

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato
Rhipicephalus microplus

Marina Amaral Xavier

Pelotas, 2014

MARINA AMARAL XAVIER

Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof.^a Dr.^a Cláudia Pinho Hartleben

Orientador de Estágio: Prof. Dr. Carlos Termignoni

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

X1i Xavier, Marina Amaral
 Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato
 Rhipicephalus microplus / Marina Amaral Xavier. – 64f. : il. –
 Trabalho de conclusão de curso (Graduação em
 Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador
 Cláudia Pinho Hartleben.

 1.Biotecnologia. 2.Carrapatos. 3.Inibidores de trombina.
 4.*Rhipicephalus microplus*. I.Hartleben, Cláudia Pinho.
 II.Título.

CDD: 616.9223

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sibebe Borsuk, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Msc. Sérgio Silva da Silva, Universidade Federal de Pelotas

Msc. Gizele Lima de Sá, Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Cláudia Pinho Hartleben, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais, meus maiores incentivadores.”

Agradecimentos

Aos meus pais, que me deram amor, carinho, educação, e me incentivaram a alcançar minhas realizações, sempre me apoiando e acreditando no meu potencial. Eu sou resultado da confiança e força de vocês.

Aos meus irmãos, às minhas avós, à Graça e ao Luiz Henrique. Em especial ao meu avô Milton que, mesmo não estando mais presente, é minha referência como pessoa e profissional.

Ao meu namorado Guilherme pelo amor, carinho e paciência durante esta jornada, apoio e incentivo para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha orientadora, prof.^a Cláudia Hartleben, pela oportunidade em ser sua aluna de iniciação científica, por toda aprendizagem e confiança nos trabalhos realizados.

A todos os colegas do laboratório de Imunodiagnóstico pela amizade e companheirismo. Em especial à Gizele, Thaís e Leonardo por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Ao prof. Carlos Termignoni pela receptividade, oportunidade e conhecimentos adquiridos durante meu estágio de final de curso em seu laboratório.

Ao meu tio Gilberto, meus dindos e primas que me receberam de braços abertos durante a realização do meu estágio de final de curso na UFRGS.

Às amigas Vanessa e Luisa pelo carinho e incansável parceria nas horas boas e ruins.

Às amigas Bárbara, Júlia e Gabriela que estiveram sempre comigo durante esses 4 anos de graduação, pela amizade, força e companheirismo; à Mariana pela amizade e parceria para cafés e cervejadas, bem como a todos os demais amigos e colegas da faculdade pelo convívio, risadas e bons momentos compartilhados.

Aos professores da graduação em Biotecnologia pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

À todas as pessoas que contribuíram na minha vida acadêmica e me ajudaram a crescer como pessoa,

Muito obrigada!

Resumo

XAVIER, Marina Amaral. **Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2014. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A bovinocultura é um mercado de grande importância no Brasil, pois desde 2004 o país tem um quinto de sua produção voltada para o comércio internacional e é líder mundial em exportação de carne bovina, com vendas em mais de 180 países que, ultrapassaram US\$2,5 bilhões no ano 2006. No entanto, existem fatores limitantes para o desenvolvimento da bovinocultura, como a tristeza parasitária bovina, que possui como vetor o *Rhipicephalus microplus*, o qual é responsável por transmitir bactérias e protozoários como agentes etiológicos. Além dos prejuízos para saúde animal, também há espoliação e danos à pele do hospedeiro, devido à cicatrização no local de fixação do carrapato. Em 2002 o prejuízo anual causado pelo parasito foi estimado em mais de US\$2 bilhões no Brasil, e US\$70 milhões no Rio Grande do Sul. Este trabalho de conclusão de curso tem como objetivos específicos revisar os métodos de controle do carrapato dos bovinos comumente utilizados (acaricidas e vacinas), bem como potenciais novos antígenos vacinais, obtidos através de processos biotecnológicos, tendo como principal alvo a proteína trombina. A resistência aos acaricidas tornou necessária a busca por métodos alternativos de controle do carrapato dos bovinos, levando ao desenvolvimento de vacinas. No entanto, a principal limitação para o desenvolvimento de uma vacina capaz de alcançar o grau de eficiência necessário à campo é a escolha de antígenos imunoprotetores adequados. A saliva do parasito contém antagonistas do sistema de defesa do hospedeiro, os quais quando injetados neste ativam suas atividades anticoagulante, antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e imunomodulatória. A trombina é uma serino-protease de papel chave na hemostase, sendo de grande importância nas linhas de defesa do hospedeiro, já que o carrapato alimenta-se através da hematofagia. Esta enzima forma o coágulo de fibrina, induz a agregação plaquetária e regula sua própria produção pela ativação de outros fatores da cascata de coagulação. Inibidores de trombina presentes na saliva de *R. microplus* já foram identificados. No entanto, a caracterização molecular da maioria destas moléculas se faz necessária, para que suas funções sejam identificadas e seu potencial vacinal seja testado. A identificação e caracterização de inibidores da cascata já foi feita em várias espécies, e abre caminho para que isto ocorra também para *R. microplus*. Além disso, uma vacina cruzada, que conciliasse proteínas provenientes de diferentes espécies, poderia ser interessante pois seu amplo espectro facilitaria alcançar diferentes escopos, inclusive outras espécies a princípio não alvejadas.

Abstract

XAVIER, Marina Amaral. **Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2014. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Cattle breeding are very important for the economy of Brazil, since 2004 the country sells one fifth of the production in the international commerce, as well as is leader in the world for exportation of meat. We sell to more than 180 countries, earning in 2006 US\$2,5 billions. Although, there are some limiting factors for cattle breeding development, *Rhipicephalus microplus* is vector of bacteria and protozoan etiologic agents. Furthermore, the ticks cause spoliation and damage the leather of the host, because of the healing where the tick fixes. In 2002 the annual prejudice caused by *R. microplus* was estimated in more than US\$2 billions in Brazil, and US\$70 millions in Rio Grande do Sul. This work has the objective of review the common methods for controlling the cattle tick (acaricides and vaccines), as well as potentially new vaccine antigens, obtained by biotechnology procedures, predominantly targeting thrombin. The acaricides resistance turns on the necessity of searching for alternative methods in controlling the cattle tick, propitiating the development of vaccines. Although, the mainly limitation for developing a vaccine with efficiency abroad is choosing antigens with appropriate imunoprotection. The saliva of the parasite contain antagonists of the host defense system that, when inject, works as anticoagulant, antiplatelet, vasodilator, anti-inflammatory and immunomodulator. Thrombin is a serin-protease with key work in hemostasis, very important for the host defense, whereas the tick feed is by hematofagy. This enzyme forms fibrin clot, induces platelet aggregation and regulates its own production by activating other factors of the coagulation cascade. Thrombin inhibitors present in the saliva of *R. microplus* have been identified. Although, the molecular characterization of their majority is yet necessary, so their functions can be recognized e the vaccine potential tested. Identification and characterization of cascade inhibitors have been done in other ticks species, open ways for occurrence also for *R. microplus*. Moreover, a cross-vaccine that conciliates proteins of different species would be interesting, as its wide spectrum could facilitate different scopes, including other species not yet targeted.

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração simplificada do ciclo de vida do carrapato dos bovinos <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
Figura 2 - Representação diagramática da coagulação sanguínea pelo modelo baseado em célula.	38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características de proteínas inibidoras de trombina e FXa em diferentes espécies de carrapato.....	46
---	----

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
3. Biologia do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
4. Controle do <i>R. microplus</i>	18
4.1 Acaricidas	18
4.2. Vacinas	21
4.2.1 Antígenos Vacinais	24
5. Importância da saliva para o sucesso da hematofagia	28
6. Proteases	30
6.1 Serino-proteases	31
6.2 Cisteíno-proteases	31
7. Famílias inibidoras de proteases	32
7.1 Domínio Kunitz	32
7.2 Serpinas	32
7.3 Cistatinas	34
8. Coagulação sanguínea baseada em célula	34
8.1. Inibidores de trombina de <i>R. microplus</i>	38
8.2. Inibidores em outras espécies de carrapato	42
9. Conclusão	48

Referências	48
-------------------	----

1. Introdução

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil possui o segundo maior rebanho bovino no mundo, com aproximadamente 200 milhões de cabeças. Desde 2004, o país tem um quinto de sua produção voltada para o comércio internacional e é líder mundial em exportação de carne bovina, com vendas em mais de 180 países que, ultrapassaram US\$2,5 bilhões no ano 2006 (ALMEIDA; MICHELS, 2012).

No entanto, algumas doenças são fatores limitantes para o desenvolvimento da bovinocultura de corte e de leite nas regiões tropicais e subtropicais, como a tristeza parasitária bovina, que tem como vetor o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e como agentes etiológicos os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a bactéria *Anaplasma marginale*. O parasitismo por *R. microplus* também provoca grande espoliação do animal e ainda causa danos ao couro do bovino, devido à cicatrização no local de fixação do carrapato (revisado por FURLONG et al., 2003; ANDREOTTI, 2010; GONÇALVES et al., 2011; MOLENTO et al., 2013).

Em 1983 foi calculado que o carrapato dos bovinos acarretava perdas anuais no Brasil em cerca de US\$1 bilhão, já em 2002 o prejuízo anual foi estimado em mais de US\$2 bilhões no Brasil. No estado do Rio Grande do Sul, onde há aproximadamente 12 milhões de cabeças de gado, os produtores de bovinos de

corte têm perdas de US\$70 milhões por ano, causadas pela baixa produção de carne, altos índices de mortalidade e ineficiência dos acaricidas devido ao aumento da resistência às drogas disponíveis (ANDREOTTI, 2010; GONÇALVES et al., 2011; GUERRERO et al., 2012a; MOLENTO et al., 2013).

