

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE SERINO-
ENDOPEPTIDASES (SERPINAS) EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Lucas Tirloni

Porto Alegre, maio de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE SERINO-
ENDOPEPTIDASES (SERPINAS) EM *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Lucas Tirloni

Orientador: Dr. Carlos Termignoni

Porto Alegre, maio de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas e no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

Fontes Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM), Brasil.

“Para ser recompensado pela humanidade, para pagar um tributo à nação, não é necessário ser chamado para escritórios públicos e brilhantes que trabalham para a organização e regeneração de impérios. Os médicos podem muito bem realizar funções patrióticas no silêncio de seus laboratórios e de seus estudos. Eles podem almejar através do trabalho, diminuir o grande número de doenças que afligiam a humanidade e aumentar a felicidade e o bem-estar do outro. E se eles tiverem contribuído através de novos caminhos que abrirem para prolongar a vida média dos seres humanos de alguns anos, mesmo por alguns dias, devem também aspirar ao glorioso título de benfeitores da humanidade.”

Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por tudo que conquistei, pelo dom da vida e pela belíssima criação.

À minha família, especialmente à minha mãe e ao meu pai, que não mediram esforços para garantir uma vida e educação de excelente qualidade. Pelos inúmeros momentos que abdicaram de suas vontades e desejos. Faltam-me palavras para agradecer por tudo: pela confiança depositada, pelos inúmeros incentivos e apoio nos momentos que mais precisei. Também agradeço às minhas irmãs Bárbara e Fernanda. São muitos os momentos de felicidade e alegria divididos ao longo desta caminhada.

À minha esposa Nina, por tudo que fez e tem feito por mim. Agora somos uma família em expansão, e sou muito feliz com tudo isso que está acontecendo. Também agradeço ao meu sogro Charles e à minha sogra Claudete, que me tratam como um filho e sempre me incentivaram durante o mestrado.

Agradeço ao professor Carlos Termignoni pela oportunidade de trabalho. Obrigado pela confiança, conhecimento, oportunidades e pelos inúmeros ensinamentos ao longo desses dois anos.

Ao professor Itabajara da Silva Vaz e à professora Aoi Masuda pelo acolhimento junto ao seu laboratório onde desenvolvi meu trabalho. Sou muito grato pela oportunidade e confiança.

Aos componentes da banca examinadora, pelo pronto aceite do convite e pela revisão desta dissertação.

Aos professores que compuseram a minha comissão de acompanhamento (CA), professor Dr. Henrique B. Ferreira e professora Dr^a. Márcia P. Margis.

Meus agradecimentos pelas grandes amizades e momentos felizes divididos com os colegas de laboratório, de ambos os andares.

Às agências de fomento pelo incentivo financeiro, sem o qual nosso trabalho não teria sucesso.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, aos funcionários do PPGBCM, especialmente à Sílvia e ao Luciano.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS & UNIDADES	7
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
1.2 Hematofagia.....	16
1.3 Serino-endopeptidases	18
1.4 Serpinas.....	19
1.5 Serpinas em mamíferos.....	25
1.5.1 Serpinas na coagulação sanguínea.....	25
1.5.2 Serpinas na fibrinólise	29
1.5.3 Serpinas na imunidade.....	30
1.6 Serpinas em carrapatos	34
1.6.1 <i>A. variegatum</i>	35
1.6.2 <i>A. maculatum</i>	35
1.6.3 <i>R. appendiculatus</i>	36
1.6.4 <i>H. longicornis</i>	37
1.6.5 <i>A. americanum</i>	38
1.6.6 <i>I. scapularis</i>	39
1.6.7 <i>I. ricinus</i>	40
2. OBJETIVOS	43
3. RESULTADOS	44
3.1 Capítulo I.....	45
3.2 Capítulo II.....	80
4. DISCUSSÃO GERAL.....	93
5. CONCLUSÃO.....	98
6. PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS	100
CURRICULUM VITAE	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS & UNIDADES

Å	Angstrom
APC	proteína C ativada
ATP	trifosfato de adenosina
BCA	ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BPTI	inibidor de tripsina pancreática bovina
C-terminal	carbóxi-terminal
CIAP	fosfatase alcalina intestinal de bovinos
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementar
FCA	carcaça de teleóginas
FMG	intestino de teleóquina
FOV	ovário de teleóquina
FSG	glândula salivar de teleóquina
HLS	serpina de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
HMWK	cininogênio de alto peso molecular
HSP47	proteína de choque-térmico 47
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
INCT-EM	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

IPTG	isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilodalton
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MW	massa molecular
NBT	nitroazul de tetrazólio
N-terminal	amino-terminal
O.D.	densidade óptica
ORF	fase aberta de leitura
PA	ativador de plasminogênio
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio 1
PAI-2	inibidor do ativador de plasminogênio 2
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCA	carcaça de partenóginas
PMG	intestino de partenóginas
POV	ovário de partenóginas
PS	proteína S
PSG	glândula salivar de partenóginas
RACE	amplificação rápida das extremidades de cDNAs
RAS	serpina de <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
RCL	alça do centro de reação
RmS	serpina de <i>Rhipicephalus microplus</i>

RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
SCCA-1	antígeno celular de carcinoma escamoso 1
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio
t-PA	ativador de plasminogênio tipo tecidual
TF	fator tecidual
TFPI	inibidor da via do fator tecidual
TM	trombomodulina
TPV	tristeza parasitária bovina
u-PA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
pM	picomolar
μ M	micromolar
μ g	micrograma
%	porcentagem

RESUMO

Carrapatos são animais hematófagos transmissores de diversas doenças para animais e seres humanos. O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito específico de bovinos. É responsável por importantes perdas econômicas na pecuária de países produtores de carne e leite. O aumento de populações de carrapatos resistentes aos principais acaricidas usados e a possível contaminação ambiental e dos produtos derivados como carne e leite impõem estudos para desenvolver novos métodos de controle. O controle imunológico é uma estratégia comprovadamente viável, porém ainda falta encontrar antígenos suficientemente eficientes. Uma das estratégias para atingir esse fim é o estudo de proteínas participantes de processos fisiológicos de grande importância para o carrapato, como é a aquisição e digestão de sangue. Proteínas pertencentes à superfamília das serpinas (*serine protease inhibitors*) participam do controle de diversos processos fisiológicos em mamíferos, inclusive coagulação sanguínea, fibrinólise e ativação do sistema complemento. Uma vez que carrapatos possuem informação para a síntese de serpinas, supõe-se que algumas têm como função perturbar a homeostase de seus hospedeiros. Analisando banco de sequências de cDNA identificamos 16 sequências que codificam serpinas no carrapato bovino, que foram nomeadas RmS (*R. microplus serpin*). Análises por RT-PCR mostraram que na maioria dos tecidos e estágios de desenvolvimento do parasito há expressão das RmS. Todas as sequências identificadas mostram conservação com serpinas de outras espécies de carrapatos. Aproximadamente 41% das RmS (7 de 16) provavelmente são secretadas, pois possuem predição para peptídeo-sinal. Assim como em outras serpinas, todas RmS possuem entre 1 e 4 sítios para N-glicosilação. Modelos tridimensionais revelam conservação de estrutura terciária das RmS analisadas com outras serpinas de mamíferos. Devido à presença de peptídeo-sinal, conservação com serpinas de outros carrapatos e presença em saliva, que foi revelada pelo estudo proteômico preliminar da saliva do parasito, RmS-3 foi escolhida para estudos mais pormenorizados. Para isso, a sequência codificadora foi clonada e ela foi obtida em forma recombinante. Anticorpos policlonais produzidos contra a proteína recombinante revelaram a presença da proteína em todos os tecidos analisados, e também na saliva, o que sugere participar na modulação das respostas do hospedeiro.

ABSTRACT

Ticks are hematophagous animals vectors of several human and animal diseases. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a bovine-specific ectoparasite. It causes significant economic losses in livestock-producing countries. Increasing tick acaricide-resistant populations and, possible contamination on the environmental and on bovine-derived products contamination such as meat and milk impel the study of new control methods. Immunological control is a strategy proved to be feasible, but it requires really efficient antigens. A strategy to achieve this purpose is the study of proteins acting in physiological processes of major importance for the tick, as blood intake and digestion. Proteins belonging to the superfamily of serpins (serine protease inhibitors) have a role in several mammalian physiological processes, including blood coagulation, fibrinolysis and complement activation. As ticks encode information for serpins synthesis it is assumed they disrupt homeostasis their hosts. Through analysis of the cDNA sequences database, we identified 16 sequences coding for serpins in cattle tick, which were named RmS (*R. microplus* serpin). RT-PCR analyses showed RmSs are expressed in most tick tissues and developmental stages. All identified sequences are conserved concerning other tick species serpins. Around 41% of RmS (7 out 16) are probably secreted, since they have sequences predicting for signal peptide. Similarly as other serpin, all RmSs have 1 to 4 N-glycosylation sites. Protein modeling showed all RmSs have a conserved tertiary structure with other mammal serpins. RmS-3 was chosen for further studies due to presence of signal peptide, conservation with serpin inform other ticks and the presence in saliva revealed by an initial a proteomic study of tick saliva. In these studies, its gene was cloned RmS-3 was obtained as a recombinant protein. Polyclonal antibodies were against the recombinant protein showed RmS-3 presence in all analyzed tissues and also in saliva, suggesting it have a role disturbing host responses.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos obrigatórios de animais selvagens, domésticos ou do homem e estão distribuídos em praticamente todas as regiões do mundo. Pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Ixodida e são divididos em três famílias. A família *Argasidae* (*soft-ticks* ou carrapatos moles) compreende 183 espécies divididas nos gêneros *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* e *Otobius*. A família *Ixodidae* (*hard-ticks* ou carrapatos duros) possui 442 espécies divididas nos gêneros *Amblyomma*, *Anomamalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Boophilus*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*. A família *Nuttalliellidae* é representada pelo gênero monoespecífico *Nuttalliella* com uma única espécie (Horak *et al.*, 2002). Esses artrópodes são vetores de grande variedade de microrganismos patogênicos, protozoários, riquetsias, espiroquetas e vírus. Ficam atrás somente dos mosquitos no que se refere ao número de espécies que transmitem aos humanos (Sonenshine, 1991).

As doenças transmitidas por carrapatos aos animais domésticos são uma restrição importante para a produção animal predominantemente em áreas (sub) tropicais do mundo, afetando o sustento da agricultura na América Latina, Ásia, África e Oceania (Jongejan & Uilenberg, 2004). Para o homem, os carrapatos possuem grande importância devido às doenças que transmitem, como por exemplo, a doença de Lyme que é causada pela transmissão da espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Burgdorfer *et al.*, 1982) e a febre maculosa (*Rocky Mountain spotted fever*) que é causada pela transmissão da riquetsia *Rickettsia rickettsii*. Entre 1982 e 2004 foram identificados quinze novos patógenos que causam doenças em seres humanos que são transmitidos por carrapatos (Parola & Raoult, 2006).

1.1 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A partir de 2003, a análise de dados moleculares levou que as espécies pertencentes ao então gênero *Boophilus*, fossem incluídas no gênero *Rhipicephalus*, abrangendo o subgênero *Boophilus*. Esse novo subgênero abrange as espécies *Rhipicephalus microplus*,

Rhipicephalus australis, *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus kohlsi* e *Rhipicephalus geigy* (Barker & Murrell, 2002; Murrell & Barker, 2003; Barker & Murrell, 2004). O *R. microplus* é um ectoparasita hematófago que possui o bovino como único hospedeiro natural e raramente parasita outros mamíferos (particularmente outros ruminantes). É considerado o parasito mais importante que afeta a produção pecuária em todo o mundo (Estrada-Pena, 2006).

Supõe-se que o carrapato *R. microplus* possua origem no sudoeste da Ásia e, hoje, está distribuído entre os paralelos 32° N e 35° S, ou seja, nas regiões tropicais e subtropicais, que incluem grande parte dos países em desenvolvimento (América Latina, África e Ásia Continental) e importantes regiões produtoras de carne bovina e leite, como América Latina e Oceania (Figura 1) (Estrada-Pena *et al.*, 2006).

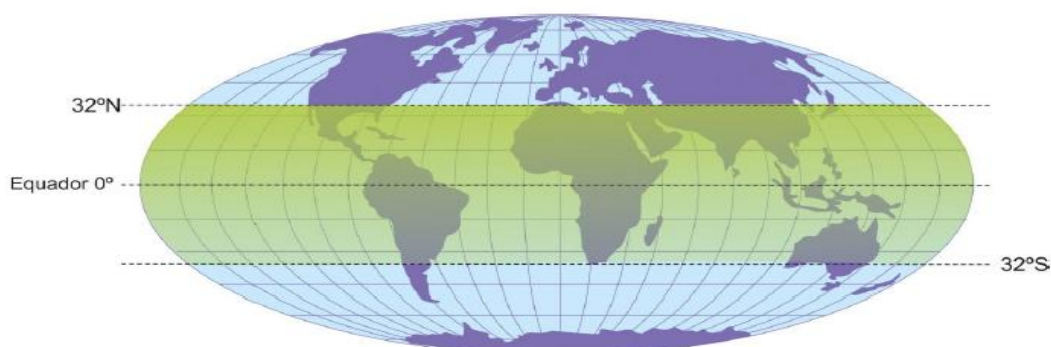


Figura 1. Distribuição do carrapato bovino ao redor do mundo. Figura elaborada por Itabajara da Silva Vaz Jr.

O carrapato bovino é um parasito monoxeno, ou seja, parasita apenas um hospedeiro. O ciclo de vida compreende um período parasitário e outro de vida livre (Figura 2). A fase parasitária dura em média três semanas e inicia quando larvas infestantes encontram o hospedeiro (Jongejan & Uilenberg, 2004). As larvas infestantes encontram-se em aglomerados de centenas ou milhares nas pastagens. Durante o pastoreio as larvas movem-se avidamente ao encontro do corpo do bovino distribuindo-se principalmente em locais onde a temperatura corporal é maior, a pele menos espessa e onde a possibilidade de

auto-remoção por parte do bovino seja difícil. As larvas de *R. microplus* após a fixação, iniciam sua alimentação, que primeiramente não é baseada em sangue e sim em exsudato vascular e fluido linfático (Sutherst *et al.*, 1978). Cerca de seis dias após a fixação, as larvas infestantes realizam muda e tornam-se ninfas. As ninfas alimentam-se de sangue por cerca de seis dias até realizarem nova ecdise, dessa forma dando origem a adultos imaturos (Roberts, 1968a; Roberts, 1968b). É nesse período que ocorre o dimorfismo sexual. Os machos também ingerem sangue, porém em quantidades muito menores que as fêmeas. O repasto sanguíneo é fundamental para o processo de espermatogênese nos machos. Ao fim do seu repasto sanguíneo, os machos procuram as fêmeas para o acasalamento. A fêmea sexualmente madura é designada partenógina (parcialmente ingurgitada). Depois de fecundadas, as fêmeas aumentam consideravelmente a ingestão de sangue e, por volta do 21º dia de parasitismo atingem o tamanho máximo, desprendem-se do hospedeiro e caem ao solo, geralmente no 22º dia pela manhã, sendo designadas teleóginas (fêmeas totalmente ingurgitadas). Esse evento encerra a fase parasitária, dando origem à fase de vida livre do parasito. Já no solo, a fêmea procura local úmido e protegido da luz solar para postura dos ovos. A postura dura em torno de 14 dias, e a eclosão dos ovos inicia-se cerca de sete dias após a postura, fechando assim o ciclo de vida do parasito (Roberts, 1968a; Roberts, 1968b).

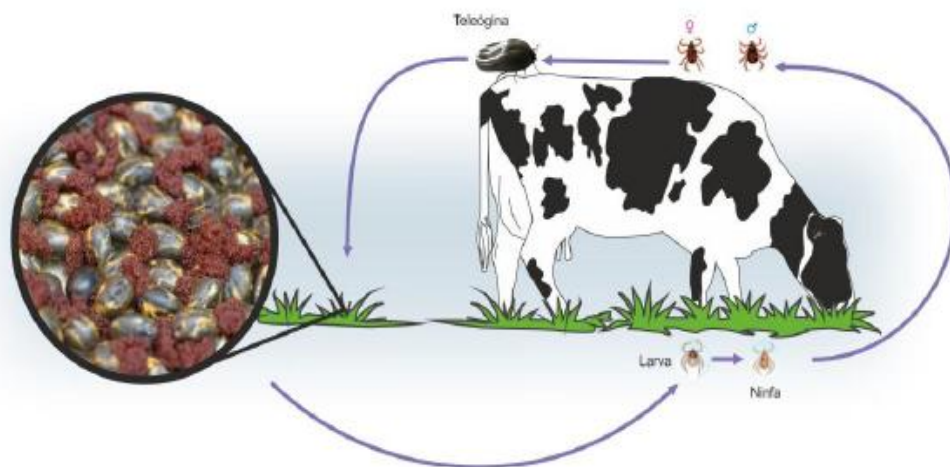


Figura 2. Ciclo de vida carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O inserto apresenta as teleóginas em postura. Figura elaborada por Itabajara da Silva Vaz Jr.

As infestações pelo carrapato bovino causam significantes perdas econômicas em regiões tropicais e subtropicais, representando um dos maiores fatores na queda de produtividade na bovinocultura brasileira, impactando na produção pecuária pela redução do ganho de peso e produção de leite dos animais. Essas perdas são atribuídas principalmente à espoliação de grandes quantidades de sangue, que acarreta anemia e uma série de alterações orgânicas, como anorexia, emagrecimento, apatia, redução na produção de leite e, em casos mais extremos pode levar à morte do animal. Além dos distúrbios associados diretamente ao parasitismo, o *R. microplus* também é motivo de preocupação por ser o vetor do complexo causador da tristeza parasitária bovina (TPV). A TPV é um complexo de doenças causadas por infecção pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemia* e pelas bactérias *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* (Peter *et al.*, 2005).

O controle de infestações por carrapatos é baseado no uso de acaricidas químicos. Os principais acaricidas empregados são os compostos organofosforados, piretróides, formamidinas (amitraz), lactonas macrocíclicas (avermectinas), fluazuron (inibidores de crescimento/incorporação de quitina) e finopril (Martins & Furlong, 2001; Labruna *et al.*, 2009). Contudo o surgimento de populações resistentes aos princípios ativos dos acaricidas é frequente (Martins & Furlong, 2001; Pohl *et al.*, 2011). Além do mais, os métodos de controle químico são frequentemente criticados pelo seu custo e por apresentarem a inconveniência de poderem gerar resíduos químicos no leite e carne destinados ao consumo humano, tornando crescente o estudo de métodos alternativos.

O controle biológico vem sendo estudado e parece ser uma opção interessante. Esse tipo de controle envolve tanto o uso de animais predadores, como aves e aranhas (Sonenshine, 1991), assim como microrganismos artropodopatogênicos, como o fungo *Metarhizium anisopliae* (Santi *et al.*, 2009; Beys da Silva *et al.*, 2010). Outra abordagem alternativa para o controle é o uso de vacinas. Essa metodologia baseia-se no uso de proteínas do carrapato bovino como antígenos para gerar no hospedeiro uma resposta imunológica capaz de aumentar a rejeição aos parasitos. Até o momento, duas vacinas estão disponíveis comercialmente, a TickGard[®] (na Austrália) e a GAVAC[®] (em Cuba). Ambas as formulações são baseadas no uso da proteína recombinante Bm86, uma glicoproteína presente na membrana de células intestinais que possui papel na endocitose (Willadsen *et al.*, 1988). Tais vacinas obtiveram sucesso relativo nos seus países de origem. Em outras regiões devido ao polimorfismo existente entre as diferentes cepas de

carrapatos, os resultados foram insatisfatórios (de la Fuente *et al.*, 2007). Tendo em vista que o controle imunológico é uma estratégia viável, vários grupos de pesquisa exploram a possibilidade de proteger os animais pela indução de uma resposta imune contra outras proteínas do carrapato (Parizi *et al.*, 2009). A identificação de novas moléculas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas deve partir da melhor compreensão e entendimento dos sistemas fisiológicos do parasita. Um dos passos limitantes para o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos é a identificação e validação de proteínas-alvo, que quando bloqueadas irão comprometer o sucesso na alimentação e desenvolvimento do parasita. Uma estratégia para o estudo de novos antígenos consiste na identificação, clonagem e produção *in vitro* de antígenos recombinantes. Proteínas que desempenham papéis importantes na aquisição e digestão de sangue, e modulação da resposta imune do hospedeiro são alvos atraentes para serem estudados (Mulenga *et al.*, 2001).

1.2 Hematofagia

O processo de hematofagia é o meio pelo qual os animais hematófagos adquirem a sua principal fonte de nutrientes, o sangue (Ribeiro, 1987). O processo de obtenção de sangue realizado pelos hematófagos ocorre por duas vias diferentes: através da formação de bolsões hemorrágicos que acumulam material proveniente da dilaceração da pele e capilares; ou através da canulação direta de vênulas ou arteríolas por peças bucais do parasito. Mosquitos e percevejos canulam as vênulas e arteríolas profundas da pele atingindo milímetros de profundidade. Carrapatos introduzem seu aparelho bucal no hospedeiro dilacerando capilares e formando um hematoma, o chamado “bolsão hemorrágico”, de onde se alimentam do sangue ali depositado (Ribeiro & Francischetti, 2003; Francischetti *et al.*, 2009). Para aquisição de sangue fluído, os carrapatos necessitam primeiramente penetrar a pele do hospedeiro e danificar os vasos para liberação de sangue. Durante a procura por sangue, capilares e vasos menores são danificados, e a liberação de sangue ocorre (Ribeiro, 1987; Mans & Neitz, 2004). O fenômeno de hematofagia é caracterizado como sendo um delicado processo de modulação farmacológica de diversos sistemas do hospedeiro (Figura 3) e não simplesmente um procedimento mecânico, como a flebotomia (Ribeiro, 1987; Ribeiro, 1989).

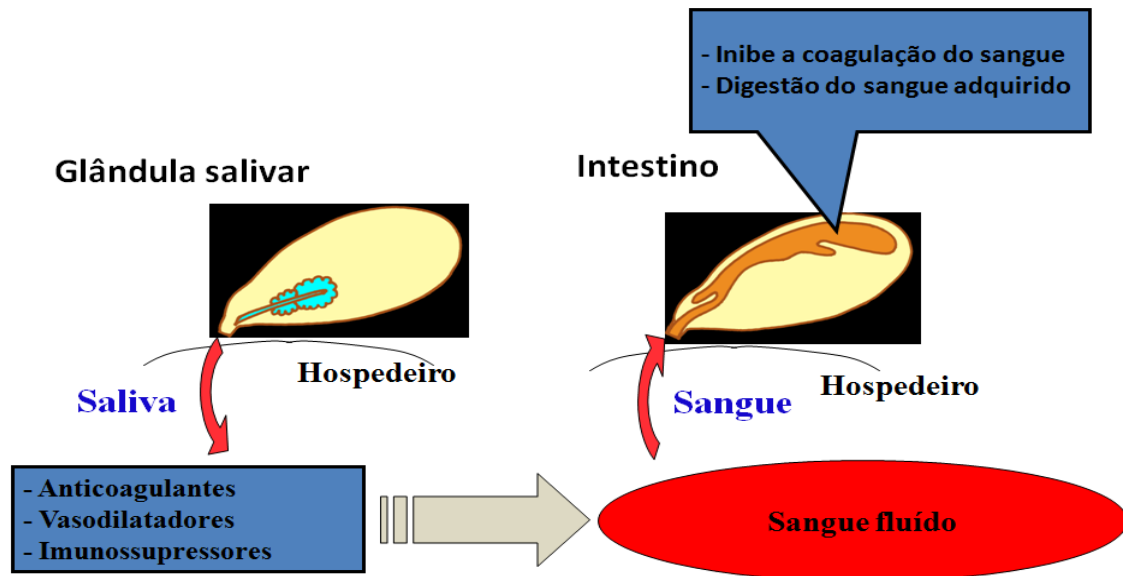


Figura 3. Modulação das respostas do hospedeiro pelo carrapato. A saliva possui moléculas com diferentes atividades farmacológicas que modulam as respostas do hospedeiro. Após a aquisição do sangue, o mesmo deve permanecer fluido no intestino para posterior digestão.

Para qualquer animal hematófago realizar seu repasto sanguíneo é conveniente que o sangue do hospedeiro não coagule; que o fluxo sanguíneo no local da sua fixação seja intenso; e que o hospedeiro vertebrado não o mate. Porém a realidade é outra, os hospedeiros vertebrados desenvolveram três eficientes sistemas de defesa que tornam a vida dos hematófagos difícil: o sistema hemostático, a inflamação e a imunidade adquirida (Ribeiro & Francischetti, 2003). O processo de hematofagia leva à ativação do sistema hemostático (agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise) e subsequente ativação do sistema caliceína-cininas (ativação da caliceína e formação de bradicinina) e do sistema imunológico do hospedeiro (inflamação, ativação do sistema complemento e imunidade adquirida). A adaptação à hematofagia envolveu a evolução de um complexo de moléculas salivares que auxiliam o parasito a vencer as defesas do hospedeiro contra a perda de sangue e contra o desenvolvimento de reação inflamatória no local da lesão. Essas reações podem romper o fluxo sanguíneo ou iniciar um comportamento de defesa por parte do hospedeiro, pela sensação de dor e prurido (Francischetti, 2010). A saliva de animais hematófagos possui substâncias bioativas com potentes propriedades farmacológicas que afetam diretamente os sistemas imunológico e hemostático do hospedeiro vertebrado (Ribeiro, 1989).

