAT, M. N.; TAN, T. L.; WONG, K. K.; NATHAN, S.; CHIENG, S.; SAW, S. H.; KHOR, B. Y. Advantages and limitations of 16S rRNA next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: perspectives from a middle-income country. **Diagnostics**, v. 10, n. 10, Out. 2020.

RIZZOLI, A.; TAGLIAPIETRA, V.; CAGNACCI, F.; MARINI, G.; ARNOLDI, D.; ROSSO, F.; ROSÀ, R. Parasites and wildlife in a changing world: The vector-host-pathogen interaction as a learning case. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 394-401, Ago. 2019.

ROSLIN, T.; SOMERVUO, P.; PENTINSAARI, M.; HEBERT, P. D.; AGDA, J.; AHLROTH, P.; ANTONEN, P.; ASPI, J.; BLAGOEV, G.; BLANCO, S.; CHAN, D. A molecular-based identification resource for the arthropods of Finland. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 2, p. 803-822, Fev. 2022.

ROSTAMI, A.; KARANIS, P.; FALLAHI, S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection**, v. 46, n. 3, p. 303-315, jun. 2018.

RUENCHIT, P. State-of-the-Art Techniques for Diagnosis of Medical Parasites and Arthropods. **Diagnostics**, v. 11, n. 9, Set. 2021.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dez. 1985.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dez. 1977.

SANTOLIN, I. D. A.; FAMADAS, K. M.; MCINTOSH, D. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 2, p. 68-73, Dez. 2013.

SCHULZE, T. L.; JORDAN, R. A.; SCHULZE, C. J.; MIXSON, T.; PAPERIO, M. Relative encounter frequencies and prevalence of selected *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* infections in *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks from central New Jersey. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 450-456, Maio. 2005.

SHAIKEVICH, E.; BOGACHEVA, A.; GANUSHKINA, L. *Dirofilaria* and *Wolbachia* in mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central European Russia and on the Black Sea coast. **Parasite**, v. 26, n. 2, p. 1-12, Jan. 2019.

SHAW, W. R.; CATTERUCCIA, F. Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. **Nature microbiology**, v. 4, n. 1, p. 20-34, Jan. 2019.

SINNATHAMBY, G.; HENDERSON, G.; UMAIR, S.; JANSSEN, P.; BLAND, R.; SIMPSON, H. The bacterial community associated with the sheep gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. **PloS one**, v. 13, n. 2, Fev. 2018.

SKORPIKOVA, L.; RESLOVA, N.; MAGDALEK, J.; VADLEJCH, J.; KASNY, M. The use of high-resolution melting analysis of ITS-1 for rapid differentiation of parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ashworthius sidemi*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, Set. 2020.

SNOWDON, R. J.; LANGSDORF, A. An introduction to DNA fingerprinting using RFLP and RAPD techniques. In: TIETZ, D. **Nucleic Acid Electrophoresis**. Springer, 1998. p. 99-128.

SOUSA-PAULA, L. D.; PESSOA, F. A.; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Beyond taxonomy: species complexes in New World phlebotomine sand flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 35, n. 3, p. 267-283, Jan. 2021.

SPRONG, H.; BRAKS, M. A. Introduction: choosing a One Health approach for the control of Lyme borreliosis. In: BRAKS, M. A. H.; VAN WIEREN, S. E.; TAKKEN, W.; HEIN SPRONG, H. **Ecology and prevention of Lyme borreliosis**. Wageningen Academic Publishers, Nov. 2016. p. 2142-2145.

STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 8, p. 1093-1101, Abr. 2004.

STERN, B. M.; O'SHEA, E. K. A proposal for the future of scientific publishing in the life sciences. **PLoS biology**, v. 17, n. 2, Fev. 2019.

SWEI, A.; COUPER, L. I.; COFFEY, L. L.; KAPAN, D.; BENNETT, S. Patterns, drivers, and challenges of vector-borne disease emergence. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 3, p. 159-170, Mar. 2020.

TENNANT, J. P. The state of the art in peer review. **FEMS Microbiology letters**, v. 365, n. 19, Out. 2018.

THOMPSON, A. T.; DOMINGUEZ, K.; CLEVELAND, C. A.; DERGOUSOFF, S. J.; DOI, K.; FALCO, R. C.; GREAY, T.; IRWIN, P.; LINDSAY, L. R.; LIU, J.; MATHER, T. N.; OSKAM, C. L.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; RUDER, M. G.; SHAW, D.; VIGIL, S. L.; WHITE, S.; YABSLEY, M. J. Molecular Characterization of *Haemaphysalis* Species and a Molecular Genetic Key for the Identification of *Haemaphysalis* of North America. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 1-11, Mar. 2020.

TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; FRANCHIN, A. G.; OGRZEWALSKA, M.; GERARDI, M.; OLEGÁRIO, M. M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; MARÇAL JÚNIOR, O. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 244-248, Out. 2010.

TORJESEN, I. Covid-19 will become endemic but with decreased potency over time, scientists believe. **BMJ: British Medical Journal**, v. 372, Fev. 2021.

TSAO, J. I.; HAMER, S. A.; HAN, S.; SIDGE, J. L.; HICKLING, G. J. The contribution of wildlife hosts to the rise of ticks and tick-borne diseases in North America. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 4, p. 1565-1587, Jul. 2021.

VALENTE, J. D.; SILVA, P. W.; ARZUA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MARTINS, T. F.; SILVA, A. M.; VIEIRA, T. S.; LABRUNA, M. B.; VIEIRA, R. F. Records of ticks (Acari: Ixodidae) on humans and distribution of spotted-fever cases and its tick vectors in Paraná State, southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 6, Nov. 2020.

VAN DIJK, E. L.; JASZCZYSZYN, Y.; NAQUIN, D.; THERMES, C. The third revolution in sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 9, p. 666-681, Set. 2018.

VAN HOLDE, E. K.; ZLATANOVA, J. **The Evolution of Molecular Biology: The Search for the Secrets of Life**. Academic Press, 2018. p. 1-230.

VARELA, J. B. **Influência dos Métodos de Conservação Sobre a Recuperação e a Frequência de Amplificação de Marcadores Mitocondriais e Nucleares de Carrapatos das Espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

VIEIRA, L. L.; CANEVER, M. F.; CARDOZO, L. L.; CARDOSO, C. P.; HERKENHOFF, M. E.; NETO, A. T.; VOGEL, C. I.; MILETTI, L. C. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite epidemiology and control**, v. 6, Ago. 2019.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688-3691, Jul. 2003.

WALTER, K. S.; CARPI, G.; CACCONE, A.; DIUK-WASSER, M. A. Genomic insights into the ancient spread of Lyme disease across North America. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 10, p. 1569-1576, Out. 2017.

WANG, T.; ZHANG, S.; PEI, T.; YU, Z.; LIU, J. Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-15, Set. 2019.

WECK, B.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; DALL'AGNOL, B.; MARCILI, A.; RECK, J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in the Pampa biome of southern Brazil: Isolation, molecular characterization, and serological evidence of canine infection. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 22, Dez. 2020.

WIKEL, S. Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 60, 2018.

WILKE, A. B.; BENELLI, G.; BEIER, J. C. Anthropogenic changes and associated impacts on vector-borne diseases. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1027-1030, Dez. 2021.

WISELY, S. M.; GLASS, G. E. Advancing the science of tick and tick-borne disease surveillance in the United States. **Insects**, v. 10, n. 10, Out. 2019.

WITTER, R.; MARTINS, T. F.; CAMPOS, A. K.; MELO, A. L. T.; CORRÊA, S. H. R.; MORGADO, T. O.; WOLF, R. W.; MAY-JÚNIOR, J. A.; SINKOC, A. L.; STRÜSSMANN, C.; AGUIAR, D. M.; ROSSI, R. V.; SEMEDO, T. B. F.; CAMPOS, Z.; DESBIEZ, A. L. J.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 415–423, Abr. 2016.

WHITE, L. A.; FORESTER, J. D.; CRAFT, M. E. Dynamic, spatial models of parasite transmission in wildlife: Their structure, applications and remaining challenges. **Journal of Animal Ecology**, v. 87, n. 3, p. 559-580, Maio. 2018.

YUAN, J.; LU, Y.; CAO, X.; CUI, H. Regulating wildlife conservation and food safety to prevent human exposure to novel virus. **Ecosystem Health and Sustainability**, v. 6, n. 1, Dez. 2020.

ZERINGÓTA, V.; MATURANO, R.; LUZ, H. R.; SENRA, T. O. S.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 81–89, Jan. 2017

ZUCCHERATO, L. W.; FURTADO, L. F.; MEDEIROS, C. D.; PINHEIRO, C. D.; RABELO, É. M. PCR-RFLP screening of polymorphisms associated with benzimidazole resistance in *Necator americanus* and *Ascaris lumbricoides* from different geographical regions in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, Set. 2018.

## ANEXOS

A – Código de “COIsearcher”.