Dependendo do local e do tipo de manejo, os fazendeiros tem prejuízo anual de cerca de US\$2,5 a US\$25,00 por cabeça de gado no que se refere à gastos para o combate ao carrapato. Estas incluem mão-de-obra, construção e manutenção de instalações, aquisição de carrapaticidas e equipamentos de suporte para aplicação destes nos rebanhos (PEGRAM, 2001; ANDREOTTI, 2010; MOLENTO et al., 2013). Um estudo recente realizado por Rodrigues e Leite (2013) sobre o prejuízo causado pelo *R. microplus* em gado de leite no estado de Minas Gerais mostra que esse parasito foi responsável pela redução de 6.678 litros de leite no período anual analisado, uma média de 90,24 litros por vaca em produção.

Este trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido durante o Estágio de Final de Curso no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do prof. Dr. Carlos Termignoni. Neste laboratório, as linhas de pesquisa visam a identificação e caracterização de proteínas de *R. microplus* e seus potenciais como antígenos vacinais contra este ectoparasito.

2. Objetivos

Objetivo geral: revisar os inibidores de trombina que estão presentes na saliva do carrapato *Rhipicephalus microplus* e que poderiam ser utilizados como antígenos vacinais.

Objetivos específicos: revisar os métodos de controle comumente utilizados (acaricidas e vacinas) contra o carrapato dos bovinos, bem como potenciais novos antígenos vacinais, obtidos através de processos biotecnológicos, tendo como principal alvo a trombina.

3. Biologia do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *R. microplus* ou carrapato dos bovinos, anteriormente denominado *Boophilus microplus*, é um ectoparasita hematófago monoxeno, ou seja, necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, alimentando-se de sangue, linfa e substratos teciduais, sugando de 2mL a 3mL por dia. Sua classificação taxonômica é: filo *Arthropoda*, classe *Arachnida*, ordem *Acari*, subordem *Ixodides*, família *Ixodidae* (NEVES, 2011; VAZ JUNIOR et al., 2012).

Seus hospedeiros quase que exclusivos são os bovinos, preferencialmente taurinos (*Bos taurus taurus*) de raças europeias (como o gado Holandês), já que os bovinos zebuínos de origem asiática ou indiana *Bos taurus indicus* (como o gado Nelore) mostram-se mais resistentes ao carrapato. De forma que quanto maior a proporção de genes de *B. indicus* em uma população, maior será a resistência ao

carrapato (GOMES et al., 1989; TURNI et al., 2002). Contudo, em determinadas situações outros mamíferos também são suscetíveis ao *R. microplus*, como ovinos, caprinos, caninos, equinos, cervídeos e o humanos.

O ciclo de vida do *R. microplus* pode ser dividido em fase parasitária e fase de vida livre (Fig. 1). A fase parasitária ocorre no hospedeiro bovino, podendo durar de 18 a 26 dias, com moda de 21 dias. Inicia-se com as larvas infestantes, que se instalam no hospedeiro e passam a metalarvas, seguido por ninfa e metaninfa. Neste último estágio ocorre a diferenciação sexual, gerando neandro e posteriormente gonandro (machos); ou metaninfa e posteriormente neógina (fêmeas). As larvas fixam-se ao hospedeiro pelas peças bucais e só desprendem do local onde se fixaram ao completarem o ciclo de vida parasitária. As neóginas são fecundadas pelos machos, que não se fixam permanentemente ao hospedeiro, e então fazem hematofagia, passando pela fase de partenógina até enfim tornar-se teleógina que, quando totalmente ingurgitadas, caem ao solo e passam para a fase de vida livre do ciclo. Os machos permanecem mais tempo no hospedeiro e não se fixam, podendo assim acasalar com várias fêmeas. Logo após a fixação ao hospedeiro alimentam-se do plasma deste e a seguir, e até completar a fase parasitária, o sangue é o principal alimento (ROCHA, 1997).

A fase de vida livre tem duração de aproximadamente 28 dias, podendo durar até meses, variando de acordo com influências do ambiente, como

temperatura e umidade. Após completarem o ciclo de vida parasitário as teleóginas (fêmeas totalmente ingurgitadas) caem ao solo, procuram um abrigo junto às raízes da vegetação e inicia-se o período de pré-postura, que dura uma média de 2 a 3 dias. Os próximos 17 dias, aproximadamente, são de oviposição, sendo que cada fêmea põem de 2000 a 3000 ovos, caracterizados por serem esféricos e de coloração castanha devido ao alto conteúdo de hemeprteínas. As fêmeas morrem ao terminarem a postura. Passados 5 a 10 dias de incubação ocorre a eclosão dos ovos. As larvas necessitam de 4 a 20 dias para que se tornem infestantes e podem ficar de 4 a 6 meses sem se alimentarem. Quando reconhecem a presença de um hospedeiro, principalmente por sensores de CO₂, deixam o abrigo úmido junto às raízes e sobem nas gramíneas e arbustos a espera da passagem do hospedeiro. Ao longo do ciclo biológico, os carrapatos aumentam significativamente seu tamanho, as larvas medem cerca de 1mm e as fêmeas adultas podem chegar a 1,2cm; já os machos são bem menores, medindo cerca de 2mm (ROCHA, 1997; FURLONG et al., 2003; NEVES, 2011; VAZ JUNIOR et al., 2012).

Durante o verão e a primavera brasileiros devido às altas temperaturas e alta umidade, a fase de vida livre tem menor duração, favorecendo uma maior produção e eclosão dos ovos e aparecimento das larvas no campo. Já no inverno e outono ocorre um prolongamento da fase de vida livre, pois a eficiência reprodutiva e a eclosão dos ovos são reduzidas, o que leva a uma menor presença de larvas no

campo. Contudo, as baixas temperaturas contribuem para uma maior sobrevivência das larvas. Dessa forma, nas regiões Central, Sudeste e Centro-Oeste brasileiras a sobrevivência do carrapato é favorecida durante o ano inteiro pela temperatura e umidade; no entanto quando a época é seca e mais fria, este período pode durar três vezes mais. (revisado por FURLONG et al., 2003; VAZ JUNIOR et al., 2012).

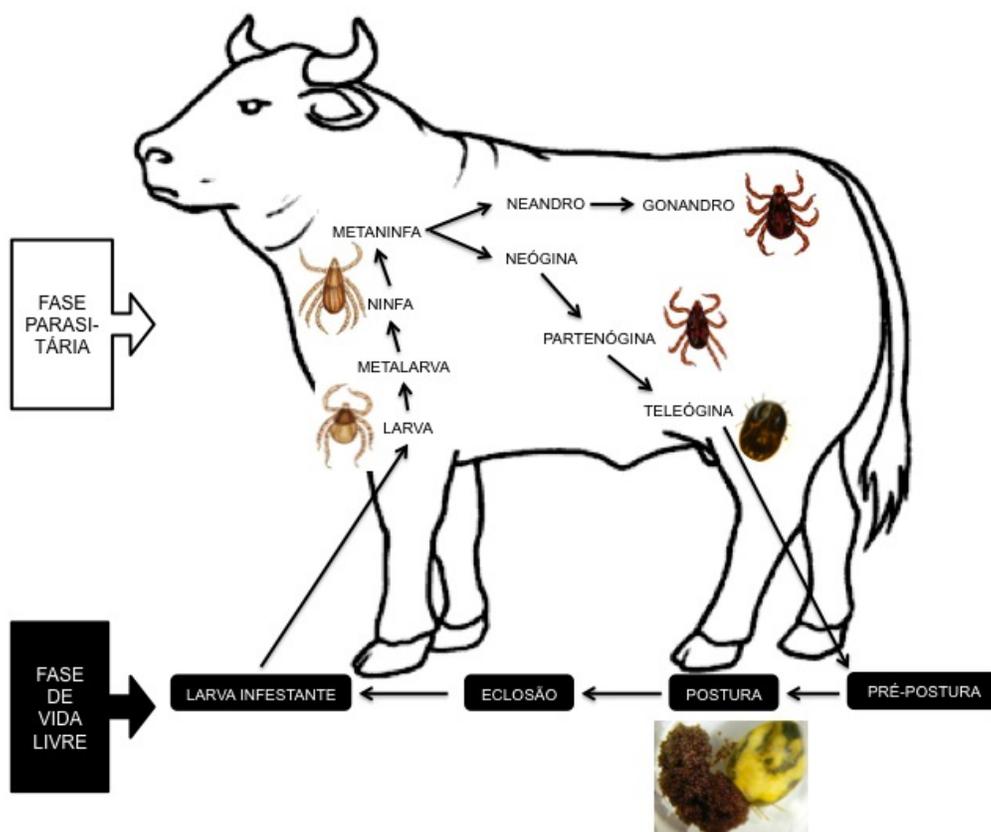


Figura 1 - Ilustração simplificada do ciclo de vida do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus*.

Adaptado de Carissimi, 1993.

4. Controle do *R. microplus*

4.1 Acaricidas

Como abordado anteriormente, o parasitismo pelo carrapato dos bovinos leva a prejuízos diretos e indiretos na bovinocultura. Os danos diretos são através da espoliação sanguínea e suas consequências (anemia, perda de peso, irritação, prurido, propensão à miíases, desvalorização dos couros). As perdas indiretas estão relacionadas aos agentes causadores de doenças transmitidos pelo carrapato, como a tristeza parasitária dos bovinos, e os gastos gerados para tratamento dessas enfermidades, que podem inclusive levar ao óbito do bovino. Para o controle do carrapato utilizam-se carrapaticidas, que, quando corretamente aplicados, são eficientes (FURLONG et al., 2003).