A manutenção do equilíbrio homeostático desses diversos sistemas de defesa do hospedeiro é um processo que envolve a interação de diversas proteínas. Na sua grande maioria, esses processos são coordenados por reações de cascatas enzimáticas, através da ativação sequencial de serino-endopeptidases. O controle dessas cascatas enzimáticas se dá pela interação das endopeptidases com seus inibidores específicos. Levando em conta o papel dessas endopeptidases e seus respectivos inibidores na manutenção da homeostase desses sistemas, os animais hematófagos, incluindo carrapatos, codificam endopeptidases e inibidores de endopeptidases para quebrar esse equilíbrio (Mulenga *et al.*, 2001). Um exemplo dessa regulação pode ser observado em carrapatos e outros artrópodes hematófagos, que possuem um eficiente e sofisticado arsenal de moléculas com atividade anticoagulante, que são considerados essenciais para o processo de hematofagia (Maritz-Olivier *et al.*, 2007). Na sua maioria, essas moléculas são inibidores de serino-endopeptidases que agem inibindo as principais enzimas da cascata de coagulação, trombina (fator IIa) e fator Xa, todas elas serino-endopeptidases. Esses inibidores diferem em tamanho e mecanismo de ação, variando desde pequenos peptídeos a moléculas maiores. Dentre os inibidores com maior massa molecular, podemos citar as proteínas pertencentes ao grupo das serpinas (inibidores de serino-endopeptidases) e os inibidores tipo Kunitz (Mans & Neitz, 2004).

1.3 Serino-endopeptidases

Peptidases (proteinases na nomenclatura antiga) são enzimas que catalizam a hidrólise da ligação peptídica e são classificadas de acordo com seus mecanismos catalíticos (grupo reativo no centro catalítico), similaridade de sequência de aminoácidos e estrutura (Barrett, 2004). Formam um grande grupo de proteínas com importância em diversos processos biológicos. Genomas completamente sequenciados revelam que aproximadamente 2% de todos os genes codificam peptidases ou seus homólogos em todos os reinos (Rawlings & Barrett, 1999). As endopeptidases são classificadas e divididas em cinco grupos: cisteíno-endopeptidases (apresentam um resíduo de cisteína no sítio ativo), serino-endopeptidases (resíduo de serina nucleofílico), metalo-endopeptidases (presença de um metal no sítio ativo), aspartil-endopeptidases (possuem um resíduo de aspartato

ativado) e treonino-endopeptidases (o sítio ativo apresenta um resíduo treonina) (Barrett, 2004; Rawlings *et al.*, 2008).

As serino-endopeptidases são encontradas em eucariotos, procariotos, arqueas e vírus; e distribuídas em mais de vinte famílias (Rawlings & Barrett, 1999). Compõem seis clãs (SA, SB, SC, SE, SF, SG), cada qual constituído por um variado número de famílias, como por exemplo: da quimotripsina (S1), da subtilisina (S8), da lisil endopeptidase (S5), da carboxipeptidase C (S10), dentre outras. Endopeptidases da família quimotripsina são as endopeptidases mais abundantes na natureza. Essas enzimas participam de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo digestão (por exemplo, tripsina e quimotripsina), resposta imune (fator B, fator C e fator D do complemento; elastase de neutrófilos e catepsina G), coagulação sanguínea (fatores VIIa, IXa, Xa e XIIa) e fibrinólise (u-PA, t-PA e plasmina) (Rawlings & Barrett, 1993). A diversidade de ação fisiológica dessas enzimas requer uma diversidade de especificidades, variando desde enzimas que reconhecem apenas um resíduo de aminoácido no substrato, a enzimas que reconhecem sequências com até cinco aminoácidos ou até mesmo uma proteína específica. O sítio ativo das serino-endopeptidases é composto pela tríade catalítica His-Asp-Ser (His57, Asp102 e Ser195, numeração da quimotripsina) que é responsável pelo mecanismo de catálise da hidrólise da ligação peptídica. Usualmente as peptidases são controladas *in vivo* por inibidores endógenos (Bode & Huber, 1992). Baseados na estrutura primária e terciária, esses inibidores são classificados em 18 famílias, de acordo com Laskowski & Qasim (2000). Desses, os pertencentes às famílias Kazal, BPTI-Kunitz, α -macroglobulina, serpinas e pacifastina estão bem descritos como reguladores de diversas vias proteolíticas (Laskowski & Qasim, 2000).

1.4 Serpinas

Inibidores da superfamília das serpinas (*serine protease inhibitors*) participam de uma variedade de funções fisiológicas em diferentes organismos (Gettins, 2002). Proteínas desta superfamília possuem entre 350-500 aminoácidos com massa molecular variando de 40-60 kDa (Silverman *et al.*, 2001; Gettins, 2002). A identificação inicial desta superfamília baseou-se na observação da similaridade na estrutura primária de três proteínas: antitrombina humana, inibidor de α_1 -antitripsina humana e ovalbumina.

Identificou-se que essas três proteínas possuem uma relação estrutural, embora tenham identidades em torno de 30% e atividades distintas (as duas primeiras inibitórias e a terceira, uma proteína de reserva muito abundante na clara do ovo, sem atividade inibitória). Somente com a resolução da estrutura de algumas serpinas por cristalografia de raios-X, comprovou-se que a similaridade entre a estrutura primária corresponde a uma estrutura terciária conservada (Silverman *et al.*, 2001; Gettins, 2002). A grande maioria desses inibidores atua inibindo serino-endopeptidases da família quimotripsina (Silverman *et al.*, 2001), porém algumas serpinas inibem outras classes de peptidases: a serpina SCCA-1 humana é um potente inibidor das catepsinas K, S e L (Schick *et al.*, 1998; Kanaji *et al.*, 2007); já a serpina viral Crm-A é um inibidor específico da enzima conversora de interleucina-1 β humana (Ray *et al.*, 1992). Além do mais, outras serpinas realizam funções não-inibitórias: atuando como chaperonas, como é o caso da HSP47 (Sauk *et al.*, 2005); assim como transportadoras de hormônios e reguladores da pressão arterial (Potempa *et al.*, 1994).

O nome dessa superfamília de proteínas foi baseado originalmente no fato de que a maioria das serpinas até então identificadas inibiam serino-endopeptidases. Porém o número de proteínas com estrutura compatível com essa superfamília de inibidores, mas com atividade não inibitória vem crescendo, e também daquelas que inibem outras classes de endopeptidases. Por isso foi estabelecida uma nomenclatura de acordo com a filogenia dessas proteínas. Para esse fim, em 27 de junho de 1999 durante o 2nd *International Symposium of the Structure and Biology of Serpin* em Cambridge, foi montado um comitê com o objetivo de criar uma nomenclatura padrão para essa superfamília de proteínas e seus genes. A padronização da nomenclatura das serpinas ajudaria na identificação e entendimento de novos produtos gênicos, além de facilitar a comunicação no meio científico. Através de dados de filogenia, as serpinas foram divididas em 16 clados (A-P), com os seguintes nomes: A (α_1 -antitripsina), B (ovalbuminas intracelulares), C (antitrombina), D (cofator II da heparina), E (nexina), F (α_1 -antiplasmina), G (inibidores de C1), H (HSP47), I (neuroserpina), J (serpinas do carangueijo ferradura), K (serpinas de insetos), L (serpinas de nematódeos), M (serpinas de espécies do gênero *Schistosoma*), N (serpinas do vírus SPI1-2/CrmA-like), O (serpinas do vírus SPI3) e P (serpinas de plantas). Contudo, ainda existem 10 serpinas que são divergentes e, por isso, foram classificadas como órfãs. A nomenclatura para essa superfamília de proteínas segue o seguinte padrão:

SERPINXy, onde ‘X’ é o clado a qual a proteína pertence e ‘y’ o número neste clado (Irving *et al.*, 2000; Silverman *et al.*, 2001; Gettins, 2002).

Tipicamente, serpinas possuem na sua estrutura terciária três feixes de folhas- β (A-C), entre 7-9 α -hélices (A-I), além da alça do centro da reação (*reactive center loop* – RCL). Além dessas estruturas, outras regiões são importantes para a atividade inibitória das serpinas (Figura 4). O RCL é a região da serpina que liga ao sítio ativo da endopeptidase alvo sendo crucial para a atividade inibitória. Em α_1 -antitripsina, os resíduos de aminoácidos do RCL são nomeados de acordo com o sistema de Schechter & Berger (1967) e compreende os resíduos P₁₇-P₄ (Hopkins *et al.*, 1993). Conforme este sistema de notação, a ligação suscetível de hidrólise é a ligação peptídica entre os resíduos P₁-P₁. Esta notação é usada também para se referir à ligação de inibidores na enzima, mesmo no caso de inibidores cuja ligação não é hidrolisada pela peptidase.

As serpinas geralmente têm como característica uma sequência padrão de aminoácidos na região do RCL: P₁₇[E]-P₁₆[E/K/R]-P₁₅[G]-P₁₄[T/S]-P₁₃[X]-P₁₂₋₉[A/G/S]-P₈₋₁[X]-P₁-P₄[X] (Hopkins *et al.*, 1993). Serpinas inibitórias geralmente apresentam a região da dobradiça conservada, onde o resíduo P₁₅ usualmente é um resíduo de glicina; P₁₄ resíduo de treonina ou serina; e os resíduos P₁₂-P₉ apresentam cadeia-lateral curta, como alanina, glicina ou serina. Esses resíduos de cadeia lateral curta permitem uma inserção eficiente e rápida do RCL no feixe de folhas- β A. Além do mais, serpinas inibitórias possuem mais que 50% de alanina entre os resíduos P₁₂₋₉. Resíduos carregados positivamente em P₁₄ ou um resíduo de prolina na posição P₁₂ ou P₁₀ causam perda da atividade inibitória das serpinas. Serpinas não inibitórias desviam desse padrão, e algumas mutações na região da dobradiça convertem serpinas inibitórias em substratos (Hopkins *et al.*, 1993; Irving *et al.*, 2000).

Diversas regiões são importantes no controle e modulação das mudanças conformacionais em serpinas (Figura 4). A região da dobradiça (“*hinge region*”) compreende seis resíduos de aminoácidos (P₁₅ - P₉) do RCL, e é essencial, pois garante mobilidade para as mudanças conformacionais do RCL durante a transição S→R (ver adiante). A região “*breach*” é localizada no topo do feixe de folhas- β A, e é o ponto inicial da inserção do RCL. A região “*shutter*” está localizada próxima ao centro do feixe de folhas- β A e juntamente com a região “*breach*” é importante por facilitar a abertura da folha- β e aceitar a região da dobradiça do RCL ali inserida. A região “*gate*” inclui as

folhas- β s4C e s3C e é importante para inserção do RCL dentro da folha- β A e não é clivado (Irving *et al.*, 2000; Gettins, 2002).

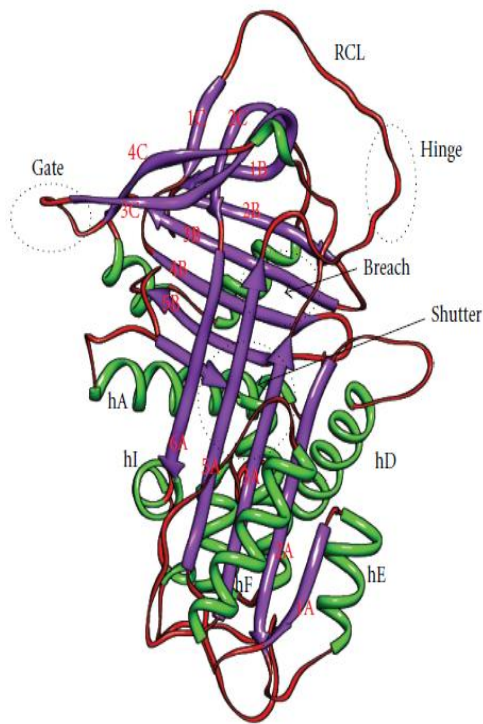


Figura 4. Estrutura terciária da α_1 -antitripsina humana. Os feixes de folhas- β (A, B e C) estão representados em púrpura. As α -hélices (A-I) estão representadas em verde. O RCL, que está envolvido na interação com a peptidase está representado em vermelho. A região P₁₅ – P₉ do RCL é chamada região da dobradiça “*hinge region*”. O local onde o RCL inicialmente se insere após clivagem pela endopeptidase é denominado “*breach region*” e está localizado ao topo da folha- β A. A região denominada “*shutter domain*” está localizada próximo ao centro da folha- β A. A região “*gate*” é composta pelas folhas- β s3C e s4C. De acordo com Khan *et al.*, 2011.

A transição S→R é fundamental no processo de inibição. Estudos estruturais e bioquímicos revelaram que as serpinas atuam como um inibidor-suicida (Figura 5). Inicialmente a serpina liga-se à peptidase através da formação de um complexo não-covalente do tipo Michaelis, através da interação dos resíduos P₁ e P₁' que estão acessíveis (Figura 5A) para a interação com o sítio ativo da endopeptidase (Gettins, 2002). O ataque da serina do sítio ativo da endopeptidase leva à formação de uma ligação éster entre a serina-195 da serino-endopeptidase e a carbonila do resíduo de aminoácido P₁ da serpina, resultando na clivagem da ligação peptídica, formando o que se conhece por acil-enzima. A especificidade da endopeptidase é dirigida aos resíduos P₁-P₁' que devem estar

posicionados e acessíveis para a interação com a endopeptidase, atuando como um substrato. O RCL clivado é inserido dentro do feixe de folhas- β A, movendo a enzima, ligada covalentemente, juntamente com ele até o polo oposto da serpina. O resultado é a translocação da peptidase em aproximadamente 70 Å e a distorção do seu sítio ativo (Huntington *et al.*, 2000) (Figura 5B). Essa distorção do sítio ativo previne a etapa final da catálise, a hidrólise da ligação éster acil-enzima e resulta na formação do complexo serpina/endopeptidase ligado covalentemente de modo irreversível (Khan *et al.*, 2011).

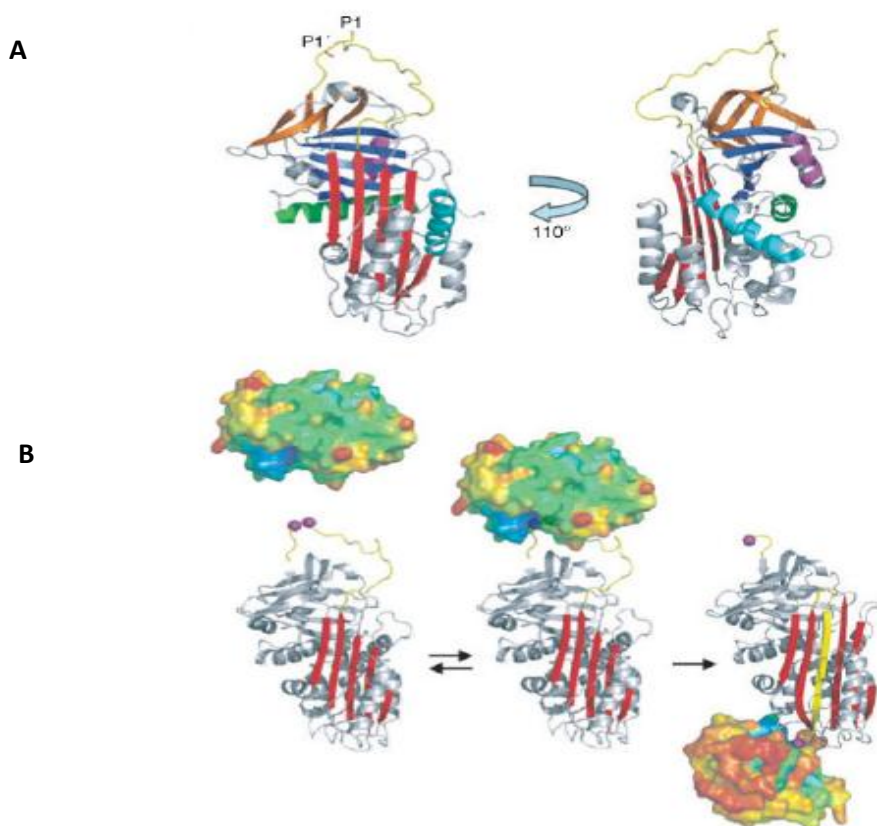


Figura 5. Mecanismo de inibição das serpinas. (A) ilustração da estrutura da α_1 -antitripsina no seu estado nativo. Os resíduos $P_1 - P_1'$ estão expostos para o ataque proteolítico. (B) O mecanismo de inibição da endopeptidase está exemplificado em dois passos. No primeiro passo, a serpina nativa interage de modo reversível com a endopeptidase para formar o complexo de Michaelis (ilustração ao centro da figura). Após a formação do intermediário acil-enzima, o RCL é clivado e inserido dentro do feixe de folhas- β A e a endopeptidase é arremessada para o polo oposto da serpina, e sua arquitetura catalítica é destruída. De acordo com Rau *et al.*, 2007.

Diversos estados conformacionais (Figura 6) aparecem em dados de cristalografia de diferentes serpinas: o estado nativo, clivado, latente e δ (delta). Esses estados diferem primeiramente na estrutura do RCL. No estado nativo, o RCL está exposto e, para as serpinas inibitórias, acessível para a interação com a peptidase. Após a clivagem, o RCL é inserido no feixe de folhas- β A formando uma folha adicional antiparalela entre as folhas s5A e s3A. A transição do estado nativo para o estado clivado é denominada transição de estado tenso para relaxado (“*stressed to relaxed*”, S \rightarrow R), onde a clivagem da serpina está associada com o aumento da estabilidade da proteína (Gettins, 2002). O estado latente é a forma em que o RCL da serpina encontra-se inserido no feixe de folhas- β A como na forma clivada, esse é o chamado estado R alternativo. O estado conformacional δ é um estado que apresenta uma conformação intermediária entre o estado latente e o estado nativo, com o RCL parcialmente inserido no feixe de folhas- β A. Além desses quatro estados conformacionais, existe um quinto estado conformacional que as serpinas podem apresentar: o estado polimérico, onde o RCL de uma molécula está inserido no feixe de folhas- β A de outra molécula (Irving *et al.*, 2000; Gettins, 2002).

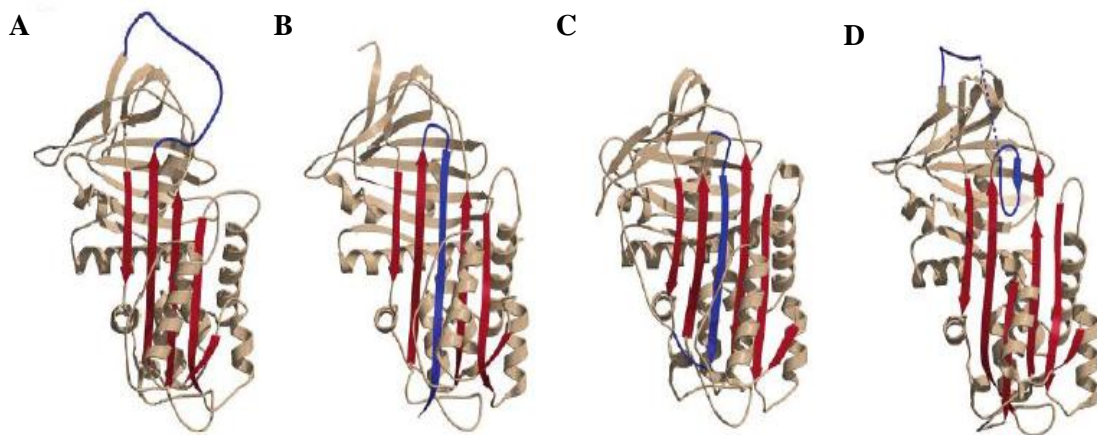


Figura 6. Estados de conformação das serpinas. O RCL está em azul para enfatizar as mudanças mostradas em cada estado conformacional. Comparação dos diferentes estados conformacionais de serpinas: (A) nativo, (B) clivado, (C) latente e (D) δ . De acordo com Gettins, 2002.

1.5 Serpinas em mamíferos

O grande número de endopeptidases encontrado em mamíferos, participando dos mais variados processos fisiológicos, requer a atividade de inibidores específicos que evoluíram para limitar a atividade proteolítica de cada um desses grupos de endopeptidases. Os inibidores membros da superfamília das serpinas controlam diferentes vias em humanos, regulando a coagulação sanguínea, fibrinólise, inflamação e ativação do sistema complemento.

1.5.1 Serpinas na coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é um evento em cascata de ativação consecutiva de diferentes serino-endopeptidases. As proenzimas inativas (zimogênios) são clivadas e transformadas em enzimas ativas. Cada reação da cascata resulta da reunião de um complexo composto por uma enzima (fator de coagulação ativado), um substrato (forma de proenzima do fator de coagulação), e um cofator (acelerador da reação). Estes componentes são reunidos, tipicamente em um complexo fosfolipídico e contidos por íons cálcio. Assim, a coagulação tende a permanecer concentrada no local onde tal reunião ocorre; geralmente na superfície de plaquetas ativadas ou na superfície do endotélio lesado (Hoffman *et al.*, 1996; Hoffman & Monroe, 2001).

Tradicionalmente, o esquema da coagulação sanguínea é dividido em vias extrínseca e intrínseca (Macfarlane, 1964). Tanto a via intrínseca como a via extrínseca são ativadas durante o processo de hematófagia. Ambas convergem na ativação do fator X que atua na conversão de protrombina em trombina. A trombina converte a proteína plasmática fibrinogênio em fibrina, formando a rede de fibrina que juntamente com plaquetas e eritrócitos, constitui o coágulo sanguíneo. Posteriormente a rede de fibrina é polimerizada em reação catalizada pelo fator XIIIa. Assim, a formação do coágulo de fibrina é a última etapa da série de reações proteolíticas que, coordenadas com as plaquetas e células endoteliais, evitam a perda de sangue (Hoffman, 2003).

A via extrínseca inicia com a exposição do fator tecidual (TF) que é liberado para o sangue devido à lesão vascular. O TF é expresso em grande número de células, incluindo fibroblastos estromais, células mononucleares, macrófagos e células endoteliais que se

encontram no compartimento extra-vascular, não estando usualmente em contato com o sangue até que ocorra lesão no endotélio ou inflamação (Hoffman, 2003). O fator VII liga-se ao TF e é rapidamente ativado por peptidases do sistema de coagulação. Este complexo fator VIIa/TF cataliza as reações de conversão dos fatores IX e X para suas formas ativadas IXa e Xa. A protrombina é ativada em trombina pelo complexo protrombinase, que consiste no complexo protrombina, fator Xa, e seu cofator, o fator V na forma ativada (fator Va).

A via intrínseca da coagulação ativa o fator X através do contato com superfícies carregadas negativamente (presentes na matriz extra-vascular). A pré-caliceína, o fator de Hageman (fator XII) e o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) formam um complexo com o colágeno subendotelial (ativação por contato). O fator XII liga-se ao HMWK e é convertido lentamente numa peptidase ativa (fator XIIa) a qual converte a pré-caliceína em caliceína e o fator XI na sua forma ativa (fator XIa). O fator XIa promove a conversão do fator IX em IXa que juntamente com o fator VIIIa, íons cálcio e os fosfolípídeos pró-coagulantes (presentes na membrana das plaquetas ativadas e do endotélio) formam as unidades catalíticas necessárias para a ativação do fator X, que ativa protrombina em trombina (Davie *et al.*, 1991). A coagulação sanguínea é regulada predominantemente pela antitrombina, inibidor da via do fator tissular (TFPI), cofator II da heparina e pela via de inibição da proteína C ativada. Com exceção do TFPI, que é um inibidor tipo Kunitz, as demais proteínas que regulam a coagulação sanguínea inibindo endopeptidases pertencem à superfamília das serpinas (Rau *et al.*, 2007).

1.5.1.1 Antitrombina

É o principal regulador fisiológico das peptidases envolvidas na coagulação sanguínea em vertebrados. A antitrombina é composta por uma cadeia polipeptídica única com massa molecular de 58 kDa. Quinze por cento da sua massa é constituída de carboidratos. É sintetizada pelo fígado e circula no plasma em concentrações de aproximadamente 150 µg/mL, com tempo de meia vida de aproximadamente três dias. Possui papel central na regulação da cascata de coagulação inibindo efetivamente trombina, fator Xa, fator IXa e fator XIa (Rau *et al.*, 2007). É expressa nas formas α e β , onde a forma α representa 90% da antitrombina total circulante e é glicosilada nos quatro

possíveis sítios de glicosilação (Asn96, Asn135, Asn155 e Asn 192), a forma β compreende 10% da antitrombina total e possui uma glicosilação a menos (Asn135) (McCoy *et al.*, 2003). Deficiência parcial desta proteína aumenta o risco de doenças trombóticas, enquanto a deficiência completa é incompatível com a vida (Ishiguro *et al.*, 2000).