## **ANEXO A – Código de “COIsearcher”.**

```
// Essa parte é o que permite trabalhar com os dados dos bancos de dados  
import wixData from "wix-data";
```

```

$w.onReady(function () {
  // Write your JavaScript here
  // To select an element by ID use: $w("#elementID")
  // Click "Preview" to run your code
  // Essa parte do código é automática do site e não tem funcionalidade nesse código
});

// Ao clicar no botão é feito uma busca no banco de dados a partir de valores selecionados pelo usuário
export function button1_click(event) {
  // Busca no banco de dados COI os valores presentes em cada dropdown
  wixData.query("COI")
    .ascending("title")
    // Primeiro termo em roxo é a coluna pesquisada e o segundo termo roxo qual dropdown contém
    // o valor selecionado pelo usuário
    .contains("primeiraBandaAluI", $w("#dropdown4").value)
    .contains("segundaBandaAluI", $w("#dropdown10").value)
    .contains("terceiraBandaAluI", $w("#dropdown11").value)
    .contains("primeiraBandaMboI", $w("#dropdown12").value)
    .contains("segundaBandaMboI", $w("#dropdown13").value)
    .contains("terceiraBandaMboI", $w("#dropdown14").value)
    // inicia a busca
    .find()
    // mostra na tabela abaixo apenas as linhas que contém os valores da busca nas colunas certas
    .then(res => {
      $w("#table1").rows = res.items;
    });
}

// Seleciona valores específicos em cada dropdown e realiza uma busca com esses valores
export function button2_click(event) {
  // Primeiro termo roxo é o dropdown e o segundo termo é o valor que será selecionado no dropdown
  $w('#dropdown4').value = "Primeira banda";
  $w('#dropdown10').value = "Segunda banda";
  $w('#dropdown11').value = "Terceira banda";
  $w('#dropdown12').value = "Primeira banda";
  $w('#dropdown13').value = "Segunda banda";
  $w('#dropdown14').value = "Terceira banda";
  // Busca no banco de dados COI os valores presentes em cada dropdown
  wixData.query("COI")
    .ascending("title")
    // Primeiro termo em roxo é a coluna pesquisada e o segundo termo roxo qual dropdown contém
    // o valor selecionado pelo usuário
    .contains("primeiraBandaAluI", $w("#dropdown4").value)
    .contains("segundaBandaAluI", $w("#dropdown10").value)
    .contains("terceiraBandaAluI", $w("#dropdown11").value)

```

```

        .contains("primeiraBandaMboI", $w("#dropdown12").value)
        .contains("segundaBandaMboI", $w("#dropdown13").value)
        .contains("terceiraBandaMboI", $w("#dropdown14").value)
        // inicia a busca
        .find()
        // mostra na tabela abaixo apenas as linhas que contém os valores da busca nas colunas
certas
        .then(res => {
            $w("#table1").rows = res.items;
        });
    }

// Ao clicar no botão é feito uma busca no banco de dados a partir de valores selecionados pelo
usuário
// na ferramenta complementar
export function button3_click(event) {
    // Busca no banco de dados COI os valores presentes em cada dropdown
    wixData.query("COI3enzima")
        .ascending("title")
        // Primeiro termo em roxo é a coluna pesquisada e o segundo termo roxo qual dropdown
contém
        // o valor selecionado pelo usuário
        .contains("grupo", $w("#dropdown1").value)
        .contains("enzima", $w("#dropdown15").value)
        .contains("primeiraBanda", $w("#dropdown16").value)
        .contains("segundaBanda", $w("#dropdown18").value)
        .contains("terceiraBanda", $w("#dropdown20").value)
        // inicia a busca
        .find()
        // mostra na tabela abaixo apenas as linhas que contém os valores da busca nas colunas
certas
        .then(res => {
            $w("#table2").rows = res.items;
        });
    }

// Seleciona valores específicos em cada dropdown e realiza uma busca com esses valores na
ferramenta
// complementar
export function button4_click(event) {
    // Primeiro termo roxo é o dropdown e o segundo termo é o valor que será selecionado no
dropdown
    $w('#dropdown1').value = "Grupo";
    $w('#dropdown15').value = "Enzima";
    $w('#dropdown16').value = "Primeira banda";
    $w('#dropdown18').value = "Segunda banda";
    $w('#dropdown20').value = "Terceira banda";
    // Busca no banco de dados COI os valores presentes em cada dropdown
    wixData.query("COI3enzima")
        .ascending("title")

```

```
// Primeiro termo em roxo é a coluna pesquisada e o segundo termo roxo qual dropdown contém
// o valor selecionado pelo usuário na ferramenta complementar
.contains("grupo", $w("#dropdown1").value)
.contains("enzima", $w("#dropdown15").value)
.contains("primeiraBanda", $w("#dropdown16").value)
.contains("segundaBanda", $w("#dropdown18").value)
.contains("terceiraBanda", $w("#dropdown20").value)
// inicia a busca
.find()
// mostra na tabela abaixo apenas as linhas que contém os valores da busca nas colunas certas
.then(res => {
    $w("#table2").rows = res.items;
});
}
```