No entanto, o uso contínuo e/ou indiscriminado de carrapaticidas na tentativa de evitar as perdas econômicas acima descritas, leva a seleção de populações de carrapatos resistentes à essas drogas. A eliminação dos carrapatos sensíveis pelos acaricidas e o acasalamento entre carrapatos resistentes, gera um número ainda maior de indivíduos resistentes, evento este chamado de propagação do alelo resistente por pressão de seleção. Além disso, quando há resistência a um determinado produto carrapaticida, esta também acontece com outros produtos da mesma família ou grupo químico; ou mesmo à produtos que sejam diferentes, mas que tenham ação sobre o mesmo sítio (FAO, 2003; FURLONG et al., 2003;

FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010). Os carrapatos podem desenvolver resistência a acaricida basicamente através de três mecanismos: a) ineficiência do acaricida em penetrar no carrapato; b) mudança na metabolização do acaricida; c) alterações nas moléculas alvo do acaricida (FURLONG; SALES, 2007; GUERRERO et al., 2012b).

A resistência no sítio de ação do acaricida ocorre quando há uma mutação no gene que codifica para a molécula alvo da droga, sendo este tipo de resistência muito comum quando se trata da classe de carrapaticidas piretroides. Já a resistência metabólica está relacionada à capacidade do carrapato em se desintoxicar ou sequestrar o acaricida, sendo que as enzimas das famílias do citocromo P450, esterases e glutathione-S-transferase estão envolvidas nesse processo (GUERRERO et al., 2012b).

A seguir serão apresentados os grupos de acaricidas utilizados no Brasil.

Organofosforados. Derivados orgânicos do ácido fosfórico, os organofosforados são os acaricidas mais antigos utilizados no combate ao carrapato dos bovinos, surgiram em 1955 e foram desenvolvidos para substituir os acaricidas organoclorados. O mecanismo de ação é através da inibição da enzima acetilcolinesterase, o que leva a um aumento até um nível tóxico para carrapatos do neurotransmissor acetilcolina, ocasionando aumento da contração muscular e

consequente paralisia (FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010; GUERRERO et al., 2012b).

Amidinas. Este grupo de acaricidas foi lançado no mercado em 1975. Seu mecanismo de ação é através da inibição da contração do oviduto da teleógina, impedindo a postura dos ovos, devido à inibição de monoaminooxidases (MAO). A toxicidade se deve ao composto produto de seu metabolismo, o N-2,4-dimetilfenil N-metilformamidina, que é nocivo principalmente para as larvas (FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010).

Piretroides. Os piretroides começaram a ser amplamente utilizados em 1980. Seu mecanismo de ação é sobre o sistema nervoso central e periférico, atuando nos canais de sódio dependentes de voltagem. Quando se liga a estes canais prolonga sua abertura, o que aumenta a permeabilidade do sódio na membrana e atrasa a saída de potássio da célula. Este acaricida tem menor toxicidade para mamíferos do que os organofosforados, no entanto, existem produtos no mercado que contém a associação dos dois grupos de acaricidas, para que haja aumento da eficiência (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010; GUERRERO et al., 2012b).

Fipronil. Este acaricida tem mecanismo de ação sobre os sistema nervoso central, nos receptores GABAérgicos. Atua no bloqueio pré- e pós-sináptico dos receptores

de íons cloro, resultando em uma hiper-excitação neural que leva a paralisia e morte (KIDD; JAMES, 1991; FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010).

Lactonas macrocíclicas. O mecanismo de ação das lactonas macrocíclicas é através do bloqueio da transmissão de impulsos nervosos, matando os carrapatos por paralisia. Estes produtos surgiram em 1980 e são derivados de produtos da fermentação do fungo *Streptomyces avermitiles*, além disso, são também eficientes contra helmintos e bernes (FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010).

Fluazuron. Este carrapaticida atua inibindo a produção de quitina, o principal componente da carapaça, impedindo assim a mudança de fase e o crescimento, além de impedir a eclosão dos ovos (FURLONG; SALES, 2007; ANDREOTTI, 2010).

4.2. Vacinas

A resistência aos acaricidas tornou necessária a busca por métodos alternativos de controle do carrapato dos bovinos. Assim, o avanço da biotecnologia têm auxiliado nas pesquisas por uma vacina eficiente contra ectoparasitas, que vêm sendo desenvolvidas há 30 anos. Esta metodologia oferece muitas vantagens, como o custo-benefício, a redução da contaminação ambiental, a prevenção da resistência aos pesticidas e a possibilidade de ser aplicada em uma gama de hospedeiros. No entanto, a principal limitação para o desenvolvimento de uma vacina capaz de alcançar o grau de eficiência necessário a campo é encontrar antígenos

imunoprotetores adequados (WIKEL, 1996; WILLADSEN, 2004; NUTTAL et al., 2006; CRUZ et al., 2008; VAZ JUNIOR et al., 2012).

O controle dos carrapatos através de estratégias imunológicas depende da identificação de antígenos imunogênicos do ectoparasito e que sejam capazes de desenvolver uma resposta imunológica protetora, e também do entendimento dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro (WIKEL, 1996; CRUZ et al., 2008). Duas classes de antígenos estão associadas ao desenvolvimento de uma resposta protetora: os antígenos expostos, apresentados naturalmente ao hospedeiro durante as infestações, como aqueles presentes na saliva secretada pelo carrapato durante sua alimentação (CRUZ et al., 2008); e os antígenos ocultos, que não são naturalmente apresentados ao hospedeiro durante as infestações devido a sua localização no parasito, portanto não estimulariam a resposta imunológica (WILLADSEN et al., 1993; CRUZ et al., 2008). Para um antígeno oculto ser um potencial alvo vacinal, deve estar situado aonde as imunoglobulinas possam alcançá-lo e também ser associado a alguma função vital do carrapato (NUTTAL et al., 2006).

Quando ocorrem infestações em hospedeiros previamente imunizados com um antígeno oculto, por exemplo, uma molécula presente no intestino do carrapato, podem ocorrer danos ao parasito durante sua alimentação. A hematofagia carrega os anticorpos, componentes do complemento e células do sistema imunológico do

bovino que reconhecem o antígeno oculto, acarretando na lise das células alvo; assim, alguns carrapatos morrem, enquanto outros têm sua capacidade de alimentação e oviposição reduzidas. Contudo, a exposição ao parasito não mantém estimulada a resposta imunológica do hospedeiro ao antígeno oculto e, portanto, é necessária a aplicação esporádica da vacina (WILLADSEN et al., 1993; WILLADSEN, 2004).

A hematofagia estimula a geração das respostas imunológicas inata e adaptativa no hospedeiro. A habilidade do bovino em responder às moléculas liberadas pelo *R. microplus* resulta em graus de resistência ao parasito (TURNI et al., 2002). Assim, o tipo de resposta será diferente em animais suscetíveis e resistentes ao carrapato; a exemplo da hipersensibilidade tipo IV cutânea, que se mostra maior em bovinos suscetíveis (BECHARA et al., 2000; VAZ JÚNIOR et al., 2012). As infestações naturais levam a geração de células T e B em bovinos, sendo que quando já há resistência por imunidade adquirida, a resposta cutânea é mediada por basófilos (WINKEL, 1996). Em 1996, VAZ JUNIOR et al., demonstraram a presença de imunoglobulinas funcionais de bovinos na hemolinfa de *R. microplus*. Neste estudo foi observado que 2% dos anticorpos presentes no soro do hospedeiro passam para a hemolinfa, bem como estes mantêm sua atividade por pelo menos 48 horas após o término do ciclo biológico em fêmeas ingurgitadas.

O mecanismo de defesa do carrapato ao sistema imunológico do hospedeiro ocorre através de moléculas imunossupressoras presentes na sua saliva, que possui como alvo os elementos essenciais para o desenvolvimento e expressão da imunidade. A saliva tem efeito sob as células T, macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e em relação a qual tipo de imunoglobulina será gerada em resposta ao antígeno (TURNI et al., 2002).

4.2.1 Antígenos Vacinais

Duas vacinas para controle do *R. microplus* já foram lançadas no mercado, ambas na década de 90, produzidas através da tecnologia do DNA recombinante em sistemas heterólogos (GUERRERO et al., 2012a; VAZ JÚNIOR et al., 2012). A TickGARD foi desenvolvida por pesquisadores australianos da Divisão de Ciências Animais Tropicais da CSIRO (*Common wealth Scientific and Industrial Research Organisation*) JONSSON et al., 2000), que utilizaram a bactéria *Escherichia coli* para expressão do antígeno Bm86 de *R. microplus*. Este antígeno, descrito por WILLADSEN et al. (1989), é uma glicoproteína ligada à membrana presente no intestino de teleóginas ingurgitadas, com peso molecular de 89kDa. Esta foi a primeira vacina desenvolvida contra um ectoparasito. Doze anos foram necessários para estudos e ensaios com aproximadamente 18 mil bovinos, até o lançamento da TickGARD no mercado. No entanto, devido a problemas industriais e ineficiência,

esta vacina foi retirada do mercado (GUERRERO et al., 2012a; VAZ JÚNIOR et al., 2012).

Em seguida, entrou no mercado a Gavac, desenvolvida pelo Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba, empregando a levedura *Pichia pastoris* para expressão de uma quimera da glicoproteína Bm86 com um segmento peptídico altamente imunogênico (DE LA FUENTE et al., 1999). Embora sua aceitação não seja amplamente difundida devido às variações na eficácia de resultados, a Gavac é comercializada principalmente nas Américas do Norte e do Sul (GUERRERO et al., 2012a; VAZ JÚNIOR et al., 2012). As duas vacinas tiveram eficácia entre 51 e 91% a campo, e essa variação no grau de proteção se deve a diferentes populações de *R. microplus*, e fatores relacionados aos bovinos, como raça e estado nutricional (PARIZI et al., 2012a).

O antígeno oculto Bm91 foi proposto por Riding et al. (1994) para ser utilizado com sucesso em vacinas contra o carrapato dos bovinos. Esta proteína está presente nas glândulas salivares e intestino de *R. microplus*, e parece ter função enzimática devido ao fato de que sua sequência de aminoácidos tem alta semelhança com a enzima conversora de angiotensina de mamíferos. Willadsen et al. (1996) utilizaram este antígeno em combinação com a Bm86 para imunização de bovinos e observaram aumento da proteção. Assim, propuseram que esta melhoria

seria devido a Bm91 ter efeito protetor naqueles animais que respondiam fracamente à imunização com Bm86, e vice-versa (GUERRERO et al., 2012a).