Ao contrário da maioria das serpinas, o modo de inibição da antitrombina é lento, contudo os níveis de inibição aumentam cerca de 1000 vezes na presença de glicosaminoglicanos sulfatados, heparina e sulfato de heparan. O tempo decorrido para a inibição de trombina pela antitrombina é reduzido para minutos na ausência de heparina, e acelerado para milisegundos na presença deste polissacarídeo no plasma (Huntington & Gettins, 1998). *In vivo*, as formas relevantes encontradas de heparina incluem heparan sulfato, encontrado no endotélio, e heparina liberada pelos mastócitos. Este efeito de aceleração da atividade é a base para o uso de heparina na terapia anticoagulante (Olson *et al.*, 2002). Na ausência de heparina, a antitrombina encontra-se com o RCL parcialmente inserido na folha- β A (estado δ). Quando a heparina se liga à antitrombina, ocorre a liberação do RCL, que toma outra conformação e permite a interação dos resíduos P_1 - P_1 com o sítio ativo da peptidase (Jin *et al.*, 1997). A estrutura cristalina da antitrombina complexada com heparina revela que três regiões são importantes para a interação dessa serpina com o seu cofator. Essas regiões são a extremidade N-terminal, a α -hélice A e a α -hélice D. A interação com a heparina ocorre através da formação de um “*basic patch*”, que é formado pelos resíduos Lis11, Arg13 da região N-terminal; Arg46 e Arg47 na α -hélice A; e os resíduos Lis144, Lys125 e Arg129 da α -hélice D (Olson *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Cofator II da heparina

O cofator II da heparina é uma glicoproteína de 65,5 kDa constituída por 480 aminoácidos que circula no plasma na concentração de 1 μ M/L com tempo de meia vida de 2-3 dias. É uma glicoproteína de cadeia simples que inibe trombina, e não possui atividade contra outras peptidases envolvidas na coagulação sanguínea e fibrinólise (Parker & Tollefsen, 1985). Assim como a antitrombina, essa serpina possui o RCL parcialmente inserido na folha- β A e a cinética de inibição é muito lenta, porém os níveis de inibição aumentam drasticamente na presença de heparina, sulfato de heparina ou dermatan sulfato

(Rau *et al.*, 2011). Possui sítio de ligação à heparina localizado na α -hélice D. Supõe-se que o mecanismo de mudança conformacional ocorrido no RCL seja semelhante ao que ocorre com a antitrombina (Baglin *et al.*, 2002). A estrutura dessa serpina foi resolvida em 2002 e apresenta similaridade com a estrutura da antitrombina, com a região N-terminal do RCL inserida na folha- β A. Possui os resíduos P₁-P₁' representados por Leu-Ser e inibe trombina livre e trombina ligada ao trombo, sugerindo-se que esta serpina contribua em 20-30% na inibição de trombina na coagulação (Tollefsen, 2002). Humanos e camundongos com deficiência desta serpina não apresentam predisposição para formação de trombos sob condições normais. Contudo, camundongos homocigotos para essa deficiência formam trombos mais rápido que os animais normais em condições experimentais (He *et al.*, 2002).

1.5.1.3 Inibidor da proteína C ativada

Um dos mecanismos de inibição da coagulação sanguínea é o mecanismo desencadeado pela via da proteína C ativada (APC). A via de inibição da APC desempenha funções para controlar a formação de trombina no local do trombo já formado. A proteína C na forma não ativada (zimogênio) localiza-se no endotélio, ligada a receptores específicos. A trombina gerada na coagulação liga-se ao receptor endotelial trombomodulina (TM) através do exossítio I da trombina, que é o sítio responsável pela interação e clivagem do fibrinogênio, reduzindo assim a atividade coagulante. A proteína C na presença de trombina ligada à TM é clivada, tornando-se ativa (APC). Na presença da proteína S (PS), o complexo APC/PS inativa os fatores de coagulação Va e VIIIa. Isto limita a geração de trombina na periferia do trombo, onde o endotélio não está lesado (Fuentes-Prior *et al.*, 2000).

O inibidor da proteína C ativada (PCI) é uma glicoproteína composta por 387 aminoácidos com massa molecular de 57 kDa. É sintetizado no fígado e circula no plasma na concentração de 5 μ g/mL (Rau *et al.*, 2007). Essa serpina inibe diversas peptidases, incluindo APC, trombina livre, trombina ligada à trombomodulina, t-PA, u-PA e calicreína. Dependendo da endopeptidase que é inibida, esse inibidor pode atuar tanto como agente pró-coagulante como agente anticoagulante. Na presença de TM ele atua como procoagulante, pois inibe a atividade da APC sobre trombina; e na presença de heparina ele

atua como anticoagulante, inibindo a atividade da trombina. É uma serpina com sítio de ligação à heparina localizado na α -hélice H (Aznar *et al.*, 1996).

1.5.2 Serpinas na fibrinólise

Após a formação de fibrina e consequente formação do trombo, o mesmo não permanece indefinitivamente no local da lesão. Os processos que envolvem a remoção do trombo, bem como a remodelação e proliferação tecidual são fundamentais para manter a integridade dos tecidos. Fibrinólise é o processo fisiológico pelo qual a fibrina produzida na cascata de coagulação é dissolvida. Esse processo inicia-se através da ativação do zimogênio plasminogênio na serino-endopeptidase plasmina. A ativação do plasminogênio se dá através dos ativadores de plasminogênio (PA) que são do tipo tecidual (t-PA) e do tipo uroquinase (u-PA). Ambos os ativadores são serino-endopeptidases liberadas pelas células endoteliais, que convertem o plasminogênio em plasmina. A plasmina então hidrolisa a fibrina em fragmentos solúveis e degrada fibrinogênio, protrombina, fatores V e fator VIII. O plasminogênio liga à fibrina durante a formação desta, e é ativado em plasmina somente quando esta ligação ocorre, portanto, a geração de plasmina ocorre dentro do trombo. A atividade proteolítica da plasmina limita-se ao trombo, pois a plasmina livre é rapidamente inativada pela serpina α_2 -antiplasmina (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). A atividade enzimática dos ativadores do plasminogênio é regulada por proteínas inibitórias específicas, os inibidores dos ativadores de plasminogênio 1 e 2 (PAI-1 e PAI-2).

1.5.2.1 α_2 -antiplasmina

Através do uso de cromatografia de afinidade com resina plasminogênio-Sepharose foi possível purificar uma glicoproteína com massa molecular de 65-70 kDa, da qual 11% são carboidratos. Essa serpina é sintetizada pelo fígado e circula no plasma na concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$ com tempo de meia vida de aproximadamente 2,6 dias. Inibe plasmina, formando rapidamente um complexo estequiométrico 1:1 com a mesma. Além da plasmina; tripsina, elastase e APC também são alvos deste inibidor (Collen & Wiman,

1978; Collen & Wiman, 1979). O RCL dessa serpina é clivado na posição Arg364-Met365, ocorrendo a formação do complexo ligado covalentemente α_2 -antiplasmina/plasmina que é degradado no fígado (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). Homozigose para o gene de α_2 -antiplasmina resulta em fibrinólise descontrolada e tendência hemorrágica (Collen & Wiman, 1979).

1.5.2.2 PAI-1

A serpina PAI-1 é uma glicoproteína de 50 kDa sintetizada pelas células endoteliais, monócitos, macrófagos, hepatócitos e plaquetas (Samad & Loskutoff, 1996). É uma serpina relativamente estável, com tempo de meia vida na circulação de 1-2 h. No sangue, PAI-1 circula ligado à vitronectina, o que aumenta a sua meia vida para 4-6 h. É reconhecido como o maior regulador do sistema fibrinolítico, inibindo rapidamente os ativadores de plasminogênio u-PA e t-PA, prevenindo assim a formação de plasmina. Elevadas concentrações de PAI-1 são observados em uma variedade de desordens trombóticas, incluindo trombose venosa, infarto do miocárdio e coagulação vascular disseminada (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

1.5.2.3 PAI-2

É uma serpina composta por 393 aminoácidos que foi originalmente obtida de placenta humana. É uma proteína intracelular que pode ser encontrada tanto na forma não glicosilada (47 kDa), como na forma glicosilada (60 kDa) que é secretada por leucócitos e células de fibrosarcoma. PAI-2 inibe tanto t-PA quanto u-PA com a mesma eficiência (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

1.5.3 Serpinas na imunidade

O processo inflamatório é uma das respostas do sistema imune inato do hospedeiro que ocorre após lesão tecidual, e é caracterizado classicamente pelos fenômenos de dor,

eritema, edema e calor (Lewis, 1971). O ATP liberado das células danificadas é responsável pela dor imediata e aguda após o dano tecidual (Cook & McCleskey, 2002). A lesão vascular leva à exposição de constituintes de tecidos adjacentes, bem como de fragmentos celulares que ativam uma série de reações inflamatórias. A interação dos componentes do sangue com a superfície negativa da membrana basal, associada à exposição de outras biomoléculas carregadas negativamente (ácidos nucleicos, colágeno, etc) levam à ativação do sistema contato ou sistema calicreínas-cininas. Os componentes deste sistema incluem calicreína, calistatina, cininogênio, cininas, receptores de bradicinina B1 e B2 e as cininases. A interação do sangue com os constituintes do endotélio lesado ativam o fator XII que converte pré-calicreína em calicreína. A calicreína é uma serino-endopeptidase que cliva especificamente cininogênios de baixo peso molecular nas posições Met-Lis e Arg-Ser para gerar peptídeos vasoativos, sendo a bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gli-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) o principal deles (Muller-Esterl & Fritz, 1984; Chao & Chao, 1995). A ligação da bradicinina aos receptores específicos gera uma gama de efeitos biológicos, incluindo redução da pressão arterial decorrente da vasodilatação periférica, contração muscular, permeabilidade vascular, quimiotaxia e ativação de mastócitos e macrófagos, ativação de cascatas inflamatórias e dor (Bhoola *et al.*, 1992). A serotonina e histamina liberada pelas plaquetas e mastócitos são importantes mediadores inflamatórios. O ATP liberado pelas células lesionadas; a trombina gerada pela ativação da cascata de coagulação; e outras moléculas pró-inflamatórias ativam neutrófilos que acumulam no local da lesão e liberam o conteúdo dos seus grânulos (Kuroki & Minakami, 1989). A ativação de neutrófilos é acompanhada pela liberação para o ambiente extracelular de diversas serino-endopeptidases como a catepsina G, elastase e protease-3. A atividade proteolítica dessas enzimas é responsável pela degradação de proteínas do tecido conjuntivo incluindo elastina, colágeno e proteoglicanos (Janoff, 1985). Além do mais, essas endopeptidases estão envolvidas na ativação de linfócitos, clivagem de moléculas apoptóticas, ativação e degradação de citocinas (Pham, 2006; Pham, 2008).

A lesão tecidual desencadeia a ativação do sistema complemento, que envolve a proteólise sequencial de proteínas para gerarem enzimas com atividade proteolítica. É responsável pela opsonização de antígenos e lise celular de células estranhas. As proteínas do complemento estão presentes no plasma em sua forma inativa e são numeradas de C1 a C9. Muitas delas, quando ativadas, tornam-se enzimas proteolíticas que degradam outras

proteínas do complemento, formando assim uma cascata capaz de gerar amplificação enzimática. A etapa crítica no desenvolvimento das funções biológicas do complemento é a ativação do terceiro (e mais abundante) componente, C3. A clivagem do C3 se dá por três vias: a via clássica é desencadeada pela fixação de C1 a um complexo antígeno-anticorpo (IgM ou IgG); a via alternativa que pode ser desencadeada por moléculas presentes na superfície de microrganismos; e a via da lectina, na qual a lectina plasmática que se liga à manose, se une a carboidratos de microrganismos e ativa C1 diretamente (Walport, 2001a; Walport, 2001b).

1.5.3.1 α_1 -antitripsina

É uma glicoproteína composta por 394 aminoácidos e massa molecular de 51 kDa. Essa serpina originalmente recebeu esse nome porque possui habilidade de ligar-se irreversivelmente à tripsina *in vitro*. É a serpina mais abundante no plasma humano (aproximadamente 2% das proteínas totais), circulando na concentração de 1,3 mg/mL, com meia-vida de aproximadamente 4,5 dias (Travis & Salvesen, 1983b). Seu alvo fisiológico é a elastase de neutrófilos, e sua função primária seria a proteção do parênquima pulmonar contra a destruição pela elastase. Indivíduos saudáveis apresentam níveis plasmáticos de 1,2 a 2,0 mg/mL, mas situações como inflamação aguda e infecção podem aumentar sua concentração (Travis & Salvesen, 1983b). Dados cristalográficos revelam que essa proteína possui estrutura compatível com outras serpinas, apresentando o RCL exposto e clivado na posição Met358-Ser359 (Huntington *et al.*, 2000). É um inibidor irreversível da elastase de neutrófilos, porém também inibe outras peptidases neutrofílicas como catepsina G e protease-3 (Travis & Salvesen, 1983b).

1.5.3.2 α_1 -antiquimotripsina

A α_1 -antiquimotripsina é uma glicoproteína sintetizada nos hepatócitos e secretada no plasma. A concentração plasmática é de aproximadamente 0,25 mg/mL e aumenta em torno de 5x durante a inflamação aguda (Calvin & Price, 1986). Contém 400 aminoácidos

e possui dois sítios de glicosilação nas posições Asn70 e Asn104. Possui massa molecular de 68 kDa, os glicosídeos representam quase 26% da massa total da proteína (Travis *et al.*, 1978b). Inibe serino-endopeptidases do tipo da quimotripsina. As principais enzimas inibidas são catepsina G, quimotripsina e quimase de mastócitos. O centro reativo dessa serpina foi identificado, onde os resíduos Leu358-Ser359 representam P₁-P₁' , respectivamente (Travis *et al.*, 1978a).

1.5.3.3 Calistatina

A atividade da calicreína, que é responsável pela formação de bradicinina, é regulada pela serpina calistatina. É uma proteína com massa molecular de 58 kDa e pI variando de 4,6 a 5,2 (Zhou *et al.*, 1992; Chao & Chao, 1995). A alta seletividade para calicreína é atribuída aos resíduos Phe-Phe localizados na posição P₂-P₁ do RCL (Chen *et al.*, 2000a; Chen *et al.*, 2000b), porém essa característica é inesperada, pois calicreína possui especificidade primária por resíduos Met e Arg no P₂ - P₁ dos seus substratos. A calistatina é uma proteína que possui sítio de ligação à heparina, assim como a antitrombina, o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e o inibidor de proteína C (PCI). Ao contrário das serpinas mencionadas, que apresentam aumento da atividade inibitória quando ligadas à heparina, com a calistatina, ao invés de ocorrer aumento da função inibitória, a mesma é perdida (Zhou *et al.*, 1992).

1.5.3.4 Inibidor de C1

A via clássica do sistema complemento é iniciada pela ligação e ativação do complexo C1, que consiste em C1q, C1r e C1s. C1q pode ligar diretamente a IgG e IgM ligada diretamente à superfície da bactéria ou diretamente via ligação com ácido lipoteicóico ou outras estruturas. Quando C1q liga-se às suas peptidases associadas, C1r e C1s, elas são ativadas e formam o complexo C1 ativo, que cliva C4 e C2 para gerar a C3-convertase. Essa via é controlada pelo inibidor de C1, que é um importante inibidor das serino-endopeptidases C1s e C1r, e provavelmente também de MASP-1 e MASP-2,

proteínas que estão envolvidas na via da lectina, dificultando a ativação de C4 e C2 (Walport, 2001a; Walport, 2001b)

A estrutura primária do inibidor C1 foi determinada com base no sequenciamento de DNA e peptídeos obtidos por digestão parcial da proteína nativa. A cadeia polipeptídica do inibidor é composta por 478 resíduos (53 kDa), o que equivale a 51% da massa molecular aparente da proteína circulante (104 kDa). Essa proteína é altamente glicosilada, possui 11 sítios de glicosilação confirmados e outros nove prováveis (Bock *et al.*, 1986). A esse inibidor também é atribuída a atividade de inibir calicreína e fator XIIa, limitando assim a produção do peptídeo vasoativo bradicinina. A concentração plasmática desse inibidor é de aproximadamente 240 mg/L. A deficiência desse inibidor resulta na doença conhecida como angioedema hereditário (HAE) (Bock *et al.*, 1986).

1.6 Serpinas em carrapatos

Mulenga *et al.* (2001) postularam que animais hematófagos, incluindo os carrapatos, codificam serpinas para modular e invadir as defesas do hospedeiro. Isso foi hipotetizado devido à participação das serpinas em sistemas finamente regulados em mamíferos, como: coagulação sanguínea, fibrinólise, inflamação e ativação do sistema complemento (Silverman *et al.*, 2001) e ao fato de que mais de 90 doenças em humanos são resultantes de mutações em serpinas (Potempa *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 2001),

Nos últimos anos, com o desenvolvimento e aplicação de técnicas de análise molecular, como a transcritômica e proteômica, novas informações acerca da composição molecular de diferentes tecidos são geradas, sustentando assim indícios sobre as possíveis funções destas moléculas na fisiologia desses organismos. Os sialomas e sialotranscritomas (do grego, *sialo* = saliva) estão gerando informações importantes sobre os componentes salivares desses parasitas (Mans *et al.*, 2008; Mans, 2011) O estudo pioneiro de análise transcritômica de glândula salivar foi realizado com o carrapato *A. variegatum* em 2002, gerando uma biblioteca de cDNA com aproximadamente 4.000 clones que foram sequenciados e anotados (Nene *et al.*, 2002). Nesse mesmo ano, outros três estudos transcritômicos foram publicados: estudos com *A. americanum* e *D. andersoni* (Bior *et al.*, 2002), assim como o sialoma de *I. scapularis* (Valenzuela *et al.*, 2002). Nos últimos dez anos o número de estudos proteômicos e transcritômicos de carrapatos vem aumentando

(Mans *et al.*, 2008; Mans, 2011). Os estudos proteômicos e transcritômicos têm evidenciado a presença de serpinas em grande parte dos parasitos estudados (Mans *et al.*, 2008).

1.6.1 *A. variegatum*

O carrapato *A. variegatum* é o maior parasita de ruminantes na África, responsável pela transmissão de *Erlchia ruminatum*, agente causador da “heart water” ou “cowdriosis” em ruminantes (Deem, 1998). Homogenatos de glândula salivar foram analisados por métodos proteômicos, e os fragmentos gerados analisados juntamente com os dados gerados pelo estudo do transcritoma de glândula salivar (Nene *et al.*, 2002). Essas análises revelaram a presença de cinco sequências que codificam serpinas com similaridade às sequências identificadas em *A. americanum* e *R. appendiculatus* (Nene *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2011).

1.6.2 *A. maculatum*

O carrapato *A. maculatum* é encontrado em diferentes estados norte-americanos próximos às regiões do Golfo e do Atlântico Oriental. É um carrapato que possui três hospedeiros: as larvas e ninfas parasitam pequenos roedores e aves terrestres, enquanto os adultos parasitam mamíferos de grande porte, sendo um grande problema para a pecuária bovina (Teel *et al.*, 2010). Resultados provenientes do sialotranscritoma desse carrapato revelaram a presença de 32 sequências relacionadas com serpinas. Com base no tamanho das sequências codificadas, oito delas aparentemente são sequências completas, todas possuindo predição para peptídeo-sinal, o que indica que possivelmente sejam secretadas (Karim *et al.*, 2011).

1.6.3 *R. appendiculatus*

Em 2003 foi proposta uma estratégia para clonagem de sequências que codificam serpinas. Através do alinhamento de diversas serpinas de vertebrados e invertebrados, verificou-se a presença do motivo conservado NAVYFKG entre as sequências. Com base nesse motivo, projetaram-se *primers* específicos utilizando a metodologia de *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) (Mulenga *et al.*, 2003). A estratégia de amplificação foi utilizada na identificação de quatro serpinas em *R. appendiculatus*, que receberam a nomenclatura de RAS (*R. appendiculatus serpin*). As ORFs de RAS-1, RAS-2, RAS-3 e RAS-4 codificam polipeptídeos com 378, 380, 398 e 486 aminoácidos, com massas moleculares preditas de 42,0; 42,7; 43,2 e 53,9 kDa, respectivamente. Através de análises *in silico*, todas as seqüências possuem sítios de N-glicosilação, de acordo com a sequência consensual N-X-S/T (onde N é uma asparagina, X qualquer aminoácido, seguido por uma serina ou treonina). RAS-3 e RAS-4 possuem predição para peptídeo sinal, sendo provavelmente secretadas, enquanto RAS-1 e 2 são preditas para localização intracelular. Dados de RT-PCR revelaram que RAS-1 a 4 são expressas em todos tecidos analisados (glândula salivar, intestino, ovário, carcaça e carrapatos alimentados inteiros), sem expressão significativamente aumentada em algum dos tecidos (Mulenga *et al.*, 2003).

Com o objetivo de testar o potencial dessas proteínas para compor uma vacina, dois testes foram realizados. O primeiro deles utilizou uma mistura com as proteínas recombinantes rRAS-1 e rRAS-2 expressas em sistema procarioto (Imamura *et al.*, 2006). A imunização de bovinos com rRAS-1 e rRAS-2 confere proteção significativa contra carrapatos, resultando na redução de ingurgitamento em 61,4%, e em 28 e 43% no aumento de mortalidade de fêmeas adultas e machos, respectivamente. A diminuição do número de ninfas ingurgitadas reduz a transformação dessas em adultos. O aumento da mortalidade das fêmeas adultas resultou na redução na quantidade de ovos produzidos, o que em condições ambientais pode levar a uma redução drástica no número de parasitas no ambiente. Anticorpos produzidos contra saliva de *R. appendiculatus* não reconhecem as proteínas recombinantes rRAS-1 e rRAS-2. Levando em conta esse dado, somado à ausência de peptídeo sinal, as proteínas nativas supostamente exercem funções intracelulares. Elas são classificadas como antígenos ocultos, pois não são inoculadas no hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Anticorpos produzidos por animais imunizados com rRAS-1 e rRAS-2 quando sondados contra extratos proteicos de carrapatos inteiros,

reconhecem fortemente as proteínas nativas. Esses resultados sugerem que anticorpos contra as proteínas recombinantes podem induzir proteção *in vivo* através do comprometimento dessas moléculas que podem estar desempenhando papéis importantes na fisiologia do parasita (Imamura *et al.*, 2006).

O segundo experimento foi realizado utilizando outro modelo de vacinação em bovinos (Imamura *et al.*, 2008). As proteínas recombinantes rRAS-3, rRAS-4 e RIM-36, uma proteína imunodominante de 36 kDa, foram utilizadas para verificação do potencial imunoprotetor frente a uma infestação com *R. appendiculatus*. A imunização de bovinos com a combinação de rRAS-3, rRAS-4 e rRIM-36 foi eficiente na produção de anticorpos contra ambas proteínas e o soro dos bovinos imunizados reagem com as proteínas nativas presentes em extrato de glândula salivar. Esse experimento demonstrou proteção frente à infestação com fêmeas de *R. appendiculatus*, resultando em mortalidade de 39,5% e 12,8% para o grupo vacinado e controle, respectivamente. Além do mais, os níveis de mortalidade de *Theileria parva*, um protozoário transmitido por este carrapato, foram de 48,5 e 10,8% para o grupo vacinado e controle, respectivamente. Para avaliar os níveis de transmissão pelos parasitas infectados que se alimentaram nos bovinos imunizados, a ocorrência de *T. parva* foi determinada por *real-time* PCR. Embora a vacinação não proteja contra a infecção por *T. parva*, a ocorrência de patógenos nos bovinos foi reduzida (Imamura *et al.*, 2008).

1.6.4 *H. longicornis*

No carrapato *H. longicornis*, foram identificadas duas proteínas pertencentes à superfamília das serpinas, nomeadas HLS-1 e HLS-2 (*H. longicornis* serpins 1 e 2). As sequências foram identificadas utilizando a estratégia desenvolvida por Mulenga *et al.* (2003) (Sugino *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2005). HLS-1 possui 378 aminoácidos com massa molecular predita de aproximadamente 41 kDa, com alta similaridade com outras serpinas já identificadas. Análises de *Northern blotting* e RT-PCR revelam que a transcrição de HLS-1 é induzida pela hematofagia, sendo expressa somente no intestino durante o período de 24-48 h após a fixação do parasito no hospedeiro. Anticorpos policlonais contra saliva, não reagem com rHLS-1, sugerindo que a proteína nativa não é secretada no hospedeiro durante o parasitismo. O RCL, estrutura responsável pela

interação do inibidor com a protease, possui similaridade variando de 48-19 % com outras serpinas, onde o resíduo de aminoácido da posição P₁, que é responsável pela especificidade primária desses inibidores, é uma arginina (R), do mesmo modo que na antitrombina. Para investigar a atividade biológica da proteína recombinante a atividade anticoagulante de rHLS-1 foi testada por meio do ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Na presença de 6,7 pM a proteína recombinante prolonga o TTPa, confirmando atividade anticoagulante. Vacinação utilizando rHLS-1 resultou em mortalidade de 44% e 11% em ninfas e adultos, respectivamente, em coelhos imunizados com o antígeno e desafiados com larvas de *H. longicornis* (Sugino *et al.*, 2003).

O segundo inibidor, HLS-2, possui 398 aminoácidos com peso molecular calculado de 44 kDa. Análise do perfil transcricional por RT-PCR revelou que o RNAm é expresso exclusivamente pelos hemócitos e está presente na hemolinfa deste parasita. Com base no resíduo P₁ do RCL, quimotripsina e trombina são imputados como alvos para este inibidor. Através de ensaios *in vitro* utilizando rHLS-2 produzida em *Escherichia coli*, o tempo de coagulação sanguínea foi prolongado na presença de 6,0 µM da proteína recombinante. Também, a atividade de trombina foi inibida. Embora a atividade de rHLS2 é compatível com a atividade de uma serpin intrínseca de humanos, o cofator II da heparina, que atua inibindo trombina e modulando a hemostasia em vertebrados, o papel fisiológico desse inibidor em *H. longicornis* parece estar envolvido na regulação de processos internos do parasita, tendo em vista que o inibidor circula na hemolinfa. Sobretudo, anticorpos anti-saliva não reconhecem a proteína recombinante. Vacinação de coelhos com rHLS-2 confere proteção contra carrapatos, resultando em 45 e 43% de mortalidade em ninfas e adultos, respectivamente (Imamura *et al.*, 2005).

1.6.5 *A. americanum*

Utilizando a mesma estratégia para identificação de serpinas em *H. longicornis*, Mulenga *et al.* (2007) caracterizaram 17 sequências que codificam serpinas em *A. americanum*, que receberam o nome de *Lospin* (referente a *Lone Star Serpin*). Análises da expressão por RT-PCR revelaram que a maioria das sequências é transcrita predominantemente em intestino, ovário e glândula salivar. Análises filogenéticas com outras 15 serpinas de carrapatos revelaram conservação entre as diferentes espécies. A

inspeção visual das sequências de aminoácidos revelou a presença de dois padrões similares à sequência consenso do sítio de ligação a glicosaminoglicanos (X-B_n-X_m-B-X, onde X e B são resíduos não-básicos e básicos, respectivamente, n=1 ou 2 e m=1, 2 ou 3). A modelagem molecular tridimensional revelou a presença desses sítios nas α -hélices D e F com potencial eletrostático revelando “*basic patches*” em L5 e L-13 a L-16, muito semelhantes aos encontrados em antitrombina, que podem ser possíveis sítios de ligação à heparina.