Os grupos de pesquisa envolvidos no desenvolvimento de uma vacina contra o *R. microplus* têm reportado e avaliado alguns antígenos potenciais, como a glutational-S-transferase, a cisteína-endopeptidase degradadora de vitelina, a proteína semelhante a ferritina, catepsina, inibidores de tripsina, e alelos próximos a Bm86 (GUERRERO et al., 2012a).

Patarroyo et al. (2002) utilizaram peptídeos sintéticos com sequências correspondendo a segmentos da Bm86 de *R. microplus* da Austrália, preditos serem antigênicos por análise *in silico*, para imunizar bovinos. Dentre os antígenos testados, o SBm7462 (contendo três peptídeos em ordem diferente à proteína nativa) mostrou 81% eficácia, para o qual foi observada forte resposta imunológica. Posteriormente, Patarroyo et al. (2009) demonstraram que este antígeno é capaz de elicitar resposta imunológica IgG1 e de células T. Em 2008, Peconick et al. mostraram que a vacinação com SBm7462 poderia ser efetiva também no Brasil, Uruguai, Colômbia e Argentina. A conservação dos peptídeos alvos nas populações de carrapatos desses países foi observada através da análise do cDNA.

As quimeras SUB-MSP1a e Bm95-MSP1a foram estudadas por Almazán et al. (2012) para imunização de bovinos, e mostraram 81% e 64% de eficiência, respectivamente. As proteínas subolisina (SUB) e Bm95 (homóloga a Bm86) foram

fusionadas à proteína de superfície 1a (MSP1a) de *Anaplasma marginale* e a expressão das proteínas recombinantes foi feita em *E. coli*. O papel da subolisina ainda não foi totalmente definido, mas esta proteína parece estar envolvida na resposta inata das glândulas salivares dos carrapatos a patógenos (ZIVKOVIC et al., 2010).

Os carrapatos possuem duas formas de ferritinas, a isoforma 1 intracelular (FER1) e a isoforma 2 secretada (FER2). A última é transportadora de ferro na hemolinfa de carrapatos, sendo expressa em todos os estágios do ciclo de vida. O silenciamento do gene *Fer2*, bem como de outros genes envolvidos no metabolismo do ferro, por RNA de interferência (RNAi) resultou em impacto sobre a alimentação, oviposição e eclosão de larvas de carrapatos. A imunização com FER2 recombinante levou a 64% de proteção em bovinos contra *R. microplus* e 72% contra *R. annulatus* (HAJDUSEK et al., 2010).

A aspártico-proteinase BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*), presente em ovos de *R. microplus*, foi estudada como potencial alvo vacinal por Leal et al. (2006). Na sua forma nativa, a proteína tem capacidade de degradar a vitelina *in vitro*, sugerindo um papel na embriogênese. Quando testada em sua forma recombinante para imunização de *Bos taurus taurus* da raça Hereford, mostrou eficiência de proteção de 25%. Outra proteína envolvida na embriogênese, também na degradação de vitelina, a VTDCE (*Vitelin-Degrading Cysteine Endopeptidase*), foi

estudada por Seixas et al. (2008b). Esta peptidase foi capaz de gerar proteção imunológica em 21% dos bovinos vacinados.

A estratégia de imunização-cruzada foi estudada por Parizi et al. (2011), utilizando a proteína glutationa-S-transferase do carrapato *Haemaphysalis longicornis* (GST-HI). Esta proteína pertence a uma família de enzimas de biotransformação envolvidas na detoxificação metabólica de xenobióticos e também de componentes endógenos, podendo ser encontrada em diversos animais. A GST-HI recombinante foi expressa em *Escherichia coli* e utilizada para vacinar bovinos Hereford, obtendo proteção imunológica de 57%.

Para melhoria da eficiência dos três últimos antígenos descritos, Parizi et al. (2012b) propôs a vacinação multi-antigênica, empregando BYC, VTDCE e GST-HI. Esta composição de antígenos conferiu proteção de 53% a 61% entre os dias de ensaio 43 e 85, apesar de ocorrer decréscimo de 35% de proteção decorridos 2 meses da última imunização. A utilização simultânea dos três antígenos afetou a fisiologia dos carrapatos, levando a diminuição do número de fêmeas infestantes. Com isso, bovinos infestados tiveram um ganho de peso maior do que bovinos não vacinados.

5. Importância da saliva para o sucesso da hematofagia

Existem mais de 14 mil espécies de artrópodes, dentro de 14 famílias, que fazem hematofagia (RIBEIRO, 1995). Dentre os hematófagos, os carrapatos

ixodídeos têm como característica a prolongada fixação para alimentação no hospedeiro. Durante o processo de penetração da peça bucal do carrapato na pele do hospedeiro, capilares e pequenos vasos são lesados no local da lesão se forma um bolsão hemorrágico, causando danos na derme e epiderme (STIBRANIOVA et al., 2013; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA 2013).

As defesas do hospedeiro ao parasito consiste em homeostase, para reparar os danos causados pela picada e prevenir a perda de sangue; em imunidade inata, através de resposta inflamatória e ativação do sistema complemento, podendo haver efeito antimicrobiano e indução do remodelamento do tecido danificado; e em imunidade adquirida à um antígeno específico, já que há exposição repetida com o suceder das infestações (STIBRANIOVA et al., 2013).

No entanto, para que ocorra sucesso na hematofagia e possa completar seu desenvolvimento, o parasito necessita evadir-se dessas defesas do hospedeiro, assim, antagonistas aos sistemas de defesa são injetados através da saliva. As moléculas bioativas presentes na saliva possuem atividade anticoagulante, antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e imunomodulatória. Portanto, é possível atingir várias vias do sistema de defesa do hospedeiro, devido à sua redundância (FRANCISCHETTI et al., 2009; STIBRANIOVA et al., 2013; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA 2013).

Além disso, o tecido lesado pelo parasito têm suas características modificadas e isso facilita a transmissão de patógenos, que se estabelecem e replicam-se no hospedeiro. Alguns dos organismos que utilizam os carrapatos como vetores são vírus (*Flavivírus*), bactérias de vários gêneros (*Ehrlichia.*, *Borrelia.*, *Coxiella.*, *Rickettsia*, *Anaplasma*) e protozoários (*Babesia spp.*, *Theileria spp.*) (CIPRANDI et al., 2003; STIBRANIOVA et al., 2013).

O estudo de proteomas e transcriptomas da saliva de carrapatos permite determinar a presença de uma ampla variedade de proteínas na saliva, sendo muitas delas sem similaridades com proteínas já descritas em banco de dados como o National Center for Biotechnology Information (NCBI). As proteínas salivares mais abundantes são membro de famílias multi-gênicas e, algumas dessas famílias são conhecidas por não serem expressas da mesma forma durante o processo de hematofagia, permitindo assim que o carrapato possa se evadir do sistema imune do hospedeiro. Ainda que muitos componentes salivares já tenham sido caracterizados, nem todos tiveram suas funções esclarecidas. Por isso, identificar a função de tantas proteínas salivares é ainda um desafio (FRANCISCHETTI et al., 2009).

6. Proteases

As proteases são enzimas proteolíticas que atuam catalisando a hidrólise de ligações ligação peptídicas em peptídeos e proteínas, tendo como produtos polipeptídeos menores e aminoácidos. Essas enzimas podem clivar peptídeos na

porção C- ou N-terminal, as chamadas de exopeptidases, ou clivar ligações internas da cadeia de aminoácidos, sendo nesse caso denominadas de endopeptidases (BARRET et al., 2004).

6.1 Serino-proteases

A classe de enzimas proteolíticas das serino-proteases é encontrada em todos os reinos de vida celular, bem como em genomas virais. Elas se caracterizam pela presença de um resíduo nucleofílico de serina no seu sítio ativo. O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica composta das cadeias laterais dos aminoácidos ácido aspártico, histidina e serina. Outras tríades e díades têm sido descobertas: serina, histidina, glutamato; serina e lisina; serina e histidina; histidina, serina, histidina (HEDSTROM 2002; GETTINS 2002). Exemplos de enzimas dessa família são tripsina, quimotripsina, elastase, trombina e plasmina, calicreína.

6.2 Cisteíno-proteases

Esta classe de enzimas proteolíticas compreende moléculas que hidrolisam ligações peptídicas por um mecanismo de catálise que envolve um resíduo reativo de cisteína presente no sítio catalítico. Cisteíno-proteases são encontradas em vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas e mamíferos. Geralmente, estão envolvidas no catabolismo intracelular de proteínas e peptídeos, no processamento de pró-enzimas e pró-hormônios, na quebra de colágeno e na reabsorção óssea. Além disso, podem ser encontradas auxiliando a modulação da penetração e destruição

de tecidos por células tumorais metastáticas e também durante a infecção por microrganismos (BOBEK 1992; OTTO 1997). Exemplos de enzimas dessa família são a papaína, catepsinas B, H, L e C.

7. Famílias inibidoras de proteases

7.1 Domínio Kunitz

A família de inibidores do tipo Kunitz compreende proteínas de baixo peso molecular com ponto isoelétrico básico ($pI > 7$) e que possuem ampla atividade como inibidores de serino-proteases. Essas moléculas são pequenas, possuindo em média 50 resíduos de aminoácidos ligados por pontes dissulfeto, conservadas nos motivos 1-6, 2-4 e 3-5, e podem ser encontradas em uma ampla variedade de proteínas no sub-reino *Eumetazoa* (CREIGHTON, 1975; BOZAS, 1995; CORRAL-RODRÍGUEZ, 2009).

Ainda, as proteínas que contêm o domínio Kunitz podem ser classificadas em: heterogêneas, quando em combinação com outras estruturas por exemplo, a proteína precursora amiloide/nexina 2 protease (APP/PN2); e homogênea, quando há repetições em *tandem* do domínio Kunitz, por exemplo a proteína inibidora do fator tecidual (TFPI) da coagulação do sangue (CORRAL-RODRÍGUEZ, 2009).

7.2 Serpinas

A superfamília das serpinas (*serine proteinase inhibitors*) está amplamente distribuída pelos eucariotos, e recebeu esta denominação devido ao fato da maioria

das proteínas identificadas serem inibidoras de serino-proteases. No entanto, moléculas sem atividade inibitória, como a ovoalbumina (HUNT; DAYDOFF, 1980), o angiotensinogênio (DOLITTLE, 1983) e inibidores de cisteíno-proteases e de caspases também foram identificadas como membros da família (GETTINS, 2002; LAW, 2006). A grande maioria das proteínas desta família possui como função primária a regulação proteolítica de eventos que estão associados a várias vias bioquímicas, mas também podem atuar como transportadoras de hormônios (globulina ligadora de cortisol, globulina ligadora de tiroxina), reguladores da pressão sanguínea (angiotensinogênio) e supressores tumorais (maspina (ZOU, 1994)) (POTEMPA, 1994; LAW, 2006).

As serpinas são proteínas de 330 a 500 resíduos de aminoácidos que utilizam uma grande e única modificação conformacional para inibir proteases (LAW, 2006). Estas moléculas são formadas por um domínio principal, o qual contém três β -folhas e 8-9 α -hélices, além disso, possui um loop central reativo, onde ocorrem as interações iniciais com as proteases (HUNTINGTON, 2000; GETTINS, 2002). Desta forma, uma região de aproximadamente 350 resíduos forma um domínio com uma conformação terciária que está conservado em todas as serpinas. O tamanho da serpina varia em função de pequenas inserções ou deleções para formação de loops ou alongamento/encurtamento de α -hélices (GETTINS, 2002).

7.3 Cistatinas

A superfamília das cistatinas compreende moléculas inibidoras de cisteíno-proteases, as quais foram subdivididas em três famílias: estefinas (tipo 1), cistatinas (tipo 2) e cininogênios (tipo 3). Esta superfamília tem como característica a estabilidade em altas temperaturas (acima de 100° C) e pH extremo (TURK; BODE, 1991; OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; FRANCISCHETTI et al., 2009).

As estefinas possuem peso molecular aproximado de 11kDa (média de 100 resíduos de aminoácidos) e não possuem pontes dissulfeto e resíduos de carboidratos. Exemplo de moléculas desta família são as cistatinas humanas A e B, e cistatinas α e β de ratos. Similarmente, as moléculas da família das cistatinas (tipo 2) possuem peso molecular de 12-13kDa (110-120 resíduos de aminoácidos) e a maioria das moléculas não possuem resíduos de carboidratos, mas possuem pontes dissulfeto na porção C-terminal. Exemplo desta família são as cistatinas C, D, S, SA e SN. Já os cininogênios possuem peso molecular maior, podendo variar de 50 a 120kDa, pontes dissulfeto e resíduos de carboidratos. A cadeia N-terminal (pesada) é idêntica nos cininogênios, sendo a parte C-terminal (leve) o que os diferencia. Além da função como inibidor de cisteíno-proteases, são também precursores dos peptídeos vasodilatadores calidina e bradicinina (OTTO; SCHIRMEISTER 1997; FRANCISCHETTI et al., 2009).

8. Coagulação sanguínea baseada em célula

A clássica cascata de coagulação sanguínea foi proposta por Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), na qual a coagulação acontece através de duas vias distintas, intrínseca e extrínseca, ocorrendo interações entre proteínas, sendo a maioria zimogênios de enzimas proteolíticas que passam à sua forma ativada por ação do componente anterior da via (também uma enzima proteolítica), levando à formação do coágulo de fibrina. Embora o modelo em cascata tenha auxiliado significativamente o entendimento de desordens e das interações entre os fatores de coagulação, este não reflete completamente o que acontece na hemostasia *in vivo* (HOFFMAN, 2003a).

Uma descrição melhor da cascata foi proposta por Hoffman (2003a), o qual descreveu um modelo de coagulação baseado em célula, ressaltando a importância da interação entre a superfície celular e as proteínas plasmáticas para que ocorra o início da coagulação, mantendo a ideia de que o processo é dependente de reações bioquímicas e da ativação de fatores de coagulação. Neste modelo, os processos físicos, celulares e bioquímicos ocorrem em fases, e não em duas vias como anteriormente apresentado. Os estágios propostos por Hoffman (2003a) são descritos a seguir e ilustrados na Fig. 2:

Fase de iniciação. Acontece nas células que expressam o fator tecidual (TF – *tissue factor*), no entanto, este só entra em contato com o sangue quando há lesão ou inflamação. Fibroblastos do estroma, células mononucleares, macrófagos e

células endoteliais são exemplos de células que expressam TF. Quando ocorre a lesão, o fator VII, presente no sangue, liga-se ao TF e é rapidamente ativado por proteases, assim formando o complexo TF/FVIIa. Este, por sua vez, ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X. O FXa, juntamente com seu cofator FVa (pode ser ativado pelo FXa ou por proteases não coagulantes), formam o complexo protrombinase, o qual é responsável por expressar pequenas quantidades de trombina na superfície das células que expressam TF. Inibidores específicos, como o TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) e antitrombina III, localizam o FXa apenas na superfície em que este é formado (HOFFMAN, 2003a; FERREIRA, et al., 2010).

Esta fase do processo de coagulação ocorre, em menor nível, o tempo todo no espaço extravascular, mesmo quando não há lesão, sendo este fenômeno chamado de coagulação basal. Nesse caso, não há formação de coágulos porque as plaquetas e o complexo FVIII/vWF estão ausentes, no entanto, quando há lesão vascular, inicia-se a fase de amplificação (HOFFMAN, 2003a; FERREIRA et al., 2010).

Fase de amplificação. Devido à lesão, componentes do sistema hemostático, como plaquetas, FVIII e fator de von Willebrand (vWF), tornam-se livres e entram em contato com a trombina formada desde a fase de iniciação. As plaquetas ativadas expõem receptores e sítios de ligação para os fatores da coagulação ativados, além de liberar FV parcialmente ativado. Devido à permeabilidade de sua membrana, há

entrada de Ca^{+2} e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores de coagulação. A trombina ativa FV e FVIII na superfície das plaquetas, dissociando o complexo FVIII/vWF e permitindo que o vWF plasmático atue como mediador da adesão e agregação plaquetária. Além disso, a trombina também ativa o FXI, o qual se liga com alta afinidade aos sítios expostos na superfície das plaquetas (HOFFMAN, 2003a; FERREIRA, et al., 2010).

Fase de propagação. O FIXa se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas, formando o complexo tenase (ou Xase). O FXIa pode produzir uma quantidade adicional de FIXa. O complexo tenase produz mais quantidade de FXa, e este por sua vez, associa-se ao FVa ligado à plaqueta, assim formando o complexo protrombinase. O complexo agora formado converte protrombina em trombina, a qual cliva o fibrinogênio e monômeros de fibrina. A trombina formada também converte o FXIII em FXIIIa, o qual catalisa a modificação covalente entre monômeros de fibrina, formando a rede estável de fibrina (HOFFMAN, 2003a; FERREIRA et al., 2010).

Fase de finalização. O processo da coagulação deve limitar-se a área lesada para não haver uma coagulação disseminada que levaria a bloqueio do vaso sanguíneo e a formação de trombos. Assim, o TFPI, secretado pelo endotélio, forma o complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI, inativando os fatores ativados. A proteína C, uma glicoproteína ativada pela trombina, promove a proteólise dos cofatores Va e VIIIa. A

antitrombina III inibe a atividade da trombina e outras serino-proteases, como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (Hoffman 2003b; Ferreira et al., 2010).