A expressão em glândula salivar, presença de peptídeo sinal e alta similaridade com outras serpinas de carrapatos, motivaram o interesse do estudo das funções biológicas da Iospina-6, que neste estudo foi nomeada Aam S6 (*A. americanum* serpin 6), no processo de hematofagia (Chalaire *et al.*, 2011). Esse estudo sugere que Aam S6 é inoculada no hospedeiro durante a alimentação do parasita. Efetivamente, anticorpos anti-rAam S6 reagem especificamente com uma proteína salivar com o tamanho compatível (entre 43-45 kDa). Além do mais, anticorpos produzidos contra proteínas salivares, gerados por coelhos infestados repetidamente com *A. americanum* adultos, reagem especificamente com rAam S6. Estes dados indicam que algumas serpinas são inoculadas no hospedeiro para regular a hematofagia, porém a real função de Aam S6 ainda precisa ser investigada. Especula-se que Aam S6 está associada à regulação de eventos iniciais da hematofagia, análises de RT-PCR e *Western blot* revelam que tanto os níveis do respectivo RNAm como da própria proteína estão fortemente aumentados durante as 24-72 h de alimentação. O padrão de expressão (em todos os tecidos) sugere a importância desta proteína na fisiologia do parasita.

1.6.6 *I. scapularis*

Mulenga *et al.* (2009) desenvolveram uma estratégia para identificação de sequências que codificam serpinas em *I. scapularis*. O primeiro passo realizado para identificar genes que codificam serpinas em neste carrapato foi a criação de um banco de dados dos *supercontigs* obtidos dos dados genômicos e compilação das sequências de DNA depositadas no banco de dados VectorBase (Megy *et al.*, 2012) . A busca por sequências similares foi realizada utilizando o algoritmo BLASTX com base em sequências conhecidas de serpinas de carrapatos e mamíferos. Dessa forma foram

identificadas e caracterizadas 45 serpinas em *I. scapularis*. Baseado em análise de sequências, aproximadamente 93% delas são inibitórias e 88% são potencialmente secretadas, de acordo com a presença de predição para peptídeo sinal. As análises de RT-PCR mostraram que 84% (38/45) das serpinas são diferencialmente expressas em intestino e glândula salivar de fêmeas não alimentadas e parcialmente ingurgitadas.

1.6.7 *I. ricinus*

Em *I. ricinus*, uma biblioteca de cDNA foi construída a partir de transcritos expressos diferencialmente em fêmeas ingurgitadas (Leboulle *et al.*, 2002b). Dentre as sequências encontradas, uma delas possui similaridade com o inibidor de trombina humana e com o inibidor de elastase de neutrófilos/monócitos de suínos. A sequência codificante (ORF) foi clonada e expressa em sistema procarioto. A proteína recombinante, nomeada Iris (*Ixodes ricinus immunosuppressor*), foi inoculada em camundongos para produção de anticorpos policlonais, os quais foram usados para evidenciar a expressão da proteína nativa em glândula salivar de fêmeas alimentadas e saliva, com aumento da expressão do 3° ao 5° dia de ingurgitamento (Leboulle *et al.*, 2002a). A proteína recombinante foi purificada para examinar as propriedades de inibição frente a diferentes endopeptidases. Constantes de afinidade e de inibição demonstram que, entre os alvos testados, rIris tem alta afinidade por elastase leucocitária porcina (inibição de 74%). Este dado está de acordo com os resultados de estudos de modelagem estrutural, e com valores muito semelhantes aos publicados para α_1 -antitripsina, sugerindo que Iris é um inibidor de endopeptidases α_1 -antitripsina-like e enzimas elastase-like são seus alvos naturais. Embora o principal alvo de inibição sejam enzimas elastase-like, atividade contra trombina, fator Xa e t-PA (inibição de 28, 30 e 30%, respectivamente) foram constatadas, sugerindo que Iris pode atuar também como anticoagulante (Prevot *et al.*, 2006). Através de mutação sítio dirigida, mutantes foram construídos para alterar o resíduo P₁ na região do RCL (posição 340). Um mutante Met340Arg foi gerado visando modificar a especificidade do inibidor de elastase para fator Xa e/ou trombina (antitrombina é uma serpina intrínseca de mamíferos, que inibe trombina e fator Xa, e possui uma arginina no resíduo P₁ do RCL). Ensaios enzimáticos com a proteína alterada revelaram aumento de 10 vezes na inibição de trombina e fator Xa, aumento de 1000 vezes na afinidade por tripsina e aumento na

atividade inibitória contra plasmina (de 2% para 59%). Concomitantemente, a proteína alterada perdeu a habilidade de inibir elastase humana e porcina. Portanto, a mudança de uma metionina no resíduo 340 por uma arginina, transforma o inibidor α_1 -antitripsina-*like* em um inibidor antitrombina-*like*. O mutante Met340Arg gerado atua como um potente anticoagulante, inibindo tanto a via intrínseca como a via extrínseca da coagulação sanguínea. O potencial imunoprotetor deste inibidor foi verificado usando animais imunizados com a proteína recombinante: camundongos imunizados foram infestados com ninfas; e coelhos imunizados foram infestados com ninfas e adultos. Somente os coelhos imunizados apresentaram proteção, resultando na mortalidade de 30% e diminuição no ganho de peso dos parasitas (ninfas e adultos) e prolongação no tempo de ingurgitamento em adultos. A neutralização do inibidor com soro dos animais imunizados diminui a atividade inibitória dessa serpina (Prevot *et al.*, 2007).

Com o objetivo de identificar outras serpinas que são secretadas em *I. ricinus*, Chmelar *et al.* (2011) utilizaram a mesma metodologia utilizada por Mulenga *et al.* (2003) para identificação de serpinas, projetando *primers* degenerados baseado nos motivos conservados encontrados em serpinas. Quatro sequências de diferentes cDNAs que apresentam peptídeo sinal foram identificadas e nomeadas Irs-1, 2, 4 e 8. Ambas serpinas de *I. ricinus* possuem genes ortólogos em *I. scapularis*, e possuem identidade na sequência de aminoácidos entre 95% e 98%. Baseado nos dados da sequência, Irs-2 possui a sequência P-Y-S-L na região P₂-P₂' no RCL, sugerindo especificidade para endopeptidases quimotripsina-*like*. A serpina madura possui 376 aminoácidos, pI 5.53 e massa molecular predita de 41.9 kDa. O perfil de transcrição revelou aumento da expressão em glândula salivar de parasitas alimentados. A indução da transcrição de Irs-2 em glândula salivar após alimentação, juntamente com a conhecida propriedade anti-inflamatória da saliva deste parasita sugere participação de Irs-2 no processo de imunomodulação do hospedeiro. Utilizando modelo murino de inflamação aguda, foi revelado que a serpina Irs-2 inibe a formação de edema e o influxo de neutrófilos no tecido inflamado. Esta serpina inibe especificamente as endopeptidases quimotripsina-*like* catepsina G e quimase, que são secretadas após ativação de neutrófilos e mastócitos, respectivamente. Essas duas peptidases estão envolvidas em uma gama de processos associados com o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda. A catepsina G é conhecida principalmente pelo seu papel na remodelação tecidual durante a inflamação.

Além disto, está envolvida na ativação proteolítica de PAR-4 que é responsável pela ativação das plaquetas e conduz a agregação das mesmas. A inibição de catepsina G pelo *I. ricinus* influencia tanto o retardamento da remodelação tecidual assim como a agregação das plaquetas, facilitando a aquisição de sangue fluído. Excesso molar de Irs-2 também afeta a agregação plaquetária induzida por trombina (Chmelar *et al.*, 2011). Irs-2 teve sua estrutura terciária resolvida por cristalografia de raios-X, sendo a primeira serpina de parasitos a ter sua estrutura tridimensional caracterizada por esta metodologia (Kovarova *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

Levando em conta a importância das serpinas na regulação de diversos processos fisiológicos em organismos multicelulares, e os escassos dados sobre essa superfamília de inibidores no carrapato bovino, os objetivos deste trabalho consistiram na identificação e caracterização de serpinas em *R. microplus*. Dessa forma, os objetivos específicos consistiram em:

- Identificação de sequências nucleotídicas relacionadas a serpinas em *R. microplus*;
- Análise molecular e perfil transcricional de serpinas em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*;
- Obtenção de uma serpina recombinante de *R. microplus*.

3. RESULTADOS

Esta seção está dividida em dois capítulos: o primeiro capítulo está apresentado na forma de manuscrito a ser submetido para publicação em revista científica. Este capítulo está formatado conforme as exigências da revista, contendo introdução, resultados, discussão e materiais e métodos. No segundo capítulo estão apresentados os demais resultados da dissertação, apresentados na forma de materiais e métodos, resultados e discussão.

3.1 Capítulo I

Identification of serpins in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico **Insect Molecular Biology**

Neste trabalho descrevemos a identificação e caracterização de serpinas em *R. microplus*. Com o uso de ferramentas de busca em banco de dados, identificamos 16 sequências que codificam proteínas da superfamília das serpinas. Análise transcricional por RT-PCR revelou que esses genes são diferencialmente transcritos nos diferentes tecidos testados, e nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito. Análises estruturais *in silico* revelam que esses inibidores possuem estrutura terciária compatível com as de serpinas inibitórias.

Title:

Identification of serpins in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Authors:

Lucas Tirloni^a, Adriana Seixas^{a,b}, Itabajara da Silva Vaz Jr^{a,c} and Carlos Termignoni^{a,d}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil.

^b Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite 245, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil.

^c Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Brazil.

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil.

#Corresponding author: Itabajara da Silva Vaz Jr

Tel.: + 55 (51) 33086078; Fax + 55 (51) 33087309

E-mail address: itabajara.vaz@ufrgs.br

Authors e-mail address:

Lucas Tirloni: ltirloni@gmail.com

Adriana Seixas: adriana@cbiot.ufrgs.br

Carlos Termignoni: ctermignoni@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The members of serpin superfamily control different proteolytic pathways in many organisms. In humans, serpins regulate pathways, such as blood coagulation, inflammation, complement activation, fertilization and food digestion. Parasitic organisms, including ticks, encode serpins to disrupt host homeostatic systems. In this study, twenty-six sequences encoding putative serpins in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were identified *in silico*. From these 26 identified predicted serpins, sixteen are full-length sequences and named as RmS 1-16 (*R. microplus* Serpin). Transcriptional profiling revealed that RmS are differentially expressed in tick tissues and developmental stages. Phylogenetic analysis considering RmS and 37 serpins from other tick revealed that, serpins are conserved among different tick species. Identification of putative signal peptides, suggests that 7 from 16 RmS are secreted proteins. Interestingly, the putative secreted RmS-3, 9, 13, 15 and 16, the mRNA transcription are up-regulated in salivary glands of partially toward fully engorged tick, and except to RmS-3, all these RmS possesses basic residues (R/K) at P₁ position in their reactive center loop (RCL), suggesting a role in tick/host interaction. Three-dimensional models and structural-based alignment revealed the presence of three β -sheets and nine α -helices in all RmS structures, displaying a three-dimensional structure typical for native inhibitory serpins, with RCL exposed.

Key-words: cattle tick, serpin, endopeptidase inhibitors, blood-feeding.

Introduction

A wide variety of mammalian serine endopeptidases are regulated by proteins belonging to the serine proteases inhibitors (serpin) superfamily. Serpins contain between 350 and 500 amino acids residues with molecular weight ranging from 40 to 60 kDa (Gettins, 2002; Silverman et al., 2001). Typically, a serpin contains three β -sheets (A, B and C) and eight or nine α -helices (hA-hI). Additionally, serpins possess a reactive center loop (RCL) which is a solvent exposed flexible stretch of 21 amino acid residues between β -sheets A and C and contains the recognition site to the target endopeptidase (Silverman et al., 2001). The RCL structure extends from P₁₇-P₄' in the Schechter & Berger (1967) notation. Inhibitory serpins are generally recognized by a consensus pattern in their RCL: P₁₇[E]-P₁₆[E/K/R]-P₁₅[G]-P₁₄[T/S]-P₁₃[X]-P₁₂₋₉[A/G/S]-P₈₋₁[X]-P₁'-P₄'[X] (Hopkins et al., 1993; Irving et al., 2000). This motif contains the bond between residues P₁-P₁' which is cleaved by the target endopeptidase. Cleavage at this scissile bond triggers a dramatic conformational change in the molecule, which is so fast that catalysis proceeds only until formation the acyl enzyme intermediary, releasing the C-terminal peptide product (Huntington et al., 2000). The N-terminal peptide of the loop inserts itself into the β -sheet A, carrying the enzyme molecule still attached as an acyl enzyme to the serpin opposite pole. This violent event disrupts the enzyme catalytic site structure in order which hydrolysis of acyl enzyme does not proceed and the covalent acyl enzyme complex persists (Forsyth et al., 2003), therefore serpins are "suicide" or "single use" inhibitors (Huntington et al., 2000). The majority of serpins inhibit serine endopeptidases, although some can inhibit endopeptidases from other classes. For example, the human squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA-1) is a potent inhibitor of cysteine cathepsins K, L and S (Kanaji et al., 2007; Schick et al.,

1998) and the viral serpin Crm-A is a specific inhibitor of the human interleukin-1 converting enzyme (Ray et al., 1992). Some serpins also perform non-inhibitory functions, acting as hormone transporters (Hammond et al., 1987) or molecular chaperones (Sauk et al., 2005).

To date over 500 members of the serpin superfamily inhibitors have been identified in animals, poxviruses, plants, bacteria and archae (Irving et al., 2000). Genomic data analyses indicate many multicellular eukaryotes have many serpins: thirty-six in humans, thirteen in *Drosophila*, twenty-nine in *Arabidopsis thaliana* and nine in *Caenorhabditis elegans* (Irving et al., 2000; Rawlings et al., 2004; Silverman et al., 2001). In humans, the majority of serpins act as negative regulators of some pathways: serpins like α_1 -antitrypsin, C1-inhibitor, antithrombin and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) play crucial roles in the control of endopeptidases involved in inflammation, complement activation, blood coagulation and fibrinolytic pathways, respectively (Rau et al., 2007; Silverman et al., 2001). Given the importance of the proteolytic processes that they control, deficiencies of human serpins are linked to diseases, like emphysema (α_1 -antitrypsin deficiency), thrombosis (antithrombin deficiency), angioedema (C1 esterase inhibitor deficiency), familial dementia (neuroserpin polymerization) and cirrhosis (α_1 -antitrypsin polymerization) (Aulak et al., 1988; Bruce et al., 1994; Davisc et al., 1999; Law et al., 2006; Lomas et al., 1992).

As endopeptidases and serpins play pivotal role in mammalian homeostasis maintenance, it is assumed that ticks produce serpins in order to disrupt host homeostatic balance to their advantage (Mulenga et al., 2001). Indeed, a number of serpin-encoding cDNAs have been identified in several ticks, including *Amblyomma americanum* (Mulenga et al., 2007), *Haemaphysalis longicornis* (Imamura et al., 2005; Sugino et al., 2003), *Ixodes ricinus* (Leboulle et al., 2002), *Ixodes scapularis* (Mulenga

et al., 2009), *Rhipicephalus appendiculatus* (Mulenga et al., 2003), *Amblyomma cajennense* (Batista et al., 2008), *Amblyomma variegatum* (Ribeiro et al., 2011), *Amblyomma maculatum* (Karim et al., 2011), *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 2008) and *Antricola delacruzi* (Ribeiro et al., 2012). Biochemical experimentation showed that recombinant tick serpins have anticoagulant and immunosuppressive activities (Imamura et al., 2005; Lebouille et al., 2002; Prevot et al., 2006; Prevot et al., 2009). Moreover, mortality and reduced feeding efficiency occurs when *I. ricinus* (Prevot et al., 2007), *H. longicornis* (Sugino et al., 2003) and *R. appendiculatus* (Imamura et al., 2008; Imamura et al., 2006) feed on serpin-immunized hosts. This demonstrates the importance of these inhibitors in tick physiology and tick/host interaction. In this study we report the identification and characterization of 16 sequences-encoding serpins from the cattle tick, named as *R. microplus* Serpins (RmS). The cDNA sequences were used to characterize the serpin gene family of *R. microplus* through bioinformatics, and to examine expression profiles of the serpins among different tissues and developmental stages of the cattle tick.

Results

Identification of cDNA encoding R. microplus serpins (RmS)

Twenty six cDNA sequences encoding putative serpins were successfully identified probing *R. microplus* EST databases with tick and mammalian serpin sequences. Considering serpins are 350-500 amino acids long proteins with 40-60 kDa, and the presence of start and stop-codon, from these 26 identified predicted serpins, sixteen RmS (1 – 16) are full-length sequences (Table 1) and were selected for further studies.

Table 1. Identification of RmS sequences in *Rhipicephalus microplus* EST databases.

Serpins ID ^a	EST database	
	TIGR ^b	Rm-INCT-EM ^c
RmS-1	TC23827	-
RmS-2	TC24850	Rm-6778
RmS-3	TC16894	Rm-23203, Rm-404
RmS-4	TC22306	Rm-8063
RmS-5	TC16400	-
RmS-6	TC15941	Rm-12491, 12492 e 12493
RmS-7	TC22370	-
RmS-8	-	Rm-53152
RmS-9	-	Rm-62283
RmS-10	-	Rm-8387
RmS-11	-	Rm-92186
RmS-12	TC16456, TC20312, TC15274	Rm-6949
RmS-13	TC17980	Rm-41670
RmS-14	CV442791, CV442792	Rm-74683, Rm-74684
RmS-15	CK178656	Rm-1195, Rm-1196
RmS-16	TC15356	Rm-36916, Rm-36917

^a Sequences encoding *R. microplus* serpins were named RmS, in an acronym representing *R. microplus* serpin.

^b The nucleotide sequences encoding serpin were retrieved from the DFCI *Boophilus microplus* Gene Index – TIGR

^c Unpublished database produced by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM) using the Illumina/Solexa platform.

Sequence analysis

RmS as serpins: RmS predicted amino acid sequences showed high similarity to known tick serpins available in GenBank using BLASTP search against the non-redundant protein database (Table 2). All RmS predicted polypeptides showed the presence of the consensus sequence N-[TA]-[VIM]-[YLH]-F-[KRT]-G (Figure S1), similar to the conserved serpin amino acid motif NAVYFKG. Scanning for amino acid sequence patterns on the ScanProsite demonstrated most deduced proteins contain the serpin signature PS00284 ([LIVMFY]-[G]-[LIVMFYAC]-[DNQ]-[RKHQS]-[PST]-F-[LIVMFY]-[LIVMFYC]-X-[LIVMFAH]), except for RmS-5, RmS-13 and RmS-14.

Table 2. Polypeptide features of *R. microplus* serpins (RmS) sequences.

ID	SP ^a	Putative function ^b	N-gly sites ^c	MW(kDa) ^d	pI ^d	Best match (%identity) ^e
RmS-1	-	inhibitory	4	41.5	6.27	ABS87359.1 Lospin-7 (46)
RmS-2	-	inhibitory	2	42.5	6.22	AAK61375.1 Ras-1 (82)
RmS-3	+	inhibitory	3	41.7	5.45	AAK61377.1 Ras-3 (94)
RmS-4	-	inhibitory	3	37.2	6.01	ABS87356.1 Lospin-4 (66)
RmS-5	-	inhibitory	1	42.6	9.07	ABS87354-1 Lospin-2 (61)
RmS-6	+	inhibitory	2	42	5.72	AEO34349.1 Ams-2 (69)
RmS-7	-	inhibitory	2	44.2	5.83	ABS87359.1 Lospin-7 (47)
RmS-8	-	inhibitory	4	42.9	5.95	AEO35320.1 Ams-9 (67)
RmS-9	+	inhibitory	1	41	8.73	AEO34447.1 Ams-1 (33)
RmS-10	+	inhibitory	3	41.9	5.67	ABS87356.1 Lospin-4 (64)
RmS-11	-	inhibitory	2	42.6	6.42	AAK61375.1 Ras-1 (76)
RmS-12	-	non-inhibitory	1	44.7	5.59	EEC05766.1 Iss-2 (59)
RmS-13	+	inhibitory	1	43.5	6.06	AEO33016.1 Ams-11 (80)
RmS-14	-	inhibitory	2	42.7	5.77	ABS87359.1 - Lospin-7 (76)
RmS-15	+	inhibitory	2	42.6	6.82	AEO34218.1 - Ams-7 (85)
RmS-16	+	inhibitory	3	41.8	8.95	ABS87360.1 - Lospin-8 (43)

^aSignal Peptide (SP) were predicted using the SignalP 4.0 server, the symbols (+) and (-) representing the presence and absence of signal peptide sequence, respectively.

^bThe prediction to inhibitory or non-inhibitory function is based on the RCL consensus sequence (Hopkins *et al.*, 1993).

^cPutative N-glycosylation sites were predicted using the NetNGlyc 1.0 server, based on the putative N-glycosylation site sequence N-X-T/S.

^dMolecular weight (MW) and theoretical isoelectric point (pI) were calculated using the Compute pI/Mw tool via the ExPASy website.

^eThe best matches identities were obtained using BLASTP against the non-redundant protein database in GenBank. The numbers represents the GeneBank accession numbers. Ras (*R. appendiculatus* serpin), Ams (*Amblyomma maculatum* serpin), Lospin (*Amblyomma americanum* serpin) and Iss (*Ixodes scapularis* serpin).

Reactive center loop (RCL) of RmS: Depending on the RCL sequence, family members can be identified as inhibitory or non-inhibitory serpins. All RmS have the consensus sequence characteristic for inhibitory serpin (P₁₇[E]-P₁₆[E/K/R]-P₁₅[G]-P₁₄[T/S]-P₁₃[X]-P₁₂₋₉[A/G/S]-P₈₋₁[X]-P₁'-P₄'[X]), with some variations among them. Solely RmS-12 which has the RCL sequence deviated from the consensus (G-L-F-L residues in the P₁₂₋₉ position), suggesting a non-inhibitory function. At P₈ position, which has a high preference for the small threonine side chain (Gettins, 2002), all

serpins sequences are 100% conserved. The P₁ residue in RCL (which determines inhibitor primary specificity) is very variable among all RmS (Figure 1).

P₁₇[E]-P₁₆[E/K/R]-P₁₅[G]-P₁₄[T/S]-P₁₃[X]-P₁₂₋₉[A/G/S]-P₈₋₁[X]-P₁'-P₄[X]

ID	P ₁₇	P ₁₆	P ₁₅	P ₁₄	P ₁₃	P ₁₂	P ₁₁	P ₁₀	P ₉	P ₈	P ₇	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
RmS-1	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	A	G	A	G	S	A	A	P	A
RmS-2	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	M	M	A	A	C	C	L	S	S
RmS-3	E	E	G	T	I	A	T	A	V	T	G	L	G	F	V	P	L	S	A	H	Y
RmS-4	E	E	G	T	I	A	A	A	V	T	G	L	F	V	M	P	S	S	S	L	Y
RmS-5	E	Q	G	T	V	A	A	A	V	T	A	I	R	V	S	V	K	S	G	K	S
RmS-6	E	E	G	T	E	A	A	A	V	T	G	V	I	G	V	N	R	I	G	I	E
RmS-7	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	V	D	I	G	V	G	A	A	T	P	P
RmS-8	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	V	M	G	F	G	C	S	A	N
RmS-9	E	E	G	S	E	A	D	S	A	T	L	L	R	I	S	G	K	A	A	E	E
RmS-10	E	E	G	T	V	A	A	A	V	T	G	L	F	V	R	P	T	A	P	L	P
RmS-11	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	A	V	M	M	V	A	C	C	M	S	S
RmS-12	E	D	G	V	E	G	L	F	L	T	P	L	I	M	M	C	Y	A	G	V	S
RmS-13	E	V	G	T	R	A	V	A	A	T	Q	A	Q	F	V	S	K	S	L	V	H
RmS-14	E	E	G	T	E	A	A	A	A	T	G	V	T	M	M	T	Y	C	A	R	M
RmS-15	E	E	G	S	E	A	A	A	V	T	G	F	V	I	Q	L	R	T	A	A	F
RmS-16	E	E	G	S	E	A	A	A	V	T	G	V	T	I	N	T	R	T	T	T	G

scissilebond

Figure 1. The eight-residue pattern of the RCL that characterizes inhibitory serpins (Hopkins et al., 1993) of predicted amino acids sequence of RmS RCL. The residues in the RCL are numbered according to the nomenclature developed by Schechter & Berger (1967), where residues on the amino-terminal side on the scissile bond (P₁-P₁') are noted primed and those on carboxyl-terminal side primed. Residues were marked in gray in accordance with the consensus sequence of RCL. The boxed residues representing the scissile-bond and bold-faced residues were predicted P₁.

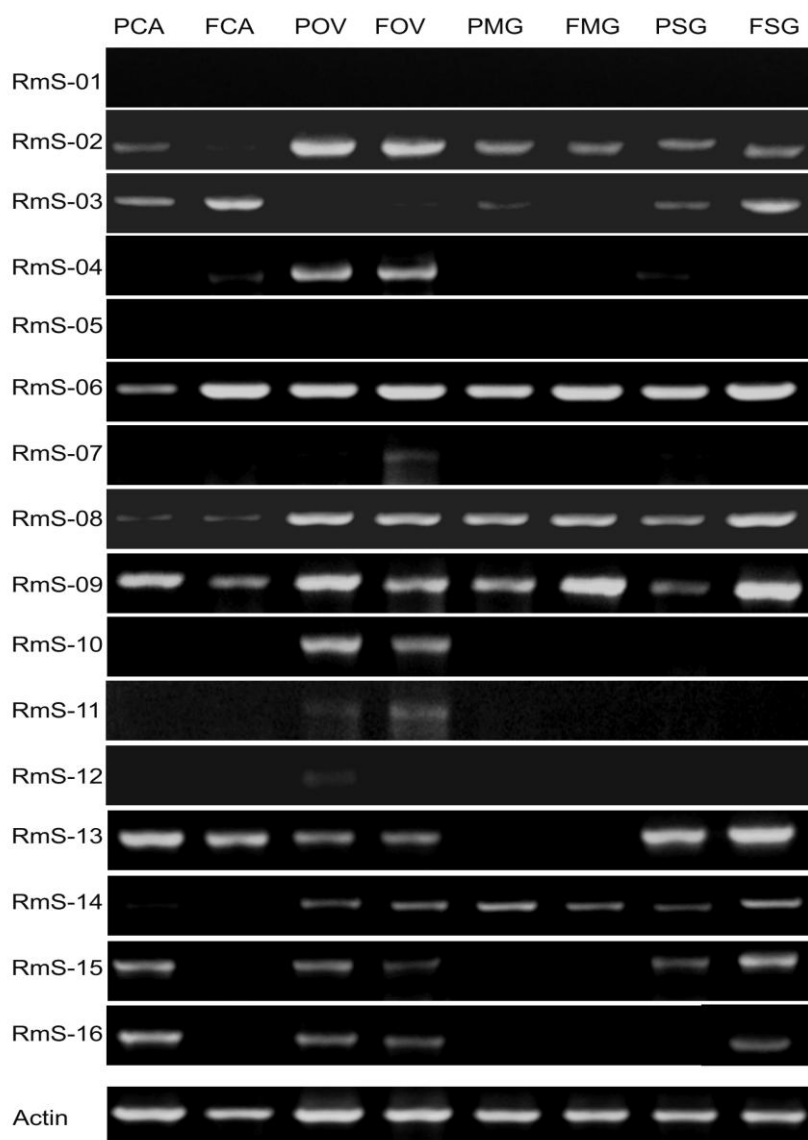


Figure 2. The transcription profile of RmS was analyzed using cDNA synthesized from total RNA extracted from partially engorged (P) and fully engorged (F) *R. microplus* females salivary gland (SG), midgut (MG), ovaries (OV) and carcass (C, representing the tick remnant after removal of above mentioned tissues). Tick actin was used as internal RT-PCR control. The primers used for RT-PCR analysis were listed on the Table S1.

Expression pattern analysis

RT-PCR analysis showed that 14 of the 16 RmS RNA were transcribed in the analyzed tissues (Figure 2). RmS-3 transcripts were found in most of the tissues

analyzed except in POV, FOV and FMG. RmS-2 was transcribed in all tissues, showing a transcription in POV and FOV and a lower transcription in FCA. RmS-4 was transcribed in POV and FOV. All tissues transcribed RmS-6 and RmS-8, although a weak transcription was observed for RmS-6 in PCA and for RmS-8 in carcass (PCA and FCA). RmS-9 was transcribed in all tissues with an increase in mRNA abundance in fully engorged female MG and SG compared with partially engorged female RmS-10 transcription was restricted to ovarians in both stages (POV and FOV). RmS-14 was transcribed in all tissues, except FCA. RmS-15 and 16 had similar transcriptional profiles, but Rms-16 was not transcribed in PSG. Three sequences were weakly detected, RmS-7 in FOV, RmS-12 in POV and RmS-11 in POV and FOV RmS-1 and RmS-5 amplified products were not detected in all tested tissues.

Phylogenetic analysis

Amino acid sequences of all RmS and 37 serpin sequences of several tick species were subjected to phylogenetic analysis and their relationships were determined by a neighbor-joining analysis using alboserpin (a serpin from the mosquito *Aedes albopictus* [Calvo et al., 2011]) as outlier (Figure 3). RmS sequences segregated into different groups. RmS-3 segregated in the same branch with Ras-3 and Hls-2. RmS-3 possesses close identity to Ras-3 (95%) and Hls-2 (75%). These three serpins had a predicted secreted proteins and the presence of L at P₁ position in RCL and are related with the serpins from the compressed group 1 (lospin-5, lospin-6, lospin-7, lospin-11, lospin-12, lospin-13, lospin-14, lospin-15, lospin-16, lospin-17 and three Ams (*A. maculatum* serpins), Ams-5, Ams-6 and Ams-8 (Mulenga et al., 2007; Karim et al., 2011). All serpins belonging to this compressed group are predicted as extracellular

proteins, except lospin-11, lospin-7. Also, serpins of this group, except lospin-7, Ams-5 and Ams-8, had L at RCL P₁ position.

RmS-4 and RmS-10 segregated together in the same branch, but they differ in the presence of leader sequence as well as in the RCL P₁ residue. However, the expression profile of these sequences is similar; both were predominantly transcribed in ovaries. RmS-5 segregated in a single branch nearby lospin-1, lospin-2 and lospin-3, and all sequences in this branch present K at RCL P₁ position. Except lospin-1, all sequences in this branch do not have a signal peptide. RmS-15 segregates together with Ams-7 and Iris-8, which share (i) an amino acids identity of 82.8% and 76.1%, respectively; (ii) a signal peptide; (iii) 100% identity in RCL and (iv) a R residue at P₁ position. RmS-9 and RmS-16 are distantly related to any other tick serpin, they segregate alone in one branch; have a signal peptide and a basic amino acid residue at P₁. RmS-6 segregated together with Ams-2, sharing an identity of 80.9% in RCL with R at P₁ position. RmS-13 segregated alone and is not related with others tick serpins. RmS-1 and RmS-7 segregated together in a branch, both do not have signal peptide and did not transcribed in tested tissues. RmS-14 and Ras-2 segregated together, these two sequences do not have signal peptide, possess Y at P₁ position and ~90% sequence identity in RCL. RmS-2 and RmS-11 segregated together with Ras-1, they do not have signal peptide and have C at RCL P₁ position. RmS-2 showed 100 and 90% identity in RCL region compared to Ras-1 and RmS-11, respectively. Both RmS-2 and RmS-11 were predominantly transcribed in ovaries. RmS-12 and RmS-8 segregated alone in two independent branches of the tree.

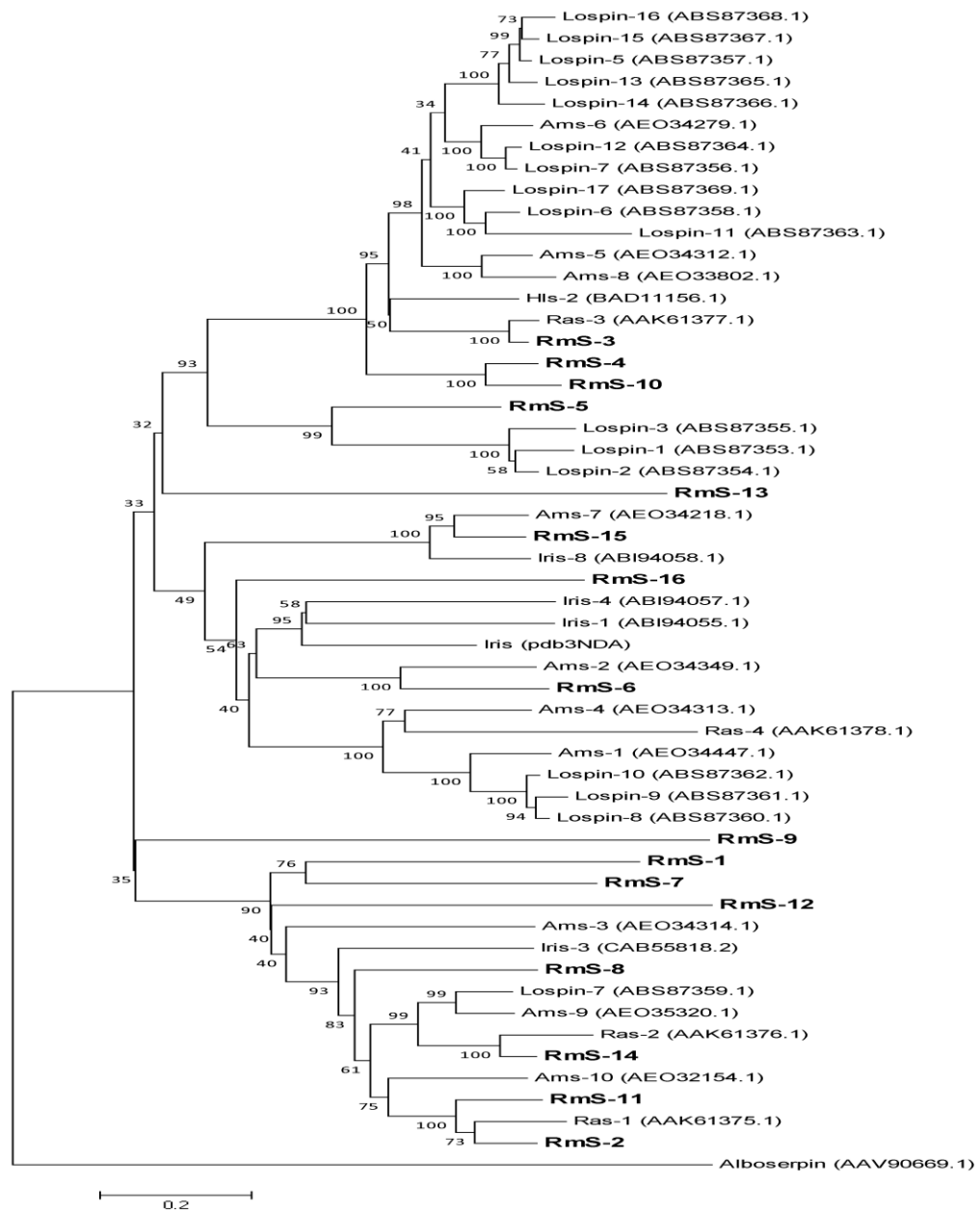


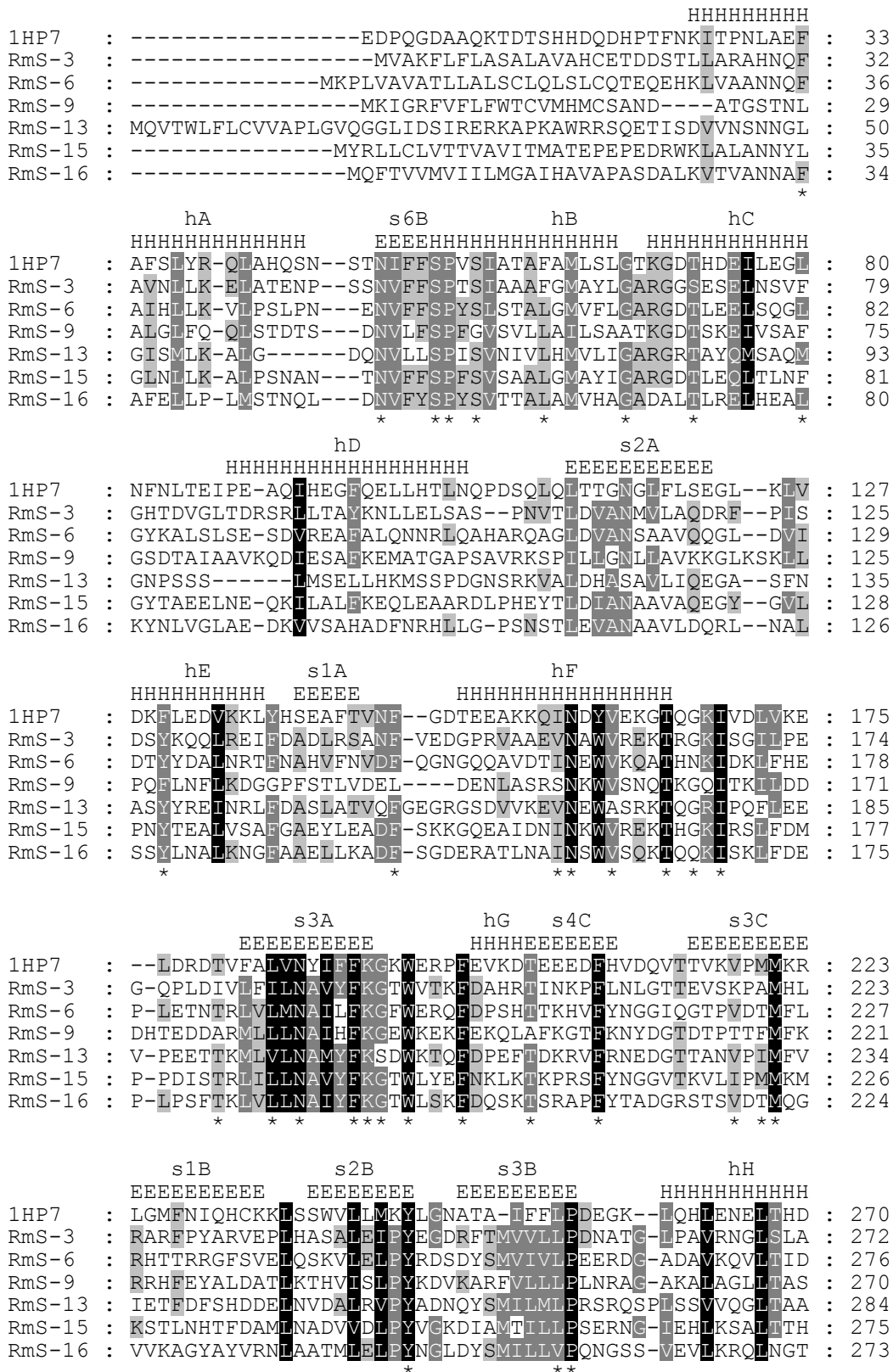
Figure 3. Neighbor-joining analysis of RmS polypeptides and others tick serpins. The alignment of retrieved sequences was created using Muscle (Edgar, 2004) in Mega 5.0 program. Except for RmS sequences, all other sequences were retrieved from GenBank (accession numbers in parenthesis).

Serpin conserved structure of RmS

A structure-based sequence alignment of putative secreted proteins transcribed in salivary gland (RmS-3, RmS-6, RmS-9, RmS-13, RmS-15 and RmS-16) revealed that all of them had three β -sheet and nine α -helices, presenting a secondary structure characteristic of serpins (Figure 4). In order to confirm these features, the tertiary structures of RmS proteins were modeled using SwissModel Server (Figure 5). To RmS-3, the model was generated from amino acid 5 to 382 using heparin cofactor II (1JMJ) as template (28 % identity) having a QMEAN4 score of 0.612 and Z-scores of -2.543. RmS-6 model was generated from amino acid 2 to 373 and plasminogen activator inhibitor 1 (1DB2) as template (26. % identity), the model had a QMEAN4 score of 0.541 and Z-scores of -3.748. RmS-9 model was generated from amino acid 2 to 375 using the human antithrombin (1ATH) as template (25 % identity), having a QMEAN4 score of 0.524 and Z-scores of -3.966. RmS-13 was generated from amino acid 23 to 389 using native plasminogen activator inhibitor 1 (1DB2) as template (29 % identity) and had a QMEAN4 score of 0.546 and Z-scores of -3.696. RmS-15 was generated from amino acid 14 to 382 using the native activated protein C inhibitor (2OL2) as template (30 % identity) and had QMEAN4 score of 0.585 and Z-scores of -3.051. RmS-16 was generated from amino acid 7 to 380 using the antithrombin complexed with factor IXa and pentasaccharide (3KCG) as template (34% identity) and had a QMEAN4 score of 0.582 and Z-scores of -3.021.

All modeled RmSs show a typical three-dimensional structure of native inhibitory serpins with the RCL completely exposed (Figure 5). Furthermore, comparing 219 serpins sequences, Irving and colleagues (2002) identified 51-core amino acid residues as associated to the inhibitory action of serpins. The adaptation of this analysis by aligning the 16 RmS sequences with the human α_1 -antitrypsin (PDB 1HP7)

revealed that the 51-core residues that underpin the efficient functioning of an inhibitory serpins are 68–90 % (Figure S1).



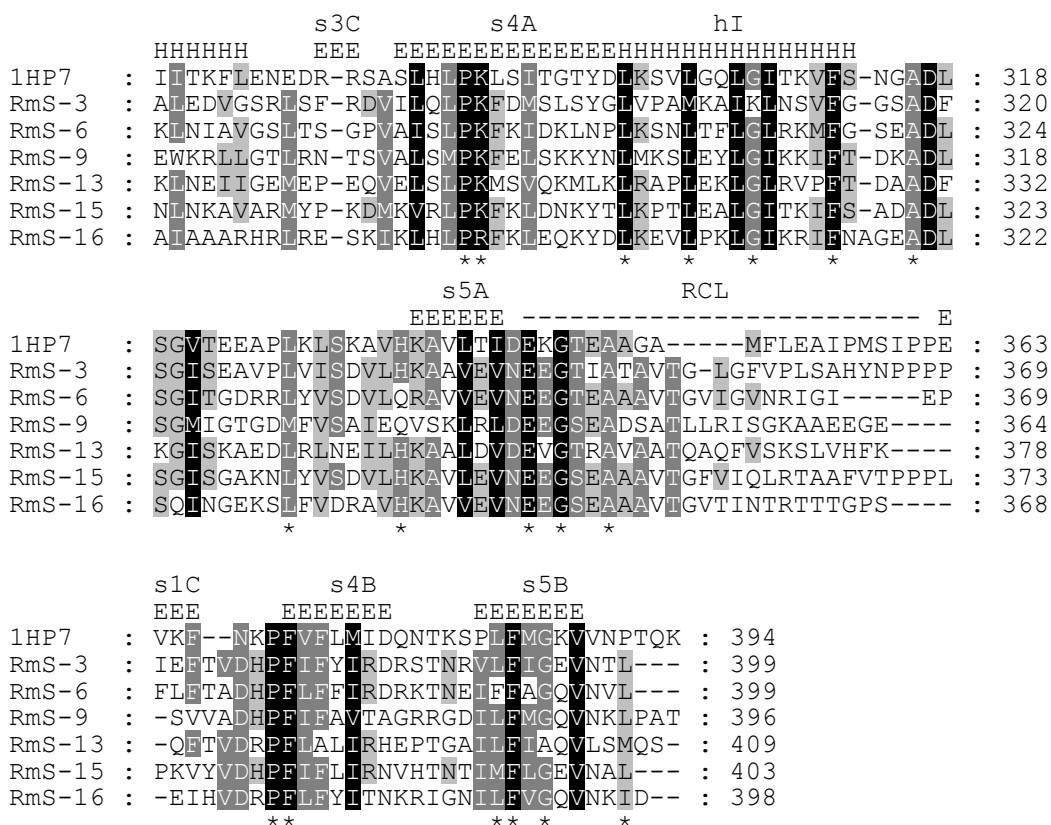


Figure 4. Structure-based sequence alignment was constructed by comparison with human α_1 -antitrypsin (PDB 1HP7) as modeling template, against putative secreted RmS (RmS-3, 6, 9, 10, 13, 15 and 16), using STRAP (Structure-based Alignment Program). Secondary structures assigned based on the 1HP7 tertiary structure, are labeled as “H” for α -helix and “E” for β -strand. Helices are labeled from “hA” to “hI” and β -strands that constitutes β -sheet A to C are labeled as “sA”, “sB” and “sC”, respectively. The residues that correspond to the 51 core residues (Irving *et al.*, 2000) are indicated by an asterisk (*). The high conserved residues are labeled in black and low in gray.

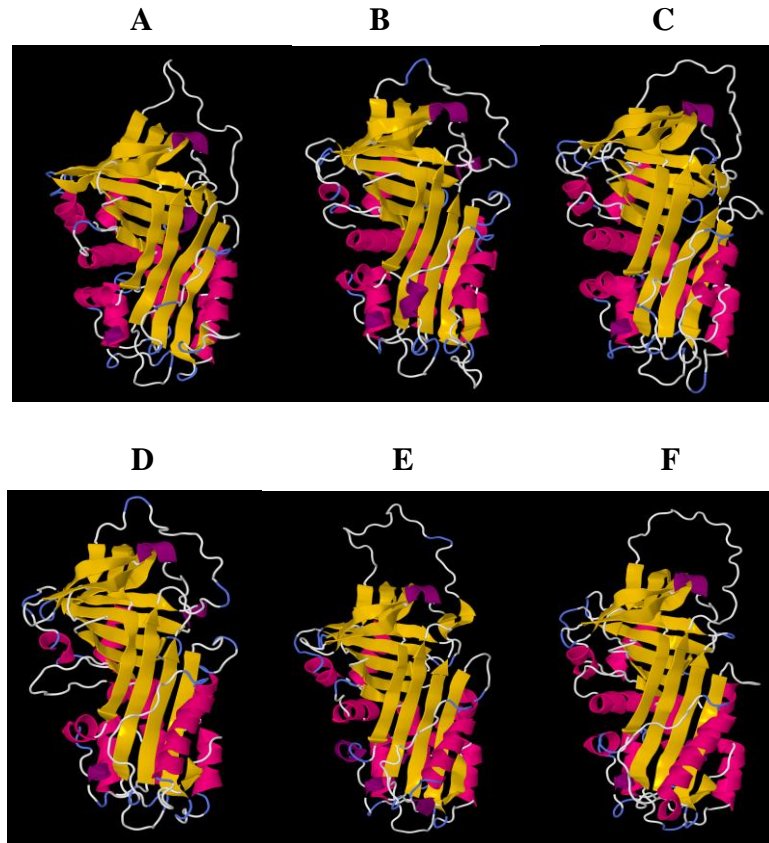


Figure 5. The putative secreted RmS proteins were used to develop RmS three-dimensional models using SwissModel server. The coordinates were visualized using Jmol program and shown the inhibitory native structure of serpins. (A) RmS-3, (B) RmS-6, (C) RmS-9, (D) RmS-13, (E) RmS-15 and (F) RmS-16.

Discussion

Ticks are blood-sucking arthropods that infest a large variety of vertebrate hosts (mammals, birds, reptiles, and amphibians) and to complete their blood meal, need to avoid three biological systems: (i) hemostasis; (ii) inflammation, and (iii) immunity. Ticks and other hematophagous animals produce a wide range of molecules with pharmacological activity to overcome these host systems in order to complete their feeding (Ribeiro, 1987). In mammals, these three pathways are regulated by serpins such as α_1 -antitrypsin, antithrombin, heparin cofactor II, α_1 -antiplasmin, kallistatin, activated protein C inhibitor and C1 inhibitor (Gettins, 2002; Rau et al., 2007).

Therefore, it is not so surprising that ticks possess serpins in their salivary armamentarium, because these proteins might contribute to the modulation of vertebrate hemostasis upon tick feeding. In addition to the modulation of the host responses, in invertebrates serpins play roles in modulation of prophenoloxidase systems, reproductive activity, innate immunity and hemolymph coagulation (Miura et al., 1995; De et al., 2002; Wang & Jiang, 2004; Reichhart et al., 2011)

The development and application of molecular biology techniques, such as transcriptomics and proteomics have assisted identification of several new tick serpins (Leboulle et al., 2002; Mulenga et al., 2003; Sugino et al., 2003; Imamura et al., 2005; Mulenga et al., 2007; Mulenga et al., 2009 Chmelar et al., 2011; Ribeiro *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012) suggesting the role of these proteins in tick physiology.

The analyses of two *R. microplus* transcript databases permitted to identify 16 full-length open read frames with similarity to sequences encoding tick serpins. These databases have sequences originate from tissues, life stages and, strains including larvae exposed to different environment conditions like heat, cold, host odor, and acaricide. Together, BmiGI database (Bellgard et al., 2012; Guerrero et al., 2005; Saldivar et al., 2008; Wang et al., 2007) and an unpublished database (Rm-INCT-EM database) have a significant fraction of the complete cattle tick genes. Search tools revealing that all 16 RmS have best matches to serpins from *A. americanum* (Mulenga et al., 2007), *R. appendiculatus* (Mulenga et al., 2003) and *A. maculatum* (Karim et al., 2011).

Seven of the 16 RmS are putative secreted proteins, in accordance with the presence of a signal peptide sequence. RmS-1 and RmS-6 really are present in the saliva of partially fed females, as revealed by a proteomic study of the *R. microplus* saliva (unpublished data). As expected, since most of serpins are glycosylates, the N-glycosylation sites were detected in all RmS amino acids sequences, suggesting a post-

translational glycosylation modification, and it is in accordance to previous results from other tick serpins (Mulenga et al., 2003; Mulenga et al., 2009).

The results revealed that RmSs are largely transcribed in various tick tissues but with significantly different intensities, underscoring their importance in regulation of different pathways in the tick physiology. The transcription of some putative secreted RmS in SG and MG (RmS-3, RmS-6, RmS-9, RmS-13, RmS-15 and RmS-16) suggest a role in hematophagy, important to keep host blood in a fluid state both at the feeding site as during the feeding process, blocking the coagulation factors. Also, these serpins transcribed in SG can be involved in modulation of the host immunity (Leboulle et al., 2002b). Lack of detection of some gene transcripts in this work (RmS-1 and RmS-5), which are present in the TIGR database, could be explained by the fact that this bank was based in a different *R. microplus* strain, in a different developmental stage and submitted to modified environmental conditions (Bellgard et al., 2012; Guerrero et al., 2005; Saldivar et al., 2008; Wang et al., 2007).