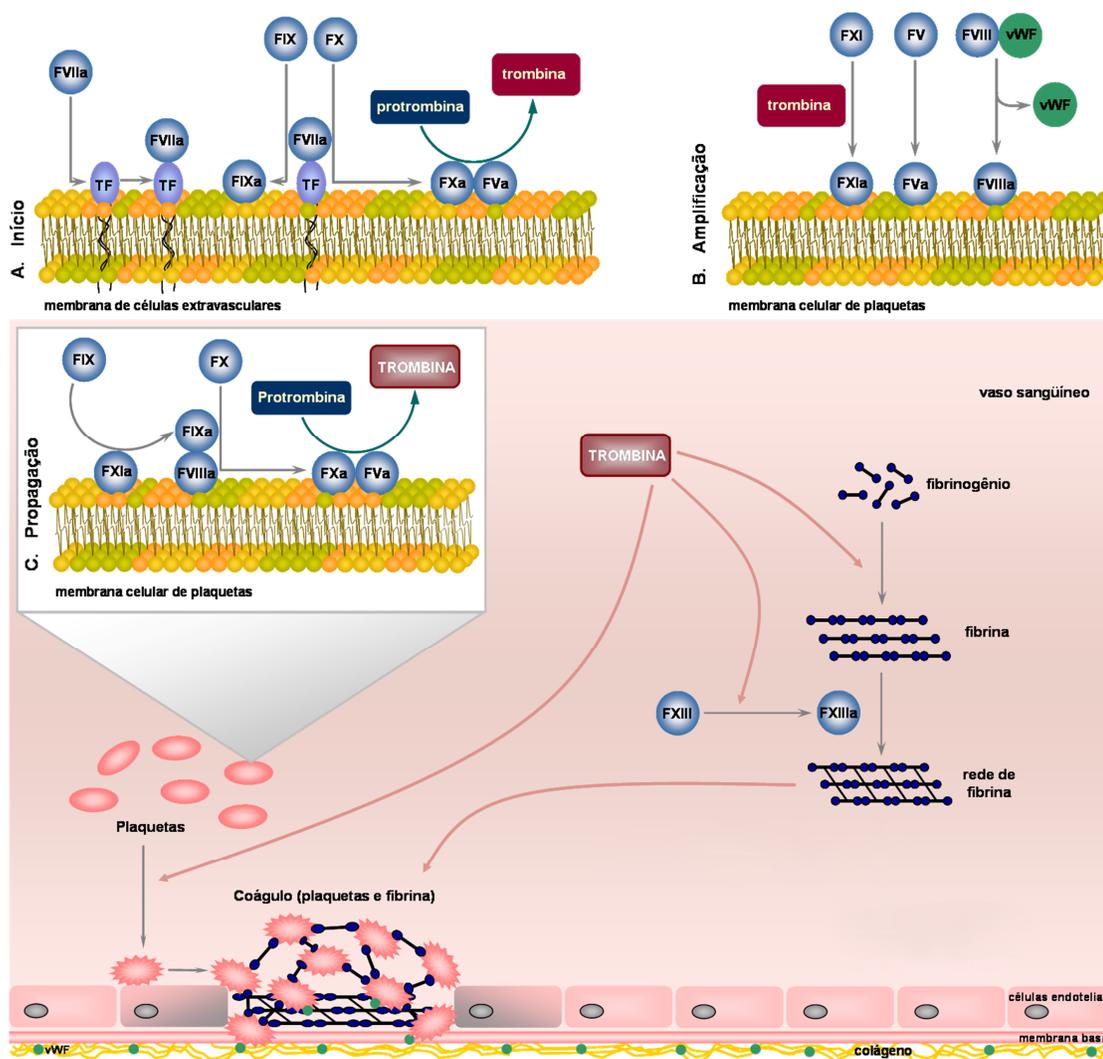


Figura 2 - Representação diagramática da coagulação sanguínea pelo modelo baseado em célula. Adaptado de Pinto et al., 2010.

8.1. Inibidores de trombina de *R. microplus*

A trombina é uma serino-protease de papel chave na hemostase, pois forma o coágulo de fibrina, induz a agregação plaquetária e regula sua própria produção pela ativação de outros fatores da cascata de coagulação (fV, fVIII, fXI e proteína C).

Três sítios de ligação funcionais foram identificados na trombina: o sítio ativo e os exosítios I e II (STUBBS; BODE, 1995; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA, 2013).

O exosítio I medeia a ligação seletiva de trombina ao fibrinogênio, fibrina, receptor plaquetário 1 e 4, estafilocagulase e hirudina; enquanto que o exosítio II, um *cluster* de resíduos positivamente carregados, reconhece heparina, o receptor plaquetário GP Ib-IX-V (as glicoproteínas Ib, IX e V formam um complexo ligado de forma não-covalente), domínio 2 de protrombina (CLEMETSON; CLEMETSON, 1995; BOCK et al., 2007).

O sítio ativo e a afinidade dos ligantes do exosítio I são alostericamente regulados pela ligação de Na^+ , o qual faz a troca da forma *lenta* da trombina para a forma *rápida*. Nesta forma há alta especificidade aos substratos pró-coagulantes, fibrinogênio e receptor plaquetário 1, maior reatividade para anti-trombina, e aumento da atividade de substrato. Já na forma *lenta*, há maior especificidade na ativação da proteína C. Portanto, o Na^+ regula as funções pró-coagulante e anticoagulante da trombina (DI CERA, 2006; BOCK et al, 2007).

A primeira molécula de *R. microplus* inibidora de trombina foi purificada da saliva do carrapato dos bovinos, descrita por Horn et al. em 2000, sendo chamada de BmAP (*Boophilus microplus* Anticoagulant Protein). Esta proteína possui massa molecular de 60kDa e liga-se ao sítio ativo da enzima, podendo também ligar-se a outro sítio, já que em ensaio de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose

com trombina aderida, a BmAP ligou-se à trombina quando esta estava com seu sítio ativo bloqueado por substrato. A BmAP é capaz de inibir a atividade de trombina sobre o fibrinogênio quando em concentração pelo menos 10 vezes maior do que a enzima. Sua atividade sobre outras serino-proteases também foi testada, mostrando inibir quimotripsina, mas necessita de uma concentração 500 vezes maior do que a concentração de enzima, sugerindo ter esta também como alvo.

Em 2006, Ciprandi et al. identificaram um segundo inibidor de trombina na saliva de *R. microplus*, um pequeno peptídeo de 1,7kDa denominado de microfilina. Diferentemente da BmAP, este peptídeo inibe a enzima ligando-se ao exossítio I. Devido a este sítio ser altamente carregado positivamente, supõem-se que a microfilina seja rica em resíduos acídicos. Esta proteína inibe trombina de maneira dependente da dose: a clivagem de fibrinogênio é inibida com IC₅₀ de 5,5µg, enquanto que a agregação plaquetária induzida por trombina é inibida com IC₅₀ de 5,8µg.

Semelhantemente, em 2007 Ricci et al. identificaram a proteína BmGTI (*B. microplus* gut thrombin inhibitor), que após purificações apresentou dois padrões de bandas em SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), de pesos moleculares de 26kDa e 22kDa. Esta proteína foi purificada do intestino do carrapato dos bovinos, e mostrou-se eficiente em inibir, de maneira dose-dependente, a coagulação do sangue (quando na presença de 1,4µg

de BmGTI) e a agregação plaquetária (quando na presença de 2,8µg de BmGTI) induzidas por trombina. Assim como a microfilina, a BmGTI liga-se ao exosítio I da trombina, não mostrando inibição à outras serino-proteases. A presença de moléculas anticoagulantes na saliva e no intestino demonstra a importância destas para o sucesso da hematofagia, mantendo a fluidez sanguínea durante o processamento do alimento.

Macedo-Ribeiro et al. (2008) identificaram e caracterizaram estruturalmente uma proteína inibidora de trombina a partir de um extrato bruto de teleóginas de *R. microplus*, a qual denominaram boophilina (números de acesso no GenBank CAC82583 e CAC82582). Já em 2012, Soares et al., identificaram a presença de boophilina no intestino médio de teleóginas, através da análise do cDNA de diversos tecidos.

A análise em espectrometria de massa MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*) demonstrou que a proteína tem peso molecular de 13,9kDa, possuindo dois domínios do tipo Kunitz. A boophilina, na concentração de 0,1µM, eficientemente dobrou o tempo de coagulação de trombina; assim como teve efeito sobre tempo de protrombina, quando na concentração de 0,4µM. Quanto ao tempo de tromboplastina, mostrou-se menos eficiente, necessitando-se de uma concentração de 1,7µM. A boophilina também mostrou habilidade em inibir outras serino-proteases, como a tripsina e a plasmina

Através do estudo do cDNA de boophilina e a expressão da proteína recombinante em sistema heterólogo procarioto, foi demonstrado como ocorre a inibição da trombina por esse inibidor. A cadeia C-terminal de boophilina parece interagir com o exosítio I, e a cadeia N-terminal com o sítio ativo. A ligação ao exosítio I ocorre para manter substratos (como a proteína C e o inibidor de fibrinólise ativado por trombina) e inibidores em situação desfavoráveis a uma distância suficiente para que a boophilina possa ter acesso ao sítio ativo (MACEDO-RIBEIRO et al., 2008). O silenciamento da boophilina por RNA de interferência reduziu em 20% a produção de ovos em relação ao grupo controle (carrapatos que não receberam RNAi), após 24 e 48h. A aparente baixa eficiência deste silenciamento pode ser devido à presença de outras proteínas inibidoras do tipo Kunitz, que tem como alvo as mesmas enzimas que a boophilina (SOARES et al., 2012).

8.2. Inibidores em outras espécies de carrapato

Inibidores de trombina e FXa são a maioria das proteínas anticoagulantes descritas, pois ambas atuam em uma via comum na cascata de coagulação sanguínea. Diversos inibidores de trombina já foram identificados em espécies de carrapatos, no entanto, serão aqui apresentadas as proteínas presentes nas glândulas salivares ou saliva. A tabela 1 lista as demais proteínas inibidoras de trombina, bem como de FX e FXa.

A ornithodorina (número de acesso no GenBank P56409), proteína do tipo Kunitz de 12,6kDa presente na glândula salivar do carrapato mole *Ornithodoros moubata*, possui dois domínios que contém 53 e 55 aminoácidos nas cadeias N-terminal e C-terminal, respectivamente, as quais estão ligadas por sete resíduos. A cadeia N-terminal liga-se ao sítio ativo da trombina, enquanto que a porção C-terminal se liga ao exosítio I (VAN DE LOCHT et al., 1996). Semelhantemente, Nienaber et al. (1999) identificaram a savignina (número de acesso AAL37210) em glândula salivares do carrapato mole *Ornithodoros savignyi*, a qual também se liga ao sítio ativo e ao exosítio I. Esta molécula de 12,4kDa difere-se, na sua cadeia N-terminal, em apenas um aminoácido da ornithodorina: o resíduo 4 da primeira é uma arginina, enquanto que segunda molécula é uma leucina. A savignina possui alto conteúdo de cisteína, e provavelmente possui estabilidade devido a pontes dissulfeto (NIENABER et al., 1999).

Em 2003, Iwanaga et al. descreveram duas proteínas presentes nas glândulas salivares de *Haemaphysalis longicornis*, as quais não têm similaridade com outras proteínas previamente descritas. Mandanina-1 (número de acesso no GenBank AAP04349) e mandanina-2 (número de acesso no GenBank AAP04350) possuem 79% de identidade entre elas, o cDNA delas contém ORFs de 240 e 243pb, codificando polipeptídeos de 79 e 80 aminoácidos, respectivamente. Essas proteínas de aproximadamente 6 e 7 kDa (IWANAGA et al., 2003), são hidrolisadas

pela trombina e pelo fator Xa. Na trombina, ligam-se ao sítio ativo e são clivadas em três fragmentos de mandanina-1 e de três fragmentos de mandanina-2, enquanto que a clivagem pelo FXa forma dois e três fragmentos, respectivamente. Os produtos de hidrólise não possuem atividade inibitória, portanto, as mandaninas parecem ter papel inibitório por competição com substratos naturais (FIGUEIREDO et al., 2013).