The reactive center loop (RCL) is an exposed loop in the serpin structure responsible for the interaction with the active site of the target endopeptidase. This structure is a mobile loop which has the ability to move in and out of the serpin β -sheet A. It has been proposed that this mobility is critical to serpin binding to the target endopeptidase (Hopkins et al., 1993; Irving et al., 2000; Silverman et al., 2001). Several regions are important in controlling and modulating serpins conformational changes. The RCL hinge region (P₁₅-P₉) provides mobility essential for the conformational changes in the RCL, enabling serpin-inhibitory activity (Irving et al., 2000). This hinge region (P₁₅-P₉) has a consensus sequence: P₁₅ usually being glycine and P₁₄ threonine or serine. Also, positions P₁₂-P₉ are occupied by short side-chain amino acid residues, such as alanine, glycine, or serine. These residues are thought to permit efficient and rapid

insertion of the RCL into the β -sheet A. Corresponding regions on non-inhibitory serpins deviate from this consensus (Hopkins et al., 1993; Hopkins and Stone, 1995), and mutations in the hinge region often convert inhibitory serpins into substrates (Irving et al., 2000; Hopkins et al., 1993). In the present study, putative RCL and scissile bonds of all serpins were predicted based on the consensus that there are 17 amino acids residues between the beginning of RCL hinge and the scissile bond (P_1-P_1') (Gettins, 2002; Hopkins et al., 1993; Irving et al., 2000). In accordance with the above pattern, all putative RmS serpins are predicted to have inhibitory function, except for RmS-12 which has the sequence G-L-F-L at $P_{12}-P_9$ (Figure 1). However, this statement can only be confirmed by biochemical assays showing these serpins inhibiting endopeptidase activity upon a substrate. However, we can consider that some serpins like α_2 -antiplasmin (Gettins, 2002) and serpin-1B from *Manduca sexta* (Li et al., 1999) have RCL shorter and longer than 17 residues, respectively.

The amino acid residue on the amino-terminal side of the scissile bond, the P_1 residue, is important to define the specificity of a serpin among the serine endopeptidases. For example, Serpin-1B from *M. sexta* has A at P_1 (residue 343) and is an elastase inhibitor. If this P_1 -A residue is changed by site-directed mutagenesis by a P_1 -K residue (A343K), the inhibitory activity against elastase is lost and then this serpin passes to inhibit trypsin, plasmin and thrombin (Li et al., 1999). The *I. ricinus* immunosuppressor (Iris) is a serpin with M at P_1 (position 340) and is a specific elastase inhibitor (Leboulle et al., 2002b). The mutant M340R does not inhibit elastase and is a powerful inhibitor of factor Xa and thrombin (Prevot et al., 2006). Other example is the human α_1 -antitrypsin variant Pittsburg, which is an effective thrombin inhibitor as a result of mutation from M to R in P_1 (Owen et al., 1983). -13. Key mammalian serpins such as α_1 -antichymotrypsin, α_1 -antiplasmin, antithrombin, protein C inhibitor and C1

inhibitor (Gettings, 2002) present a basic amino acid residue at RCL P₁ and are regulators of pathways such as blood coagulation, inflammation and complement activation. These pathways are thought to be important in the mammalian host defenses against blood sucking animals (Francischetti et al., 2009; Ribeiro, 1987). The identification of 6 RmSs with a basic residue at P₁ suggests they could have a role modulating one or more of these defense mechanisms. Five from the seven putative secreted serpins possess a basic residue at RCL P₁ position. Interesting, four of them (RmS-9, RmS-13, RmS-15 and RmS-16) have its transcriptional expression up-regulated from PSG toward FSG. Presumably, genes up-regulated by blood feeding are involvement in blood meal. To predict the inhibitory activity of these RmS, the high conservation of the core amino acid sequence and adoption of serpin consensus secondary and tertiary structures suggests that RmS-3, RmS-6, RmS-9, RmS-13, RmS-15 and RmS-16 are functional serpins.

Besides of the several tick ESTs encoding serpin sequence fragments present in Genbank, this is the first report attempting to characterize annotated serpins of the *R. microplus* cattle tick. . The characterization of serpin superfamily members in the cattle tick could be helpful for a better comprehension of the biological function they play in tick physiology.

Experimental procedures

Identification of serpins in R. microplus EST databse

The partial nucleotide sequences encoding for serpins proteins were found using Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) with the BLASTP, BLASTN and BLASTX algorithms against Bmi Gene Index (BmGI) available at the DFCI

(<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) (Bellgard et al., 2012; Guerrero et al., 2005; Saldivar et al., 2008; Wang et al., 2007) and a *R. microplus* transcriptome database created by our research group using Illumina Solexa sequencing (unpublished date) using as queries 26 serpins from other ticks and 07 serpins from mammals, all sequences deposited in GenBank: *A. americanum* serpins, Lospins 1 – 17 (ABS87353.1, ABS87354.1, ABS87355.1, ABS87356.1, ABS87357.1, ABS87358.1, ABS87359.1, ABS87360.1, ABS87361.1, ABS87362.1, ABS87363.1, ABS87364.1, ABS87365.1, ABS87366.1, ABS87367.1, ABS87368.1, ABS87369.1), *R. appendiculatus* serpins, Ras 1 – 4 (AAK61375.1, AAK61376.1, AAK61377.1, AAK61378.1), *Ixodes ricinus* serpins, Irs 1, 2, 4, 7 and 8 (ABI94055.1, ABI94056.1, ABI94057.1, ABI94058.1, EEC12320.1), kallistatin (AAC41706.1), protein C inhibitor (BAA93451.1), antithrombin III (CAA48690.1), heparin cofactor II (DAA20375.1), plasminogen activator inhibitor II (NP_001137290.1) and protein nexin I (NP_001130002.1). To validate the accuracy of *Rms* identification, sequences were tested for the presence of start-codon and stop-codon; size and molecular weight of the putative amino acids sequences, and the presence of two amino acids motifs described as conserved in known serpins: NAVYFKG and DVNEEG (Han et al., 2000; Miura et al., 1995)

Bioinformatic analyses

Analyses of deduced amino acid sequences were carried out using GeneDoc software (<http://nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>). Sequence alignment was performed using the Muscle algorithm (Edgar, 2004) in MEGA5 program (Tamura et al., 2011). Inferred amino acid sequences were scanned against amino acid motif in ScanProsite (Sigrist et al., 2010) and against known protein entries in GenBank using the BLASTP homology search program against the non-redundant proteins sequence database. The

presences of secretion signal sequence were predicted using the SignalP 4.0 server (Petersen et al., 2011). The putative N-glycosylation sites were found using the NetNGly1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Theoretical molecular weight and isoelectric points of the mature serpin proteins were calculated using the Compute pI/Mw tool via the ExPASy website (http://web.expasy.org/compute_pi/pi_tool-ref.html).

Biological material

Ticks were obtained from a *R. microplus* colony (Porto Alegre strain) maintained at the Faculdade de Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. The ticks were reared on calves, which were brought from a naturally tick-free area and maintained in individual boxes. Calves were infested with 10-day-old larvae. After 21 days, partially engorged (P) and fully engorged (F) females ticks were collected.

Tick dissection and RNA extraction

The collected ticks were rinsed with ethanol 70%. The dorsal surface was dissected with a scalped blade. Salivary glands (SG), midguts (MG) and ovaries (OV) were separated with fine-tipped forceps. The remaining material was named carcass (CA), representing the tick remnant after removal of SG, MG and OV. All tissues dissected as quickly as possible and washed with phosphate-buffered solution (PBS) in anRNase free environment. The dissected tissues were rapidly removed and placed in a tube containing TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations. The RNA concentration

and the purity of the extracts were assessed spectrophotometrically. The RNA samples were diluted in DEPC-treated water.

Semi quantitative RT-PCR

To get an insight into tissue distribution profiles of RmS sequences, gene specific primers for each RmS sequence were used (Table S1) to investigate the mRNA expression patterns of tissues mentioned above. Five µg of total RNA extracted was used as template for cDNA synthesis using the SuperScript III (Invitrogen, NY, USA) primed with oligo-dT. Five hundred ng of resulting cDNA was used as template for RT-PCR. The reactions were performed using follow steps: 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 57°C and 1 min and 30 s at 72°C with a final elongation at 68°C for 5 min. Reactions were performed using specific primers for each serpin sequence retrieved from the *R. microplus* database. The PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. As a positive control, RT-PCR with primers for tick actin gene (da Silva, Jr. *et al.*, 2005) was carried.

Phylogenetic tree analysis

Multiple amino acids sequences alignments of *RmS* and other ticks serpins retrieved from GenBank (accession numbers in Figure 4) were created using Muscle algorithm (Edgar, 2004a) in Mega5 program (Tamura et al., 2011). The phylogenetic analyses were performed using neighbor-joining analysis (Kumar et al., 2008). Gapped positions were treated by complete deletion. Poisson correction was used as a substitution model to determine pairwise distances. Confidence was determined using bootstrap values at 1,000 replicates.

Structure-based alignment and molecular modelling

To get insight in the structure of the RmS putative secreted proteins (RmS-3, RmS-6, RmS- 9, RmS-13, RmS-15 and RmS-16), the amino acids sequences were selected and subjected to structural based alignment using the STRAP (Structure based Alignment Program) (<http://www.charite.de/bioinf/strap/>) and the Muscle algorithm (Edgar, 2004). The secondary structures were superimposed on the structurally aligned sequences using the human α_1 -antitrypsin tertiary structure (PDB 1HP7) as template (Kim et al., 2001). The alignment sequences were subsequently viewed using the GeneDoc software (<http://nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>).

The mature putative secreted RmS sequences were selected to molecular modeling using SWISS-MODEL workspace in the automated mode (Arnold et al., 2006). The best 3D structures templates were predicted using the alignment of our sequences against structures of Protein Data Base proteins using BLASTP. QMEAN4 was the method used to estimate model reliability and prediction quality (Benkert et al., 2011). Illustrations of the 3D structures were generated using JMol software.

References

- Anderson, J.M., Sonenshine, D.E., Valenzuela, J.G., 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC.Genomics* 9, p. 552.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22, pp. 195-201.
- Aulak, K.S., Pemberton, P.A., Rosen, F.S., Carrell, R.W., Lachmann, P.J., Harrison, R.A., 1988. Dysfunctional C1-inhibitor(A_t), isolated from a type II hereditary-angio-oedema plasma, contains a P1 'reactive centre' (Arg444----His) mutation. *Biochem.J.* 253, pp. 615-618.
- Batista, I.F., Chudzinski-Tavassi, A.M., Faria, F., Simons, S.M., Barros-Batesti, D.M., Labruna, M.B., Leao, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., 2008. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* 51, pp. 823-834.
- Bellgard, M.I., Moolhuijzen, P.M., Guerrero, F.D., Schibeci, D., Rodriguez-Valle, M., Peterson, D.G., Dowd, S.E., Barrero, R., Hunter, A., Miller, R.J., Lew-Tabor, A.E., 2012. CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Int.J.Parasitol.* 42, pp. 161-169.
- Benkert, M.I., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), pp. 343-50.
- Blanton, R.E., Licate, L.S., Aman, R.A., 1994. Characterization of a native and recombinant *Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor gene product. *Mol.Biochem.Parasitol.* 63, pp. 1-11.
- Bruce, D., Perry, D.J., Borg, J.Y., Carrell, R.W., Wardell, M.R., 1994. Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-->Asp). *J.Clin.Invest* 94, pp. 2265-2274.
- Calvo, E., Mizurini, D.M., Sa-Nunes, A., Ribeiro, J.M., Andersen, J.F., Mans, B.J., Monteiro, R.Q., Kotsyfakis, M., Francischetti, I.M., 2011. Alboserpine, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. *J.Biol.Chem.* 286, pp. 27998-28010.
- da Silva, V.I., Jr., Imamura, S., Nakajima, C., de Cardoso, F.C., Ferreira, C.A., Renard, G., Masuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Vet.Parasitol.* 127, pp. 147-155.

- Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby, M.S., Shaw, C.M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell, R.W., Lomas, D.A., 1999. Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, pp. 376-379.
- De G. E., Han S. J., Lee W. J., Baek M. J., Osaki T., Kawabata S., Lee B. L., Iwanaga S., Lemaitre B., Brey P. T., 2002. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3, 581-592
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC.Bioinformatics*. 5, p. 113.
- Forsyth, S., Horvath, A., Coughlin, P., 2003. A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics* 81, pp. 336-345.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*. 14, pp. 2051-2088.
- Gettins, P.G., 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem.Rev.* 102, pp. 4751-4804.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rousseau, M.E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., Nene, V., 2005. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35, pp. 585-595.
- Hammond, G.L., Smith, C.L., Goping, I.S., Underhill, D.A., Harley, M.J., Reventos, J., Musto, N.A., Gunsalus, G.L., Bardin, C.W., 1987. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, pp. 5153-5157.
- Han, J., Zhang, H., Min, G., Kemler, D., Hashimoto, C., 2000. A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases. *FEBS Lett.* 468, pp. 194-198.
- Hopkins, P.C., Carrell, R.W., Stone, S.R., 1993. Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry* 32, pp. 7650-7657.
- Hopkins, P.C., Stone, S.R., 1995. The contribution of the conserved hinge region residues of alpha1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry* 34, pp. 15872-15879.
- Huntington, J.A., Read, R.J., Carrell, R.W., 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, pp. 923-926.
- Imamura, S., da Silva, V.J., I, Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23, pp. 1301-1311.

- Imamura, S., Konnai, S., Vaz, I.S., Yamada, S., Nakajima, C., Ito, Y., Tajima, T., Yasuda, J., Simuunza, M., Onuma, M., Ohashi, K., 2008. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Jpn.J.Vet.Res.* 56, pp. 85-98.
- Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Tembo, M.E., Yasuda, J., Ohashi, K., Onuma, M., 2006. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine* 24, pp. 2230-2237.
- Irving, J.A., Pike, R.N., Lesk, A.M., Whisstock, J.C., 2000a. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 10, pp. 1845-1864.
- Kanaji, S., Tanaka, Y., Sakata, Y., Takeshita, K., Arima, K., Ohta, S., Hansell, E.J., Caffrey, C., Mottram, J.C., Lowther, J., Donnelly, S., Stack, C., Kadowaki, T., Yamamoto, K., McKerrow, J.H., Dalton, J.P., Coombs, G.H., Izuhara, K., 2007. Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS Lett.* 581, pp. 4260-4264.
- Karim, S., Singh, P., Ribeiro, J.M., 2011. A Deep Insight into the Sialotranscriptome of the Gulf Coast Tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS.One.* 6, p. e28525.
- Kim, S., Woo, J., Seo, E.J., Yu, M., Ryu, S., 2001. A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved alpha(1)-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops. *J.Mol.Biol.* 306, pp. 109-119.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief.Bioinform.* 9, pp. 299-306.
- Law, R.H., 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., 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 7, p. 216.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E., 2002a. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J.Biol.Chem.* 277, pp. 10083-10089.
- Leboulle, G., Rochez, C., Louahed, J., Ruti, B., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E., 2002b. Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 66, pp. 225-233.
- Li, J., Wang, Z., Canagarajah, B., Jiang, H., Kanost, M., Goldsmith, E.J., 1999. The structure of active serpin 1K from *Manduca sexta*. *Structure.* 7, pp. 103-109.
- Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T., Carrell, R.W., 1992. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, pp. 605-607.
- Merckelbach, A., Ruppel, A., 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 156, pp. 84-88.

- Miura, Y., Kawabata, S., Wakamiya, Y., Nakamura, T., Iwanaga, S., 1995. A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *J.Biol.Chem.* 270, pp. 558-565.
- Mulenga, A., Sugino, M., Nakajim, M., Sugimoto, C., Onuma, M., 2001. Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *J.Vet.Med.Sci.* 63, pp. 1063-1069.
- Mulenga, A., Khumthong, R., Blandon, M.A., 2007. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *J.Exp.Biol.* 210, pp. 3188-3198.
- Mulenga, A., Khumthong, R., Chalaire, K.C., 2009. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC.Genomics* 10, p. 217.
- Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M., Sugimoto, C., 2003. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33, pp. 267-276.
- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H., Carrell, R.W., 1983. Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N.Engl.J.Med.* 309, pp. 694-698.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von, H.G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat.Methods* 8, pp. 785-786.
- Prevot, P.P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., Brasseur, R., Vanhaeverbeek, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2006. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J.Biol.Chem.* 281, pp. 26361-26369.
- Prevot, P.P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., Adam, B., Brossard, M., Brasseur, R., Zouaoui, B.K., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2009. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 276, pp. 3235-3246.
- Prevot, P.P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2007. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* 25, pp. 3284-3292.
- Rau, J.C., Beaulieu, L.M., Huntington, J.A., Church, F.C., 2007. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J.Thromb.Haemost.* 5 Suppl 1, pp. 102-115.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J., 2004. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32, p. D160-D164.
- Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S., Pickup, D.J., 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, pp. 597-604.

- Ribeiro, J.M., 1987a. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu.Rev.Entomol.* 32, pp. 463-478.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC.Genomics* 12, p. 136.
- Ribeiro, J.M., Labruna, M.B., Mans, B.J., Maruyama, S.R., Francischetti, I.M., Barizon, G.C., de Miranda Santos, I.K., 2012. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochem.Mol.Biol.*
- Saldivar, L., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Bendele, K.G., Gondro, C., Brayton, K.A., 2008. Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Mol.Biol.* 17, pp. 597-606.
- Sauk, J.J., Nikitakis, N., Siavash, H., 2005. Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target. *Front Biosci.* 10, pp. 107-118.
- Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 27, pp. 157-162.
- Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Bromme, D., Chapman, H.A., Silverman, G.A., 1998. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, pp. 5258-5266.
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., de, C.E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N., 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* 38, p. D161-D166.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J., Whisstock, J.C., 2001a. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J.Biol.Chem.* 276, pp. 33293-33296.
- Stark, K.R., James, A.A., 1998. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J.Biol.Chem.* 273, pp. 20802-20809.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. 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* 21, pp. 2844-2851.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,

- evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol.Biol.Evol.* 28, pp. 2731-2739.
- Wang, M., Guerrero, F.D., Pertea, G., Nene, V.M., 2007. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC.Genomics* 8, p. 368.
- Yan, Y., Liu, S., Song, G., Xu, Y., Dissous, C., 2005. Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Vet.Parasitol.* 131, pp. 53-60.
- Yenbutr, P., Scott, A.L., 1995. Molecular cloning of a serine proteinase inhibitor from *Brugia malayi*. *Infect.Immun.* 63, pp. 1745-1753.
- Yi, D., Xu, L., Yan, R., Li, X., 2010. *Haemonchus contortus*: cloning and characterization of serpin. *Exp.Parasitol.* 125, pp. 363-370.
- Zang, X., Yazdanbakhsh, M., Jiang, H., Kanost, M.R., Maizels, R.M., 1999. A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. *Blood* 94, pp. 1418-1428.
- Wang Y., Jiang H., 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 387-395.

1HP7 : -----EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEF : 33
 RmS-1 : -----MPKHLSRMIVHF : 12
 RmS-2 : -----MAVNQLGDSVLNF : 13
 RmS-3 : -----MVAKFLFLASALAVAH CETDDSTLLARAHNQF : 32
 RmS-4 : ----- : -
 RmS-5 : -----MAPPASAQDIQHEQARANNAL : 21
 RmS-6 : -----MKPLVAVATLLALSCLQLSLCQTEQEHLVAANNQF : 36
 RmS-7 : ----- : -
 RmS-8 : -----MEAAKATNP LGYSILHF : 17
 RmS-9 : -----MKIGRFVFLFWTCVMHMCSAND----ATGSTNL : 29
 RmS-10 : -----MLAKFVFFALLLFAVGDEPDDDKLLARAHNQF : 32
 RmS-11 : -----MAVNQLRDSVLNF : 13
 RmS-12 : -----MDIISRFLRYLFWRAPAPPNRLREILLNF : 29
 RmS-13 : MOVTWLF LFCVVAPLGVGGGLIDSIRERKAPKAWRRSQETISDVVNSNNGL : 50
 RmS-14 : -----MSEKTPNP LGDSSLQF : 17
 RmS-15 : -----MYRLLCLVTTVAVITMATEPEPEPEDRWKLALANNYL : 35
 RmS-16 : -----MOFTVVMV I ILMGAIHAVAPASDALKVTVANNAF : 34
 *

1HP7 : AFSIYR-QLAHQSN--STNIFFS PVS IATAFAMLSLGTKGDTHDEILEGL : 80
 RmS-1 : SIDHRELKTRDQ--RNNIYSPYSVATGLSMALAGARGKTAELL SVI : 60
 RmS-2 : AIGLYG-QLKPNDG-RKKNIFFS PFS TSAALS MALGGARNKTAKELSTVL : 61
 RmS-3 : AVNLLK-ELATENP--SSNVFFSPTS IAAAFGMAYLGARGGSESELNSVF : 79
 RmS-4 : -----MAYTGARGSSAEELGSVL : 18
 RmS-5 : GVALFK-ELCSNSA--DRNVFFS PASLSIALGMLYAGAGGKTLQELSTVL : 68
 RmS-6 : AIHLLK-VLPSLPN---ENVFFS PYSI STALGMVFLGARGDTLEELSQGL : 82
 RmS-7 : -----MSHIL : 5
 RmS-8 : SVDIYK-QLARKSNHSSGNIFYS PFS TSAALSMTLAGARNTAROLADAL : 66
 RmS-9 : ALGIFQ-QLSTDTS---DNVLFSPFGVSVLLA ILSAATKGDTSKEIVSAF : 75
 RmS-10 : AVKLLK-QLALQNP--SSNIVFSPTS IASAFGMAYAGARGSSAEELGWVL : 79
 RmS-11 : AVDIYG-QLKPEGR-DKRNIFFS PFS TSAALS MALGGARNKTAEELCTVL : 61
 RmS-12 : SVELHKQQLAEQDALYRDNVLSA PFAI ALALAATHAGSGKATAAOKAKAL : 79
 RmS-13 : GISMLK-ALG-----DQNVLLSPISVNIVLHMVLI GARGRTAYQMSAQM : 93
 RmS-14 : SIDIYK-QLSSKSS-SCENIFYS PFS IAAALS MALAGARNATAKOTADVL : 65
 RmS-15 : GLNLLK-ALPSNAN---TNVFFS PFSVSAALGMAYI GARGDTLEQLTLNF : 81
 RmS-16 : AFEELP-LMSTNQL---DNVYFSPYSVTTALAMVHAGADALTLRELHEAL : 80
 * * * * *

1HP7 : NFNLTEIPE-AQTHEGFQELLHTLNQPSQLQLTTGNGLFLSEGL--KLV : 127
 RmS-1 : RTKDEN-----VHDKFASFFPKLSN--QKLQFYVANRTYSDLKF--PVV : 100
 RmS-2 : RVPDD-----AQTHRHE SDFFSKLSSYAADV K L H I A N R M Y C E Q T F --PVL : 104
 RmS-3 : GHTDVGLTDRSRLTAYKNLLELSAS--PNVTL DVANMVL AQDRF--PIS : 125
 RmS-4 : GHNAVGLVDRARVLTAYKNLLQLSKS--PNVTL DVANLVLIQKGF--PIL : 64
 RmS-5 : GLADAGLVDRDAVLSAYKSLETKSA---NATLDIANTVLIQKDF--EVL : 113
 RmS-6 : GYKALSLSE-SDVREAFALQNNRIQAHARQAGLDVANSAAVQOGL--DVI : 129
 RmS-7 : KYRNDD-----LRDHEKKFLAYVAGYAPNVTLHLANRMLSDYRY--KVK : 47
 RmS-8 : HVDSEE-----IHIHESRSFSKLPEYAPDV K L H V A N R M F S E K T F --PVL : 108
 RmS-9 : GSDTAIAAVKQDIESA EKEMATGAPSAVRKSPILGNLLAVKKGLKSKLL : 125
 RmS-10 : GHTTVGLIDRARVLTAYKNLLQLAKS--PNVTL DQANLVLIQKDF--CIL : 125
 RmS-11 : RVPDD-----VQTHRHE SDFFSKLKSYAADV K L H I A N R M Y C E Q T F --PVL : 104
 RmS-12 : HLPHEELIEE---VRQETDMTLRLADCGPDFRHLANAFADRSY--DVP : 124
 RmS-13 : GNPSSS-----IMSELLHKMSSPDGNSRKVALDHASAVLIQEGA--SFN : 135
 RmS-14 : HVNSEE-----VHKHEASFMKLS SFAPDV K L H V A N R M Y S E Q T F --PVL : 107
 RmS-15 : GYTAEELNE-QKLLALEKEQLEAARDLPHEYTLDIANA AVAQEGY--GVL : 128
 RmS-16 : KYNLVGLAE-DKVVSAHADFNRHLLG-PSNSTLEVANA AVLDQRL--NAL : 126

```

1HP7 : DKLELDVKKLYHSEAFVNF--GDTEEAQQINDYVEKGTQGKIVDLVKE : 175
RmS-1 : DECAVFLNSTYSSNIVSVDF-QNKSESVRVQINDWIKIATGSKITDILLAP : 149
RmS-2 : ESYLSLLRDSYGATVESVDF-KNKSETIRLOANEWVERETESKIKDILLPG : 153
RmS-3 : DSYKQQLREIFDADLRSANF-VEDGPRVAEAVNAWVREKTRGKISGILPE : 174
RmS-4 : ECYQKQLRDVEDAELRSADF-ANAGSGSAEKVNAWVREKTRGKISGILPE : 113
RmS-5 : EQYKKDVVEYFQAEACSVDF-VRDAHKVVAEINDWVWVREKTRGKISKLLDD : 162
RmS-6 : DTYDALNRTFNHAFVNFVDF-QGNGQQAVDTINWVWVREKTRGKISKLLDD : 178
RmS-7 : KEYTSLRLDYVNTSVRAVNF-KKRYESVVRVETNDWVWVREKTRGKISKLLDD : 96
RmS-8 : DSYLSVLRDCYDSTIQSVDF-RNNFDNVRROVNAWVWVREKTRGKISKLLDD : 157
RmS-9 : PQELNFKLDGGPFSTLVDEL----DENLASRSNKWVSNQTKGQITKILDD : 171
RmS-10 : KSYLKQLRDVEGAELMSADF-ANPSSGSAEAVNAWVREKTRGKISGILPE : 174
RmS-11 : ASYLSLLRDSYGATVESVDF-KGDHEAVRLOANAWVERETGYKIKDILLPG : 153
RmS-12 : NDYCDLMEATYDGAVKQVDF-RSDPKGACGDIINSWVEKTKCKVTDILLQS : 173
RmS-13 : ASYREINRLEDAASLATVQF-GEGRGSDVVEKVEWASRKTQGRIPQFLEE : 185
RmS-14 : DTYLALLRDSYDSTIESVDF-KTHCEKVRQOVNAWVWVREKTRGKISKLLDD : 156
RmS-15 : PNYTEALVSAEAGAEYLEADF-SKKGQEAIDNINKWVREKTRGKIRSLFDM : 177
RmS-16 : SSYLNALKNGFAAELLKADF-SGDERATLNAINSWVWVREKTRGKISKLLDD : 175
* * * * *

```

```

1HP7 : --LDRDITVFAVNYIFFKCKWERPFEVKDTEEDFHVDQVTTVKVPMMKR : 223
RmS-1 : GSVGPTTSVILVNTIVFRGLWESPEFSADKTSRRDFNVNASTKVQVDMMCQ : 199
RmS-2 : GSVNDNTTLLILINAIYFKGLWASQEPDATHPSYFHLDSKSKKHVDMMFQ : 203
RmS-3 : G-QPLDIVLFIILNAVYFKGTWVTKFDADRITINKPFLNLGTTEVSKPAMHL : 223
RmS-4 : R-QSLYIVLFIILNAVYFKGTWVTKFDAADTMNRPFFNMGTSEVSRPMSLL : 162
RmS-5 : A-PPMNTVAFLINAIYFKGTWVTKFKARRTKPLPFYNHGREAKVATMSV : 211
RmS-6 : P-LETNTRVLMNAIFKGFWERQFDPSHITKHVFNNGGIQGTVPVDTMFL : 227
RmS-7 : GSVNAGTTLVILINAIYFKGLWESPEFKLLTRLQHFFLDSSKSITVPMRQ : 146
RmS-8 : GSVDSLTTLLILVNAIYFKGLWKSQFNVNHTRLSNFHLDSNSKTLVDMMYQ : 207
RmS-9 : DHTEDDARMILLNAIYFKGEWKEKFEKQLAFKGTFKNYDGTDTPTTFMFK : 221
RmS-10 : R-QPLYIVLFIILNAVYFKGTWVTKFDAADTMNQPFNMGNSEVSRPAMYL : 223
RmS-11 : GSVNAGTTLILINAIYFKGLWASQEPDATHPSYFHLDSKSKKHVDMMFQ : 203
RmS-12 : GKVDTRTSMILLVNAIYFKGLWESPEFKLLTRLQHFFLDSSKSITVPMRQ : 223
RmS-13 : V-PEETTKMLVILNAMYFKSDWKTQFDPEFTDKRVFRNEDGTTANVIMFV : 234
RmS-14 : GSIDDMTTLILVNAIYFKGLWNSQFDPKSTHRSNELLKNNKKEIDMMYQ : 206
RmS-15 : P-PDISTRTLLILNAVYFKGTWVTKFENKLLKTPRSFYNGGVTKVLIIPMMKM : 226
RmS-16 : P-LPSFTKLVLLINAIYFKGTWVTKFDQSKTSRAPFYTADGRSTSVDTMQG : 224
* * * * *

```

```

1HP7 : LGMFNIQHCKLSSWVLLMKYLCNATA-IFFLPDEGK--IQHLENELTHD : 270
RmS-1 : KEDFAITHSEELAARALEMPYKGGRAVMVLLPDAIDG-LSYLEHHLSHH : 248
RmS-2 : KDRYCTGRSKELEVEALEIPYRGGKTSMVILLPDELGG-LSKLEKRLTAS : 252
RmS-3 : RARFPYARVEPIHASALEIPYEGDRFTMVVLLPDNATG-LPAVRNGLSLA : 272
RmS-4 : TTRLPHTTISGLNASAVEIPYNGGKFGMVIVLPDNFTG-LQALRDGLSAT : 211
RmS-5 : RHREGYASVEELDARALEVPYAGDRFSMVVLLPRSRG-LSVETRLTID : 260
RmS-6 : RHTTRRGFSVELQSKVLELPEYRSDYSMVIVLPEERDG-ADAVKQVLTID : 276
RmS-7 : MGGFNVGHSEELKSRALEMPYVGGKCSMVILLPDEIDG-LSLLEEKLSSES : 195
RmS-8 : RSDFNMAHNMALEATALEIPYHGGRTSMVILLPKIDG-LSLLEALSAAE : 256
RmS-9 : RRHFEYALDATALKTHVLSLPYKDVKARFVLLPLNRAG-AKALAGLLTAS : 270
RmS-10 : ATRLPHTTIDGLNASAVEIPYNGGKFGMVVLLPDLNLTG-LQAVRNGLSAA : 272
RmS-11 : KDRYSTARCQELDVEALEITYQGNKTSMVILRPNDVEG-LSKLEERLTAS : 252
RmS-12 : RKNYKTSCCDKLEVDALMPFVGGKLSMVLLRPQKIDG-LDRLEKLLTPA : 272
RmS-13 : IETFFDFSHDDELNVDALEVPYADNQYSMILMLPRSRQSPSSVQGLTAA : 284
RmS-14 : KNDYKMGSRSEELGVTALEIPYRGGKTSMLIILPNDVEG-LSQVEDRLTSQ : 255
RmS-15 : KSTLNHTFDAMNADVVDLPYVCKDIAMTILIPSERNG-TEHLKSALTTTH : 275
RmS-16 : VVKAGYAYVRNLAATMLELPLNGLDYSMILLVPLQNGSS-VEVLRQLNGT : 273
* *

```

```

1HP7      : IITKFLENEDR-RSASHLPKLSITGTGYDLKSVLGQLGITKVFS-NGADL : 318
RmS-1    : KLSAILLADLKETPNVELSMPKLLLRQSFSLKNTLMTMGVNDLFT-EKCDL : 297
RmS-2    : KIGNLLENLRGFFDVELYLPKFEELEQTINLKEVLKQMGINDFFS-FDADL : 301
RmS-3    : ALEDVGSRLSF-RDVILQLPKFDMSLSYGLVPAMKATKLNSVFG-GSADF : 320
RmS-4    : VLEVDLDGSMYS-KDVVRRLPKFEMNQRYDVVRAMEALGLHVVFG-RSADF : 259
RmS-5    : LVEKITNSITD-TDVQLWLPKFKIQTDYDLVTPLRKLGLESAFG-KGADL : 308
RmS-6    : KINIAVGSITS-GPVATSSLPKFKIDKLNPLKSNLTFLGLLRKMFG-SEADL : 324
RmS-7    : TRTLLASLKA-EEVHLAFPKISILKAGQSMKDALLRAMGVKHLFN-EGADL : 243
RmS-8    : KLTQILMDLQNCTEVKLYLPKFKFEQAIFLKQTLAAMGIEELFLSLASADL : 306
RmS-9    : EWKRLLGTLRN-TSVALSMPKFETSKKYNLMKSLEYLGIKKIFT-DKADL : 318
RmS-10   : VTEALSDSMYS-KNVVRRLPKFEMSQRYDVVPAMEALGLHVVFE-RSADF : 320
RmS-11   : KLASLLDNLCGFADVELYLPKFKLEQVISLKEVLREMGIKDFFS-SDADL : 301
RmS-12   : LLENLLKSLGEDHDVETYLPKFKLEHSTSLRGTLEALGIQDIFT-DRADL : 321
RmS-13   : KNEIIGEMEP-EQVELSLPKMSVQKMLLRAPLEKLGLRVPFFT-DAADF : 332
RmS-14   : KLSVFIENRIISDVKLYLPKFKLEQTLDLKGTLTVMGIEDFFFT-PKADL : 304
RmS-15   : NINKAVARMYP-KDMKVRLPKFKLDNKYTLKPTLEALGITKIFS-ADADL : 323
RmS-16   : ALAAARHRRE-SKLHLPRFLEQKYDLKEVLPKLGIKRIFNAGEADL : 322
                                     **          *          *          *          *          *

1HP7      : SGVTEEAPIKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGA-----MFLEAIPMSIPE : 363
RmS-1    : SGMFKAGKPSVSDIIEHEAYLQVDEEGTEAAAAAAVAGAGSAAPAAT--QT : 345
RmS-2    : SATSKKDKLAASEVVHKAFVEVNEEGTEAAAAAATA-VMMAACCLSSAPPQT : 350
RmS-3    : SGISEAVPLVISDVLHKAAVEVNEEGTIATAVTG-LGFVPLSAHYNPPPP : 369
RmS-4    : GRIVDGERVHISDAVHEAAIEVNEEGTIAAAVTG-LFVMPSSSLYEPPPP : 308
RmS-5    : SGISARNLEVSDVKEKALIEVSEOGTVAAAVTAIRVSVKSGKSAGPLPP : 358
RmS-6    : SGITGDRRYVSDVLQRAVVEVNEEGTEAAAVTGVIGVNRIGI-----EP : 369
RmS-7    : SGIFEDVPTFLSDVVHEAWLKVDEEGTEAAAAAVDIGVGAATPPREVLRT : 293
RmS-8    : TGISADGNWATEVVHKAFVEVNEEGTEAAAAAAVVMGFCSANMVIEK- : 355
RmS-9    : SGMIGTGDMFVSAIEQVSKLRLDEEGSEADSATLLRISGKAAEEGE---- : 364
RmS-10   : GRIVDGERVHISDAVHEAAIEVNEEGTVAAAVTG-LFVRPTAPLPEPPPP : 369
RmS-11   : SGISEKKKLAASEVVHKAFVEVNEEGTEAAAAAATA-VMVACCMSSLPPRT : 350
RmS-12   : GGSKTPGIRVTGVEHKAVVEDEDGVEGLFLPLIMMCYAGVSFN---- : 367
RmS-13   : KGISKAEDLRNEILHKAALDVDEVGTRAVAATQAQFVSKSLVHFK---- : 378
RmS-14   : TGINATGKLMASEVHKAFVEVNEEGTEAAAAAATGVTMMTYCARMN---- : 350
RmS-15   : SGISGAKNLYSDVLHKAVLEVNEEGSEAAAVTGFVIQLRTAAFVTPPPL : 373
RmS-16   : SGINGEKSLFVDRAVHKAVVEVNEEGSEAAAVTGVTINTRTTTGPS---- : 368
                                     *          *          *          *          *

1HP7      : VKE---NKPFVELMIDQNTKSPLFMGKVVNPTQK : 394
RmS-1    : TEELVDHPPFMLELLRGKSDMVLFMSSVRNP--- : 375
RmS-2    : YKEIVDRPFMEVIRSRDPDIVLFMGSVRDL--- : 380
RmS-3    : IEETVDHPFLFYIRDRSTNRVLFIGEVNTL--- : 399
RmS-4    : IEETVDHPFLYYIRDKDNNRILFIGEVHSL--- : 338
RmS-5    : ISERVEHPFAFFIWDKVSKQALFMGAIRSLA-- : 389
RmS-6    : FLETADHPFLFFIRDRKTNEIFEAGQVNNVL--- : 399
RmS-7    : -HEVVDHPPFMLLVRSVNPDVVLFLGSVRKF--- : 322
RmS-8    : -KEVVDHPPFMLIRSRDPDIILFMGSVRRL--- : 384
RmS-9    : -SVVADHPPFFAVTAGRRGDILFMGVNKLPAT : 396
RmS-10   : ILETVDHPFLYYIMEKDNNRILFIGEVHSL--- : 399
RmS-11   : YKEIVDWPFMEVIRSRDPDIVLFMGSVRDL--- : 380
RmS-12   : -YNVNRPFPFMLIRSCDPDVILYIGSVRRF--- : 395
RmS-13   : -QETVDRPFLALRHEPTGAILFLTAQLSMQS- : 409
RmS-14   : TREVVDHPFLELIRSHDPDVLFMGSVRQL--- : 380
RmS-15   : PKVYVDHPFLELIRNVHTNTIMFLGEVNAL--- : 403
RmS-16   : -EIHVDRPFLEYITNKRIGNLIFVGQVNKID-- : 398
                                     **          **          *          *

```

Figure S1: The RmS amino acids sequences and α 1-antitrypsin (1HP7) were aligned using Muscle algorithm (Edgar et al., 2004) and visualized using GeneDoc program. The residues that correspond to the 51 core aminoacids (Irving et al., 2000) are indicated by an asterisk (*). The consensus sequence N-[T/A]-[V/I/M]-[Y/L/H]-F-[K/R/T]-G is marked by red box. The high conserved residues are labeled in black and low in gray. The putatives signal peptide sequences of RmS are underlined.

Table S1- The RmS gene specific primers used in RT-PCR analysis.

Serpin ID	Primer forward	Primer reverse
Rms-1	ATGCCAAAACACCTTAGTCGCATG	TCAAGGATTTGCGACGGAGCTC
Rms-2	ATGGCCGTCAACCAGCTCGG	TTACAAGTCGCGTACGGATCCCA
Rms-3	ATGCTCGCCAAATTTCTTTTCTCG	TAGTGTGTTAACCTCTCCGATGAAAAGAACAC
Rms-4	GCGTTTGGTATGGCCTACACTGG	TCAAAGACTGTGAACTTCACCGATGAA
Rms-5	CGCAGTAATCATGGCTCCGC	TCATGCGAGACTCCTAATAGCTCCC
Rms-6	ATGAAGCCACTTGTAGCTGTCGCC	TCAAAGGACGTTCACTTGTCCGG
Rms-7	GACGAAGCACGAAATGTCCACAT	TCAAAACTTTCGCACTGAGCCCA
Rms-8	ATGGAAGCCGCAAAGCTACAAAC	CTACAGTCGACGAACAGATCCCATGA
Rms-9	ATGAAGATAGGAAGGTTTCGTGTTTCTTTTC	TCACGTCGCGGGTAGTTTGTTG
Rms-10	ATGCTTGCTAAGTTTGTCTTTTTGCAC	TTAAAGACTGTGGACTTCGCCGAC
Rms-11	ATGGCTGTAAACCAGCTCCGGG	TTACAAGTCGCGGACGGAGCC
Rms-12	ATGGACATAATTTCCAGATTCCTGCG	CTAGAAACGTCGCACAGATCCGATG
Rms-13	ATGCAAGTGACGTGGCTTTTTCTG	TCACGACTGCATAGACAAGACTTGAGC
Rms-14	ATGTCCGAGAAAACAACCTAACCC	TTAGAGCTGGCGGACGGACC
Rms-15	ATGTATCGCCTGCTGTGTCTGGTC	TTAGAGAGCGTTGACCTCGCCC
Rms-16	ATGCAGTTCACGGTGGTGATGG	TCAATCGATTTTGTTCACTTGTCCG
Tick actin	ATGTGTGACGACGAGGTTGCCG	TTAGAAGCACTTGCGGTGGACAATG

3.2 Capítulo II

Clonagem, expressão e caracterização parcial da RmS-3

Neste capítulo descrevemos a clonagem, expressão heteróloga e caracterização parcial da RmS-3, uma serpina identificada em banco de dados de EST de *R. microplus*. A RmS-3 foi a serpina escolhida para prosseguir os estudos de caracterização biológica porque ela é expressa predominantemente em glândula salivar e possivelmente ser secretada. A secreção dessa proteína foi confirmada através do estudo proteômico preliminar da saliva do carrapato bovino realizado pelo nosso grupo de pesquisa, que revelou a presença de peptídeos compatíveis com essa serpina. A presença desta proteína na saliva sugere uma possível interação com o hospedeiro, podendo estar envolvida em processos de modulação de sistemas fisiológicos durante o parasitismo.

3.2.1 Materiais e métodos

Nesta seção são descritos os materiais e métodos utilizados no segundo capítulo desta dissertação.

3.2.1.1 Análises de bioinformática

A sequência codificadora da serpina RmS-3 (nomeada arbitrariamente conforme o Capítulo I desta dissertação) foi obtida do banco de dados Bmi Gene Index (BmGI) (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) e depositada sob a identificação de TC16894. A busca de sequências similares no banco de dados de proteínas do GenBank foi feita utilizando a ferramenta BLASTP. Os alinhamentos das sequências foram criados utilizando o algoritmo ClustalW no programa BioEdit e visualizados no programa GeneDoc (<http://nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>). A presença da sequência de peptídeo sinal foi verificada utilizando SignalP 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Os sítios de N-glicosilação foram preditos com o uso do NetNGly1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

3.2.1.2 Carrapatos

Bovinos (*Bos taurus*) da raça Hereford, adquiridos de uma área livre de carrapatos, foram mantidos individualmente em estábulos na Faculdade de Veterinária da UFRGS, e infestados experimentalmente com larvas infestantes de *R. microplus* (cepa Porto Alegre). Após 21 dias, as fêmeas parcialmente ingurgitadas (partenóginas) e fêmeas totalmente ingurgitadas (teleóginas) foram coletadas e mantidas em estufa a 28°C com umidade relativa de 85%.

3.2.1.3 Dissecação

Após a coleta, os carrapatos foram submersos em álcool etílico 70% por 1 min, e secos. Os carrapatos foram submersos em solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS) gelada, preparada com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Sob um microscópio de luz visível, a cutícula dorsal foi excisada e os tecidos (SG, MG, OV e CA) coletados com o uso de pinças. Após a dissecação, os tecidos destinados à extração de RNA foram transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de TRIzol® (Invitrogen), e os tecidos destinados à extração de proteínas foram acondicionados em tubos contendo PBS. Toda a dissecação foi realizada em condições para evitar a presença de RNase.

3.2.1.4 Extração de proteínas

Os tecidos coletados foram macerados em PBS usando pistilo em banho de gelo. O material foi centrifugado 10.000 X g por 5 min para remoção do material particulado, e a fração solúvel foi coletada. A concentração de proteínas foi mensurada pela metodologia do ácido bicinonínico (BCA) utilizando o *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific Pierce), conforme recomendações do fabricante.

3.2.1.5 Coleta de saliva

Teleóginas foram coletadas após a queda dos bovinos. Os parasitos foram fixados em placas de vidro com fita adesiva e induzidos a salivar com a injeção de 5 µL de pilocarpina (2%) na parte superior do corpo. As gotículas de saliva foram coletadas através de um sistema de capilares acoplados a um tubo plástico e a uma bomba de vácuo em um período de 2 h após a indução. Após a coleta o material foi armazenado a -20°C até o uso.

3.2.1.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado espectrofotometricamente utilizando o aparelho Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech) e a qualidade do material foi verificada pela relação da leitura 260nm/280nm, de acordo com Sambrook & Russel (2001). Cinco µg do RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA com o uso da enzima *SuperScriptIII* e primers *Oligo dT* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.1.7 Amplificação da sequência-alvo e clonagem

A amplificação da sequência codificante foi realizada por meio da reação de PCR utilizando o cDNA sintetizado a partir da glândula salivar como molde. Os *primers* projetados *RmS-3 forward* 5'-ATGCTCGCCAAATTTCTCTTTCTC-3' e *RmS-3 reverse* 5'-AAGCTTTAGTGTGTTAACCTCTCCGA-3' e a enzima *Elongase*® (Invitrogen) foram utilizados na reação. As etapas da PCR compreenderam desnaturação inicial por 5 min a 94°C seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 57°C e 1 min e 30 s a 68°C, com alongamento a 68°C por 5 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8% contendo 1µg/mL de brometo de etídeo e purificados utilizando o *kit* GENE CLEAN® II (Qbiogene), seguindo as recomendações do fabricante. O material purificado foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T (Promega), e o plasmídeo resultante foi utilizado para transformação por choque-térmico das células competentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Após o choque-térmico, as células foram incubadas em 1 mL de meio LB (Luria Bertani) a 37°C por 1 h, e semeadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹). A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001). A confirmação da clonagem foi realizada por PCR e hidrólise com a enzima de restrição *EcoRI*. Os clones positivos foram sequenciados para confirmação da identidade utilizando o serviço de sequenciamento do Laboratório de Identificação Genética (LIG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

foram separadas por centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4°C e estocadas a - 20°C até o uso. O material insolúvel foi lavado três vezes com PBS e os corpúsculos de inclusão solubilizados em gelo com tampão de solubilização (Tris-HCl 20 mM, 8M uréia, pH 7,4). A fração solúvel foi coletada por centrifugação e dializada contra o tampão de ligação (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl e 50 mM imidazol, pH 7,4) *overnight* a 4°C com homogeneização lenta. A solução dializada foi carregada em uma coluna HisTrap™ HP (GE Healthcare) de 1 mL, pré-equilibrada com o tampão de ligação, seguido de lavagem com 10 volumes do mesmo tampão. A eluição foi realizada utilizando *step-wise* com tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl) com diferentes concentrações de imidazol (100, 200, 300, 400 e 500 mM) em fluxo de 1 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e dializadas contra Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e analisadas por SDS-PAGE 12 %.

3.2.1.9 Produção de anticorpos policlonais

A obtenção de soro policlonal foi realizada através da imunização de um coelho, utilizando a proteína recombinante como imunógeno. Aproximadamente 150µg da proteína parcialmente purificada foram separadas por SDS-PAGE 12% e coradas com Coomassie Brilliant Blue. A fração do gel contendo a proteína foi excisada, triturada e misturada a 1 mL do adjuvante Montanide (seppic) 888/Marcol 52 (Exxon Mobil Corporation). Foram realizadas quatro inoculações através de injeção subcutânea com intervalos de 15 dias entre cada inoculação. O soro pré-imune foi coletado antes da primeira inoculação. A reatividade do soro foi monitorada através da sondagem da proteína recombinante purificada utilizando a técnica de *Western blot*.

3.2.1.10 Western blot

Essa técnica foi utilizada para o monitoramento da expressão; acompanhamento da solubilização e purificação da proteína recombinante; análise da reatividade dos soros policlonais dos animais imunizados contra a proteína recombinante; análise da reatividade do soro contra saliva e extratos proteicos de diferentes tecidos do carrapato. Os extratos

proteicos, saliva e a proteína recombinante foram submetidos à SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioAgency) utilizando sistema de transferência 70 V por 1 h com tampão (NaHCO₃ 13 mM, metanol 20%). As membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite desnatado em solução de PBS. As lavagens das membranas foram feitas com PBS (três lavagens de 5 min cada). Para identificação da proteína recombinante, anticorpos anti-poli-histidina conjugados com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich) foram utilizados na diluição de 1:1000 e incubados *overnight* a 4°C. O monitoramento da produção do soro policlonal anti-rRmS-3 de coelho foi realizado incubando o soro *overnight* a 4°C em diferentes diluições (1:200 e 1:2000). No caso dos testes de soro, após incubação com o anticorpo primário, o material foi lavado três vezes por 5 min com leite desnatado 5% e o material foi incubado por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Aldrich). As membranas foram então lavadas três vezes com PBS e por 10 minutos com o tampão de revelação para fosfatase alcalina. O Western-blot foi revelado usando os substratos para fosfatase alcalina NBT/BCIP (Fermentas).

3.2.2 Resultados & Discussão

3.2.2.1 Dados da sequência

A sequência codificadora de RmS-3 possui 1200 pb codificando uma proteína de 399 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 43 kDa. Dois motivos consensuais (NAVYFG e EVNEEG) descritos em serpinas (Miura *et al.*, 1995) foram identificados em RmS-3. A presença de peptídeo sinal na posição 1-17, somado aos dados obtidos do estudo proteômico de saliva de *R. microplus* reforçam a secreção desta serpina na saliva do parasito. Assim como outras serpinas de carrapatos, RmS-3 possui três prováveis sítios para N-glicosilação (Figura 1). Quando comparada com outras proteínas no banco de dados do GenBank, serpinas de outros carrapatos foram as que mostraram maior identidade com RmS-3 (Tabela 1). O alinhamento dessas proteínas mostra alto grau de conservação entre as serpinas das diferentes espécies de carrapatos analisadas (Figura 2).

atgctcgccaaatcttctctttctcgcgctcggtctctcgccgtagcccactgcgagaccgac
M L A K F L F L A S A L A V A H C E T D
 gactccacgcttctcgccagagcccacaaccagctcgccgtcaatctgctcaaggaactc
 D S T L L A R A H N Q L A V N L L K E L
 gcgaccgagaatccctcgtaaatgtcttcttctcgccgactagcattgcagccgcttc
 A T E **(N)** P S S N V F F S P T S I A A A F
 ggcattggcctacctcggcgcgagaggaggatccgagctctgagctgaattcgggtgttcggc
 G M A Y L G A R G G S E S E L N S V F G
 cacgccgatgtgggctcacagaccgaagcaggttgctcacggcgtacaaaaacctctg
 H A D V G L T D R S R L L T A Y K N L L
 gaactatctgcttcgccaatgtcactcttgacgtggccaacatggttctggcgcaggat
 E L S A S P **(N)** V T L D V A N M V L A Q D
 cgcttccccatataccgacagctacaagcaacagcttcgccaatctttgacgcggacttg
 R F P I S D S Y K Q Q L R E I F D A D L
 aggtcggcaaaccttcgctcgaggatggccccagggtggcggccgaagtcaacgcattgggta
 R S A N F V E D G P R V A A E V N A W V
 cgtgaaaagacaaggggcaagatctccggtatcctaccggaggccagccgctggacatc
 R E K T R G K I S G I L P E G Q P L D I
 gtgctcttcatcctgaacgctgtatacttcaagggcacctgggtaaccaagttcgacgcc
 V L F I L **N A V Y F K G** T W V T K F D A
 cacaggaccataaacaagcccttcccaacctgggaaccacggaggtgagcaagccggcg
 H R T I N K P F L N L G T T E V S K P A
 atgcacttgaaggcgcttcccttacgcgagagtggaaacctgcacgcgctggccctg
 M H L K A R F P Y A R V E P L H A S A L
 gagataccgtacgagggagaccgggtccaccatggtggctcctgcttccggacaacgccact
 E I P Y E G D R F T M V V L L P D **(N)** A T
 ggactcgcagcgggtcaggaacggcctgtcgctagccgccctcgaagacgtgggcagcagg
 G L A A V R N G L S L A A L E D V G S R
 ctgagcttcagggacgtcatcctgcagcttcccaagttcgatatgagcctgagctacggc
 L S F C T **D V I L Q L P K** F D M S L S Y G
 ttagtgcctgcgatgaaggccataggggtgaactcgggtggttgaggatcgccgacttc
 L V P A M K A I G L N S V F G G S A D F
 agcggatcagcagggcggctgcccgtgctcatatccgacgtgctccacaaggctgcccgtc
 S G I S E A V P L V I S D V L H K A A V
 gaggtaaacgaggaaggaaccatcgcgaccgctgtcactgggcttggttctgctgcccgtg
E V N E E G T I A T A V T G L G F V P L
tcggcccaactacaaccgcccaccattgagttcaccgtggatcaccggttcattttc
S A H Y N P P P P I E F T V D H P F I F
 tacatcagagacaggagtactaaccgtgttcttttcatcgagaggttaacacactataa
 Y I R D R S T N R V L F I G E V N T L *

Figura 1. Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos de RmS-3. A sequência de nucleotídeos codifica para uma proteína de 399 aminoácidos. A sequência do peptídeo sinal esta sublinhado com linha simples e o RCL está sublinhado com linha dupla. As duas sequências consensos identificadas em serpinas estão marcadas em amarelo. Os sítios de N-glicosilação (N-X-T/S) estão representados em negrito e marcados por círculos. O peptídeo identificado no estudo de proteômica da saliva do carrapato está marcado em verde (dados não publicados).