A proteína variegina (número de acesso P85800) foi identificada nas glândulas salivares do carrapato *Amblyomma variegatum*. Este polipeptídeo contém 32 resíduos de aminoácidos, e sua ligação à trombina ocorre no sítio ativo, por aminoácidos centrais (8 ao 14), e no exosítio I, pela cadeia C-terminal (15 ao 32). A porção N-terminal mostrou regular a cinética da ligação variegina-trombina, pois a ausência desta cadeia fez com que a ligação seja mais lenta. Da mesma forma que as mandaninas, a variegina também é clivada pela trombina, formando dois fragmentos, porém uma significativa perda da atividade inibitória ocorre após um longo período de incubação de 24h (KOH et al., 2007).

Outra proteína identificada na glândula salivar de carrapato é a americanina, no *Amblyomma americanum*. Esta molécula mostra inibição específica reversível a trombina, outras proteases e serino-proteases não foram inibidas. Através de SDS-PAGE, foi possível observar uma proteína de peso molecular de 12kDa e duas bandas, sugerindo que esta proteína possua duas isoformas ou modificações pós-

tradicionais, como glicosilações, ou ainda que seja apenas artifícios da técnica (ZHU et al., 2007).

Tabela 1 - Características de proteínas inibidoras de trombina e FXa em diferentes espécies de carrapato.

Espécie	Proteína	Enzima alvo	Localização	Peso molecular (kDa)	Número de acesso no GenBank	Estrutura	Referência
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	FXa	Glândula salivar	15,7	AAK83022	tipo-Kunitz	FRANCISCHETTI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005
<i>Ixodes scapularis</i>	Penthalaris	FXa	Glândula salivar	35	AAM93638	tipo-Kunitz	FRANCISCHETTI et al., 2004
<i>Ixodes scapularis</i>	Salp14	FXa	Saliva	13,97		serpina	NARASIMHAN et al., 2002
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	FXa	Glândula salivar	6	P17726	tipo-Kunitz	WAXMAN et al., 1990
<i>Ornithodoros savignyi</i>	fXal	FXa	Glândula salivar	7	AAN76827	alta semelhança com TAP	GASPAR et al., 1996; JOUBERT et al., 1998
<i>Hyalomma truncatum</i>		FXa	Glândula salivar	17			JOUBERT et al., 1995
<i>Amblyomma cajannense</i>	Amblyomin-X	FXa	cDNA	13	AAT68575		BATISTA et al., 2010
<i>Heamaphysalis dromedarii</i>		FXa e trombina	Ninfa	15			IBRAHIM et al., 2001a
<i>Hyalomma dromedarii</i>	NTI-1	Trombina e FXa	Ninfa	3,2			IBRAHIM et al., 2001b
<i>Hyalomma dromedarii</i>	NTI-2	Trombina e FXa	Ninfa	14,9			IBRAHIM et al., 2001b

<i>Boophilus calcaratus</i>	Calcaratin	Trombina	Veneno	14,5			MOTOYASHIKI et al., 2003
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hemalin	Trombina	Intestino Médio	20	BAH02683	tipo-Kunitz	LIAO et al., 2009
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixophilin	Trombina	Intestino	18	EEC05545	tipo-Kunitz	NARASIMHAN et al., 2013
<i>Amblyoma americanum</i>	Amblin	Trombina	Hemolinfa	18	AAR97367	tipo-Kunitz	LAI et al., 2004
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HLS1	Trombina	Intestino Médio	41		serpina	SUGINO et al., 2003

9. Conclusão

A necessidade de um método eficiente para o controle do carrapato dos bovinos é evidente devido aos grandes prejuízos, causados tanto pela espoliação dos animais parasitados quanto pela transmissão de doenças que podem levar à morte do animal, à pecuária bovina. Isso levou à intensa busca por antígenos ocultos e expostos que possam ser utilizados em vacinas.

Inibidores da cascata de coagulação sanguínea mostram-se um alvo interessante para o desenvolvimento de uma vacina contra o *R. microplus*. Inibidores da trombina especialmente, pois a trombina destaca-se por estar em uma via comum para formação dos coágulos e porque ativa outros fatores da cascata. A identificação e caracterização de inibidores da cascata já foi feita em várias espécies, e abre caminho para que isto ocorra também para *R. microplus*. Além disso, uma vacina cruzada, que conciliasse proteínas provenientes de diferentes espécies, poderia ser interessante pois seu amplo espectro facilitaria alcançar diferentes escopos, inclusive outras espécies até então não alvejadas.

Da mesma forma que o organismo do hospedeiro tem seus mecanismos de defesa redundantes, é possível que as moléculas utilizadas pelo carrapato para o sucesso do parasitismo também sejam redundantes, pois desempenham funções muito similares. Assim, além de identificar novas proteínas, é preciso caracterizar as proteínas já descritas para o melhor entendimento dos eventos de interação

parasito-hospedeiro e o desenvolvimento de mecanismos eficazes de controle do carrapato dos bovinos.

Referências

ALMAZÁN, C.; MORENO-CANTÚ, O.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; CANALES, M.; VILLAR, M.; DE LA FUENTE, J. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine**, v. 30, p. 265– 272, 2012.

ALMEIDA, A. K.; MICHELS, I. L. O Brasil e a economia-mundo: o caso da carne bovina. **Ensaio FEE**, v. 33, n. 1, p. 207-230, 2012.

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. 1.ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. 36p.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2 ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press., 2004. 1048p.

BATISTA, I. F. C.; RAMOS, O. H. P.; VENTURA, J. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HOB, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, p. 151–156, 2010.

BECHARA, G. H.; MORELLI JR, J.; SZABÓ, M.P.J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 570-575, 2000.

BOBEK, L. A.; Levine, M. J. Cystatins — Inhibitors of Cysteine Proteinases. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, n. 4, p. 307-332, 1992.

BOCK, P. E.; PANIZZI, P.; VERHAMME, I. M. A. Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 81–94, 2007.

BOZAS, S. E.; PANACCIO, M.; CREANEY, J.; DOSEN, M.; PARSONS, J. C.; VLASUK, G. V.; WALKER, I. D.; SPITHILL, T. W. Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 74, p.19-29, 1995.

CARISSIMI, André Silva. **Purificação e caracterização parcial de uma arilamidase ligada à membrana do carrapato *Boophilus microplus***. 1993. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CIPRANDI, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 4, p. 250-262, 2003.

CIPRANDI, A.; OLIVEIRA, S. K.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 40–46, 2006.

CLEMETSON, K. J.; CLEMETSON, J. M. Platelet GPIb-V-IX Complex. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 21, n. 2, p. 130-136, 1995.
complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, p. 923-926, 2000.

CORRAL-RODRÍGUEZ, M. A.; MACEDO-RIBEIRO, S.; Pereira, P. J. B.; FUENTES-PRIOR, P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 579–595, 2009.

CREIGHTON, T. E. Homology of protein structures: proteinase inhibitors. **Nature**, v. 255, p. 743-745, 1975.

CRUZ, A.P.R.; SILVA, S.S.; MATTOS, R.T.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A.; FERREIRA, C.A.S. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 152–158, 2008.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRÍQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 15, p. 143–148, 1999.

DI CERA, E. Thrombin: a paradigm for enzymes allosterically activated by monovalent cations. **Rend. Fis. Acc. Lincei**, v. 17, p. 97-113, 2006.

DOOLITTLE, R. F. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. **Science**, v. 222, p. 417–419, 1983.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FIGUEIREDO, A. C.; SANCTIS, D.; PEREIRA, P. J. B. The Tick-Derived Anticoagulant Madanin Is Processed by Thrombin and Factor Xa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-11, 2013.

FRANCISCHETTI, I. M. B; SÁ-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M.; RIBEIRO, J. M.C. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2051-2088, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; VALENZUELA, J. G.; ANDERSEN, J. F.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Hemostasis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 99, n. 10, p. 3602-3612, 2002.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. **Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras**. 1ª.ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. 6p.

FURLONG, J.; SALES, R. O. Controle Estratégico de Carrapatos no Bovino de Leite: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.01, n.02, p.44–72, 2007.

GASPAR, A. R. M. D.; JOUBERT, A.M.; CRAUSEF, J.C.; NEITZ, A.W.H. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental & Applied Acarology**, v. 20, p. 583-598, 1996.

GETTINS, P. G. W. Serpin Structure, Mechanism, and Function. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4751-4803 2002.

GOMES, A.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred nellore, ibage and Nellore x european crossbreds in the Brazilian savanna. **Tropical Animal Health and Production**, v. 21, p. 20-24, 1989.

GONÇALVES, R. C.; DA SILVA, A. A.; FERREIRA, D. O. L.; CHIACCHIO, S. B.; LOPES, R. S.; BORGES, A. S.; AMORIM, R. M. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 32, n. 1, p. 307-312, 2011.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012b.

GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; DE LEÓN, A. A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?. **International Journal for Parasitology**, n. 42, p. 421–427, 2012a.

HAJDUSEK, O.; ALMAZÁN, C.; LOOSOVA, G.; VILLAR, M; CANALES, M.; GRUBHOFFER, L.; KOPACEK, P.; DE LA FUENTE, J. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v.28, p.2993–2998, 2010.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4501-4523, 2002.

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Reviews**, v. 17, p. 51-55, 2003b.

HOFFMAN, M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16, p. 17–20, 2003a.

HORN, F.; SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* Anticoagulant Protein: An Antithrombin Inhibitor Isolated from the Cattle Tick Saliva. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 1, p. 68–73, 2000.

HUNT, L. T.; DAYHOFF, M. O. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III and alphasproteinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 95, p. 864-871, 1980.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease
IBRAHIM, M. A.; GHAZY, A. H.; MAHAREM, T. M.; KHALIL, M. Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 501-512, 2001a.

IBRAHIM, M. A.; GHAZY, A. H.; MAHAREM, T.; KHALIL, M. Isolation and properties of two forms of thrombin inhibitor from the nymphs of the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, p. 675–698, 2001b.

IWANAGA, S.; OKADA, M.; ISAWA, H.; MORITA, A.; YUDA, M.; CHINZEI, Y. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1926–1934, 2003.

JONSSON, N. N.; MAYER, D. G.; GREEN, P.E. Possible risk factors on Queens land dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 79–92, 2000.

JOUBERT, A. M.; CRAUSE, J. C.; GASPAR, A. R. M. D.; CLARKE, E. C.; SPICKE, A. M.; NEITZ, A. W. H. Isolation and characterization of an anticoagulant present in

the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 19, p. 79-92, 1995.

JOUBERT, A. M.; LOUW, A. I.; JOUBERT, F.; NEITZ, A. W. H. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 22, p. 603–619, 1998.

KAZIMIROVA, M.; STIBRÁNIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-19, 2013.

KIDD, H; JAMES, D. **The agrochemicals handbook**. 3^a ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry Information Services, 1991. 1100p.

KOH, C. Y.; KAZIMIROVA, M.; TRIMNELL, A.; TAKAC, P. T.; LABUDA, M.; NUTTALL, P. A.; KINI, R. M. Variegin, a Novel Fast and Tight Binding Thrombin Inhibitor from the Tropical Bont Tick. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29101–29113, 2007.

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; JONCZY, J.; REES, H. H.; TURNER, P. C. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Gene**, v. 342, p. 243– 249, 2004.

LAW, R. H. P.; ZHANG, Q.; MCGOWAN, S.; BUCKLE, A. M.; SILVERMAN, G. A.; WONG, W.; ROSADO, C. J.; LANGENDORF, C. G.; PIKE, R. N.; BIRD, P. I.; WHISSTOCK, J. C. An overview of the serpin superfamily. **Genome Biology**, v. 7, n. 5, p. 216.1-216.11, 2006.

LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 341–345, 2006.

LIAO, M.; ZHOU, J.; GONG, H.; BOLDBAATAR, D.; SHIRAFUJI, R.; BATTUR, B.; NISHIKAWA, Y.; FUJISAKI, K. Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 165–174, 2009.

MACEDO-RIBEIRO, S.; ALMEIDA, C.; CALISTO, B. M.; FRIEDRICH, T.; MENTELE, R.; STURZEBECKER, J.; FUENTES-PRIOR, P.; PEREIRA, P. J. B. Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1-17, 2008.

MACFARLANE R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; BUZATTI, A.; KLOSTER, F. S.; L. K. SPRENGER; COIMBRA, E.; SOARES, L.D. Partial selective treatment of *Rhipicephalus microplus* and breedresistance variation in beef cows in Rio Grande do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 234–239, 2013.

MONTEIRO, R. Q.; REZAIE, A. R.; RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Ixolaris: a Factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. **Biochemical Journal**, v. 387, p. 871-877, 2005.

MOTOYASHIKI, T.; TU, A. T.; AZIMOV, D. A.; IBRAGIM, K. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 235–241, 2001.

NARASIMHAN, S.; KOSKI, R. A.; BEAULIEU, B.; ANDERSON, J. F.; RAMAMOORTHY, N.; KANTOR, F.; CAPPELLO, M.; FIKRIG, E. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 6, p. 641–650, 2002.

NARASIMHAN, S.; PEREZ, O.; MOOTIEN, S.; DEPONTE, K.; KOSKI, R. A.; FIKRIG, E.; LEDIZET, M. Characterization of Ixophilin, A Thrombin Inhibitor from the Gut of *Ixodes scapularis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NIENABER, J.; GASPAR, A. R. M.; NEITZ, A. W. H. Savignin, a Potent Thrombin Inhibitor Isolated from the Salivary Glands of the Tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 82–91, 1999.

NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M.; LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 155-163, 2006.

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). **Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina**. Roma, 2003. 51p.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 133-171, 1997.

PARIZI, L. F.; GITTHAKA, N. K.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; MASUDA, A.; OHASHI, K.; VAZ JUNIOR, I. S. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, v. 194, p. 158–165, 2012a.

PARIZI, L. F.; RECK JR, J.; OLDIGES, D. P.; GUIZZO, M. G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P. L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J. R.; VAZ JUNIOR, I. S. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, p. 6912–6917, 2012b.

PARIZI, L. F.; UTIUMI, K. U.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; OHASHI, K.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. S. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 113–118, 2011.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gutprotein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 163–172, 2002.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; GONZÁLEZ, C. Z.; GUZMÁN, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; AFONSO, L. C. C.; VALENTE, F. L.; PECONICK, A. P.; MARCIANO, A. P.; PATARROYO V, A. M.; SOSSAI, S. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm74621 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 333–339, 2009.

PECONICK, A. P.; SOSSAI, S.; GIRÃO, F. A.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SOUZA E SILVA, C. H.; GUZMAN, F.; PATARROYO V, A. M.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 37–43, 2008.

PEGRAM, R. G. Getting a Handle on Tick Control: a Modern Approach May Be Needed. **The Veterinary Journal**, n. 161, p. 227–228, 2001.

PINTO, A. F. M.; BERGER, M.; RECK JR., J.; TERRA, R. M. S.; GUIMARÃES, J. A. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. **Toxicon**, v. 56, p. 1103–1112, 2010.

POTEMPA, J.; KORZUS, E.; TRAVIS, J. The Serpin Superfamily of Proteinase Inhibitors: Structure, Function, and Regulation. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 269, n. 23, p. 15957-15960, 1994.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143-52, 1995.

RICCI, C. G.; PINTO, A. F. M.; BERGER, M.; TERMIGNONI, C. A thrombin inhibitor from the gut of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, p. 291–300, 2007.

RIDING, G. A.; JARMEY, J.; MCKENNA, R. V.; PEARSON, R.; COBON, G. S.; WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 11, p. 5158-5166, 1994.

ROCHA, C. M.B.M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus*. **Boletim da Universidade Federal de Lavras**, 1997.

RODRIGUES, D.S.; LEITE, R.C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.

SEIXAS, A.; LEAL, A.T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C.; VAZ JUNIOR, I. S. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading

enzyme (VTDCE). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, p. 332–340, 2008b.

SOARES, T. S.; WATANABE, R. M. O.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TORQUATO, R. J. S.; LU, S.; FIGUEIREDO, A. C.; PEREIRA, P. J. B.; TANAKA, A. S. Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 521–528, 2012.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, p. 848-1055, 2004.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of Pyrethroid insecticides. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 77-96, 1989.

STIBRANIOVA, I.; LAHOVA, M.; BARTIKOVA, P. Immunomodulators in tick saliva and their benefits. **Acta Virologica**, v. 57, p. 200-216, 2013.

STUBBS, M. T.; BODE, W. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, p. 23-28, 1995.

SUGINO, M.; IMAMURA, S.; MULENGA, A.; NAKAJIMA, M.; TSUDA, A.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. **Vaccine**, v. 21, p. 2844–2851, 2003.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, n. 2, p. 213-219, 1991.

TURNI, C.; LEE, R. P.; JACKSON, L. A. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. **Parasite Immunology**, v. 24, p. 355-361, 2002.

VAN DE LOCHT, A.; STUBBS, M. T.; BODE, W.; FRIEDRICH, T.; BOLLSCHWEILER, C.; HOFFKEN, W.; HUBER, R. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 22, p. 6011-6017, 1996.

VAZ JUNIOR, I. S.; MARTINEZ, R. H. M.; Oliveira, A.; Heck, A.; Logullo, C.; GONZALES, J. C.; DEWES, H.; MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p.155-160, 1996.

VAZ JUNIOR, I. S.; SEIXAS, A.; MASUDA, A. Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato. In: Tópicos avançados em entomologia molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012. 27p.

WAXMAN, L.; SMITH, D. E.; ARCURI, K. E.; VLASUK, G. P. Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Is a Novel Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *Science*, v. 248, p. 593-596, 1990.

WIKEL, S .K. Host immunitytoticks. **AnnualReviewofEntomology**, v. 41, p. 1-22, 1996.

WILLADSEN, P; RIDING, G.A.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G.S.; GOUGH, J.M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, v. 4, n. 143, p. 1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367-387, 2004.

WILLADSEN, P.; EISEMANN, C. H.; TELLAM, R. L. "Concealed" Antigens: Expanding the Range of Immunological Targets. **Parasitology Today**, v. 9, n. 4, p. 132-135, 1993.

WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G.; McKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 241–246, 1996.

ZHU, K.; BOWMAN, A. S.; BRIGHAM, D. L.; ESSENBERG, R. C.; DILLWITH, J. W.; SAUER, J. R. Isolation and Characterization of Americanin, a Specific Inhibitor of Thrombin, from the Salivary Glands of the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* (L.). **Experimental Parasitology**, n. 87, p. 30–38, 1997.

ZIVKOVIC, Z.; TORINA, A.; MITRA, R.; ALONGI, A.; SCIMECA, S.; KOCAN, K. M.; GALINDO, R. C.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E. F.; VILLAR, M.; NIJHOF, A. M.; MANI, R.; LA BARBERA, G. ; CARACAPPA, S.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. **BMC Immunology**, v. 11, n. 7, p. 1-12, 2010.

ZOU, Z.; ANISOWICZ, A.; HENDRIX, M. J. C.; THOR, A.; NEVEU, M.; SHENG, S.; RAFIDI, K.; SEFTOR, E.; SAGERT, R. Maspin, a Serpin with Tumor-Suppressing Activity in Human Mammary Epithelial Cells. **Science**, v. 263, p. 526-529, 1994.