Tabela 1. Identidade de RmS-3 com outras serpinas depositados no GeneBank.

Número de acesso	Descrição	Identidade (%)
AAP75707.1	serpin (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	95
AAK61377.1	serpin-3 (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>)	94
ABS87356.1	lospin 4 (<i>Amblyomma americanum</i>)	72
ABS87364.1	lospin 12 (<i>Amblyomma americanum</i>)	71
BAD11156.1	serpin-2 (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	70

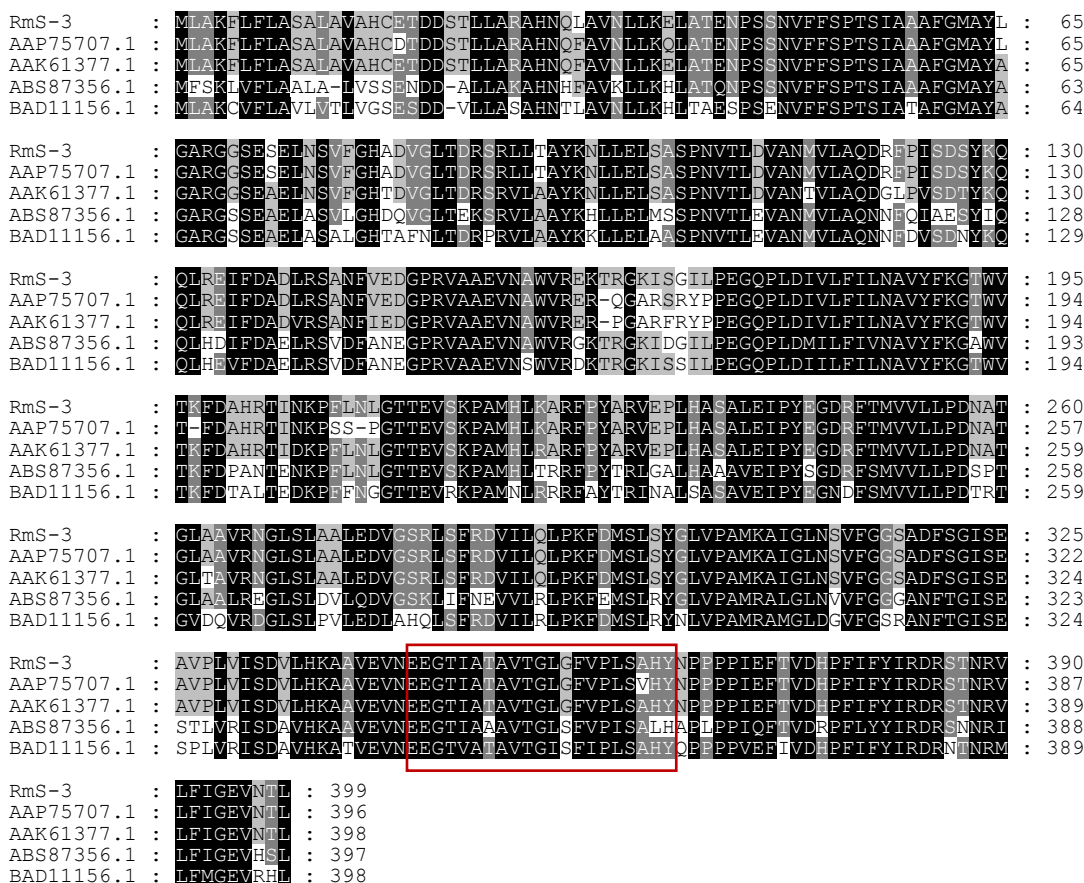


Figura 2. Alinhamento da proteína RmS-3 com outras serpinas de carrapatos. As marcações em preto e cinza correspondem aos resíduos conservados entre essas serpinas. Na caixa vermelha está marcada a região do RCL de cada serpin.

3.2.2.2 Clonagem de RmS-3

Os amplicons gerados na PCR foram inseridos no vetor pGEM-T. O produto de PCR e da clivagem com *EcoRI* são compatíveis com o tamanho de RmS-3 (Figura 4A). Nota-se a presença de duas bandas produzidas pela clivagem, pois a sequência codificante de RmS-3 possui um sítio interno de clivagem para esta enzima (Figura 4A). A subclonagem em pET-43a foi confirmada por PCR, clivagem dos plasmídeos resultantes com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (Figura 4B) que geraram produtos compatíveis com a sequência nucleotídica de RmS-3. O resultado do sequenciamento também confirmou que a construção obtida corresponde à sequência codificante da RmS-3 (Figura 1).

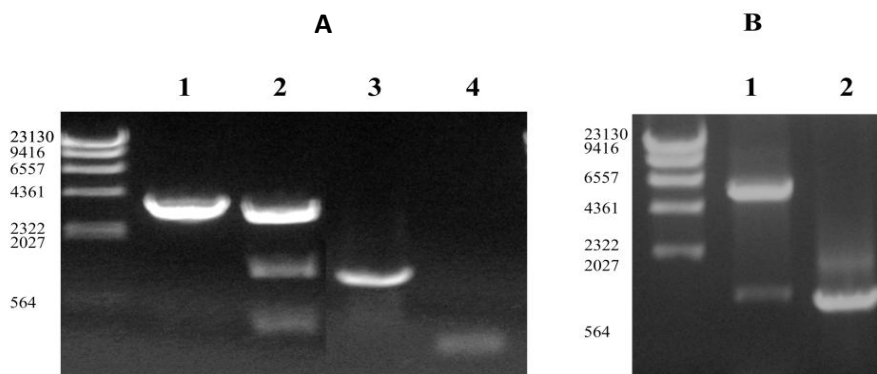


Figura 4. Confirmação da clonagem de RmS-3. (A) PCR e clivagem com *EcoRI* da clonagem em pGEM-T: clivagem de pGEM-T(1) e pGEM-T/RmS-3 (2);e PCR de (03) pGEM-T e (04) pGEM-T/RmS-3. Em (B) a confirmação da clonagem em pET-43a por clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (1) e PCR do plasmídeo pET-43a/RmS-3 (2).

3.2.2.3 Expressão e purificação parcial de RmS-3

Após cultivo de *E. coli* AD494 (DE3) RIL transformada com o vetor de expressão pET-43a contendo a sequência codificante da RmS-3 por 2 h com a indução da expressão com 1 mM de IPTG, foi obtida uma proteína com massa de 45 kDa, o que é condizente com a massa molecular predita para RmS-3 recombinante contendo uma cauda de poli-histidina (Figura 5). Dentre as diferentes concentrações de uréia testadas para solubilização da proteína recombinante (dados não mostrados) a mais eficiente foi o tratamento com tampão Tris-HCl 20 mM, uréia 8 M, pH 7,4. RmS-3 recombinante foi retida em coluna de

níquel imobilizado e eluída com tampão 300 mM de imidazol (Figura 6). A proteína recombinante parcialmente foi excisada do gel e utilizada na imunização de coelhos para produção de soro policlonal anti-rRmS-3. O soro produzido (nas diluições de 1:200 e 1:2000) reconhece a RmS-3 recombinante (Figura 7).

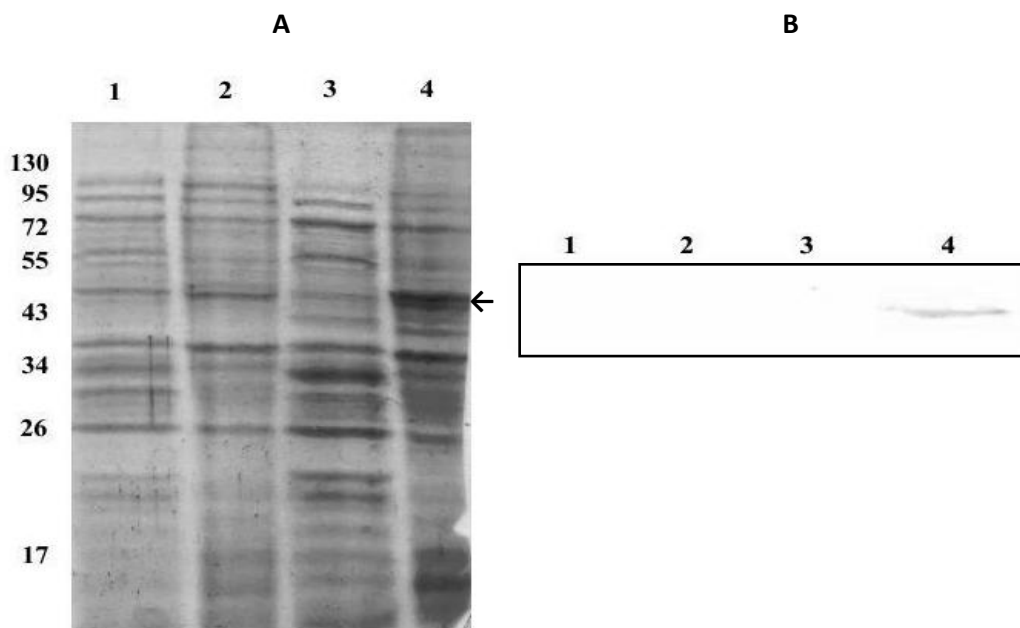


Figura 5. Expressão da proteína rRmS-3 em *E. coli*. A expressão da proteína recombinante foi induzida por 2 h com a adição de IPTG (1 mM). (A) As amostras foram separadas em fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). Essas frações foram submetidas à SDS-PAGE 12% para análise da expressão da proteína recombinante: (1) fração solúvel não-induzida, (2) fração insolúvel não-induzida, (3) fração solúvel após 2 h de indução e (4) fração insolúvel após 2 h de indução. (B) As proteínas foram reveladas por coloração com azul brilhante de Coomassie (A) e sondadas com anticorpo anti-poli-histidina. A massa molecular da proteína com a cauda de histidina está marcada com a seta (~45 kDa).

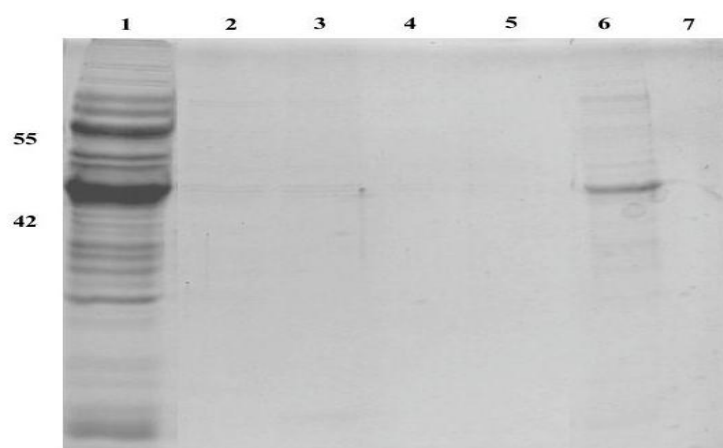


Figura 6. Análise da purificação e solubilização da rRmS-3 por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Os corpúsculos de inclusão foram coletados por centrifugação e lavados três vezes com PBS e solubilizados com tampão de solubilização (Tris-HCl 20 mM, uréia 8 M, pH 7,4). A fração solubilizada foi dializada, e aplicada em coluna de afinidade (HisTrap) que foi eluída com o mesmo tampão contendo diferentes concentrações de imidazol. (1) fração solubilizada, (2) material não ligado na coluna, (3) material eluído com tampão isento de imidazol, (4) eluição com 100 mM de imidazol, (5) eluição com 200 mM de imidazol, (6) eluição com 300 mM de imidazol e (7) eluição com 500 mM de imidazol.

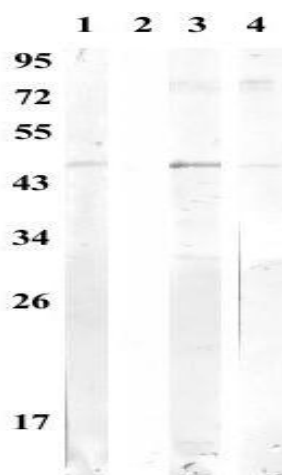


Figura 7. Imunogenicidade da rRmS-3. *Western blot* sondando rRmS-3 com anti-soro produzido por coelhos imunizados com a proteína recombinante purificada. (1) rRmS-3 sondada com anticorpo anti-poli-histidina 1:1000 (2) rRmS-3 sondada com o soro pré-imune de coelho 1:200 (3) rRmS-3 sondada com soro imune 1:200 e (04) rRmS-3 sondada com soro imune na diluição 1:2000.

3.2.2.4 Identificação da proteína nativa

Para investigar a distribuição tecidual e a secreção de RmS-3 na saliva, o soro anti-rRmS-3 produzido foi utilizado para testar a presença desta na saliva e em extratos proteicos de diversos tecidos de *R. microplus*. Em todos tecidos testados, o soro anti-rRmS-3 reconheceu uma proteína de aproximadamente 60 kDa (Figura 8). O fato do tamanho da proteína nativa ser maior que o predito (43 kDa) pode ser consequência de modificações pós-traducionais como glicosilação, tendo em vista que RmS-3 possui três prováveis sítios para N-glicosilação. O reconhecimento do soro anti-rRmS-3 da proteína nativa na saliva corrobora com os dados proteômicos da saliva teleóginas de *R. microplus* que mostram a presença de peptídeos com a mesma sequência que segmentos da cadeia de RmS-3.

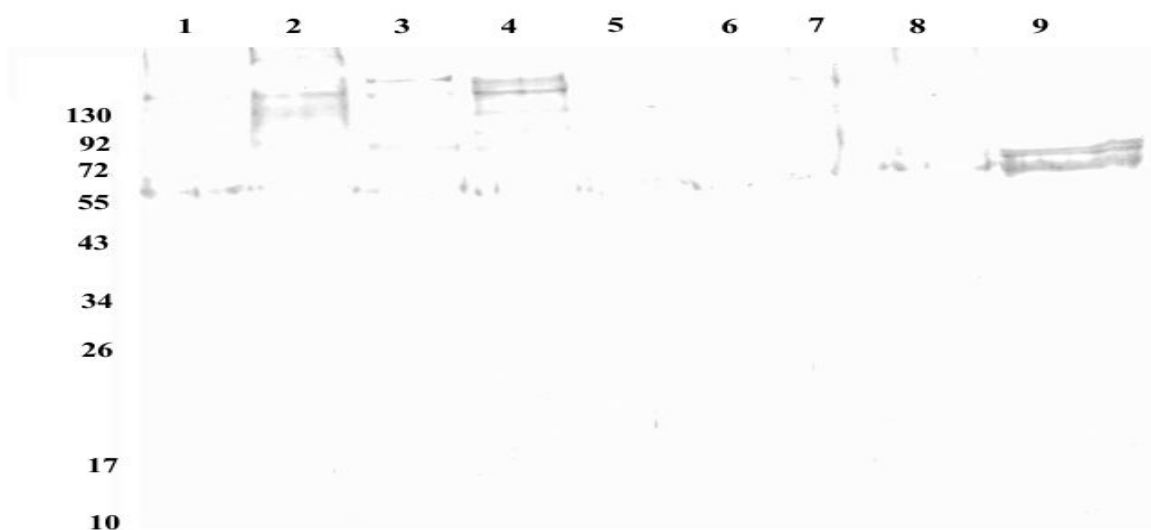


Figura 8. Análise da RmS-3 nativa em diferentes tecidos. Extratos proteicos de diferentes tecidos do carrapato (1) PCA, (2) FCA, (3) POV, (4) FOV, (5) PMG, (6)FMG, (7) PSG, (8) FSG e (9) saliva, foram sondados com o soro policlonal anti-rRmS-3 na diluição de 1:100. Nota-se predominantemente a identificação de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 60 kDa em saliva, e em menor proporção nos demais tecidos.

4. DISCUSSÃO GERAL

Levando em conta que as linhas de defesa primárias do hospedeiro frente à hematofagia (sistema hemostático e sistema imunológico) são vias mediadas por serino endopeptidases e reguladas por serpinas (Huntington, 2006; Gettins, 2002), se supõe que carrapatos codificam esses inibidores para contrapor essas defesas do hospedeiro (Mulenga *et al.*, 2001). O número de sequências conhecidas que codificam serpinas em diferentes espécies de carrapatos é crescente (Mulenga *et al.*, 2001; Mulenga *et al.*, 2003; Sugino *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2005; Prevot *et al.*, 2006; Mulenga *et al.*, 2007; Mulenga *et al.*, 2009). Embora dados de estudos de transcritômica de *R. microplus* revelem a presença sequências condizentes com serpinas, os dados de caracterização dessas proteínas pertencentes à essa superfamília são escassos, o que motivou a realização desse trabalho.

Atualmente, dados de estudos transcritômicos de *R. microplus* estão disponíveis no banco de dados BmiGI (Guerrero *et al.*, 2005; Saldivar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Grupos de pesquisa do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM) também realizaram estudos transcriptômicos de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato bovino (dados não publicados). Teoricamente, a soma dos dados desses bancos cobrem boa parte do genoma do *R. microplus*.

As ferramentas de busca usadas foram eficientes na identificação de serpinas nesses bancos de dados, permitindo a identificação de 26 sequências que teoricamente codificam serpinas, sendo que 16 delas são sequências completas. Para ter uma ideia acerca do perfil transcricional dessas sequências, os dados obtidos por RT-PCR mostram que em todos os tecidos e nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita há transcrição das diferentes RmS. Esse perfil de transcrição nos diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento sugere que essas proteínas possuem importância na fisiologia do carrapato, podendo relacionarem-se diretamente com a modulação das respostas de defesa do hospedeiro (atuando diretamente frente às endopeptidases que regulam o sistema hemostático e o sistema imune) assim como na manutenção de outras vias fisiológicas do carrapato. Serpinas tem sido identificadas em diversas espécies de artrópodes e estão relacionadas com a regulação de respostas imunes sistêmicas contra fungos e bactérias reguladas pela ativação da via da profenoloxidase e melanização

(Wang & Jiang, 2004; De *et al.*, 2002), coagulação da hemolinfa (Miura *et al.*, 1995) e morfogênese (Reichhart *et al.*, 2011). É bem provável que essas proteínas desempenhem funções similares no carrapato. Contudo estudos mais aprofundados necessitam ser realizados para comprovar tais funções. Somente para RmS-1 e RmS-5 os transcritos correspondentes não foram identificados em nenhum dos tecidos e estágios de desenvolvimento analisados. Entretanto, é possível que estas duas serpinas sejam transcritas em algum momento, pois o banco de dados BmiGI, de onde essas duas sequências foram identificadas, é composto por transcritos obtidos de várias populações de carrapatos e exemplares expostos a algumas condições (tratamento com acaricidas, diferentes condições de umidade e calor, dentre outras) e nem todas essas condições podem estar presentes nos exemplares de carrapatos utilizados neste trabalho.

A predição de regiões consideradas como RCL e das ligações susceptíveis de hidrólise nas serpinas foi baseada no consenso de que há 17 resíduos de aminoácidos entre o início da região da dobradiça da RCL e a ligação susceptível. De acordo com o consenso da região da dobradiça, à exceção de RmS-12 (que possui G-L-F-L, portanto fora do consenso) todas as demais RmS encontradas provavelmente são inibitórias, o que atesta a provável atividade de regulação de peptidases desses inibidores. Serpinas não inibitórias estão envolvidas em diferentes processos em mamíferos, como por exemplo, transporte de hormônios e atuação como chaperonas (Potempa *et al.*, 1994; Sauk *et al.*, 2005). Vale salientar ainda que as análises realizadas têm como base RCL compostos por 21 resíduos de aminoácidos, porém há serpinas que apresentam o RCL com tamanhos diferentes (Gettins, 2002; Li *et al.*, 1999).

Na região do RCL, o resíduo P₁ é o responsável pela especificidade primária das serpinas. Diversos estudos de mutagênese mostram que alterações nesse resíduo alteram a atividade inibitória das serpinas (Owen *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1999). Em mamíferos, as serpinas α_1 -antitripsina, α_1 -antiplasmina, antitrombina, inibidor da proteína C ativada e inibidor de C1 (Gettins, 2002) regulam a coagulação sanguínea, inflamação e ativação do sistema complemento. Essas serpinas possuem um resíduo básico (K ou R) na posição P₁ do RCL, concordando com a especificidade das endopeptidases envolvidas nestes processos (todos os substratos destas enzimas possuem resíduo de aminoácido básico na posição P₁). Considerando as diversas RmS do carrapato *R. microplus*, nove aminoácidos diferentes ocupam a posição P₁, sendo que seis das RmS (RmS-5, RmS-6, RmS-9, RmS-13, RmS-15 e RmS-16) possuem resíduo de aminoácido básico em P₁. Mais interessante ainda é o fato de que a grande maioria dessas serpinas com resíduo de

aminoácido básico em P₁ (RmS-6, RmS-9, RmS-13, RmS-15 e RmS-16) provavelmente são secretadas. O perfil de transcrição dessas serpinas mostra que na transição de partenógina para teleógina, ou seja, na passagem de um estado de pouca ingestão de sangue para o estado que faz um grande repasto sanguíneo, há indução da transcrição, em glândula salivar, de RmS-3, RmS-9, RmS-13, RmS-15 e RmS-16.

De todas essas serpinas diferencialmente transcritas em glândula salivar, somente RmS-3 não possui um resíduo básico em P₁, posição esta que é ocupada por um resíduo L. Como mencionado acima, embora a quase totalidade das serpinas envolvidas na inibição das enzimas da cascata da coagulação possuem um resíduo de aminoácido básico na posição P₁, o cofator II da heparina é diferente. Ele inibe trombina mesmo possuindo um resíduo de leucina na posição P₁. O RCL de RmS-3 apresenta 65% de identidade na sequência do RCL do cofator II de heparina. Além do mais, o RCL da RmS-3 é 75% idêntico à serpina HLS-2 de *H. longicornis*. Essas três serpinas (RmS-3, HLS-2 e cofator II de heparina) possuem os resíduos P-L-S nas posições P₂-P₁-P₁, respectivamente. A serpina rHLS-2 tem atividade anticoagulante e inibe trombina *in vitro* (Imamura *et al.*, 2005). Esses dados sugerem que RmS-3 possa atuar como um inibidor de trombina.

Todos esses dados são compatíveis com o contexto da manipulação dos processos de defesa do hospedeiro por parte do carrapato utilizando serpinas. Entretanto, isso deve ser confirmado por estudos mostrando o aumento efetivo destas moléculas na saliva de teleóginas em relação à saliva de partenóginas e a identificação de quais enzimas do hospedeiro são realmente inibidas por estas serpinas.

A obtenção de rRmS-3 e seu anti-soro possibilitou ampliar o estudo desta proteína. O soro anti-rRmS-3 reconheceu uma proteína de 55-60 kDa em todos os tecidos do carrapato, e em saliva de fêmeas totalmente ingurgitadas. Em um primeiro momento, a diferença de tamanho da proteína nativa em relação à recombinante sugere haver discrepância nos resultados, porém existem fatos que explicam isso. Uma característica muito comum em serpinas é a presença de uma cadeia polissacarídica N-ligada. Por exemplo, a massa molecular da antitrombina humana é de 58 kDa, uma massa aproximadamente 15% maior que a massa predita (com base na composição de aminoácidos), correspondendo aos carboidratos presentes na molécula. Essa característica é comum também em outras serpinas de mamíferos, como por exemplo, a serpina que inibe a fração C1 do complemento. A cadeia polipeptídica do inibidor de C1 (478 aminoácidos) possui massa molecular de 52 kDa, o que é 51% da massa molecular

da proteína nativa, que possui massa de 104 kDa. Essa característica está relacionada à presença de 19 sítios de glicosilação na proteína (Bock *et al.*, 1986). Uma alternativa para comprovar glicosilação em RmS-3 é o tratamento dos extratos proteicos com diferentes endoglicosidases e comparar as massas moleculares da proteína antes e depois desse tratamento.

A presença de anticoagulantes tem sido demonstrada em diversas espécies de hematófagos, sendo que as massas moleculares desses anticoagulantes variam geralmente entre 1 a 20 kDa, na sua grande maioria sendo proteínas pertencentes à família de inibidores tipo Kunitz (Maritz-Olivier *et al.*, 2007). Contudo, vários anticoagulantes isolados de animais hematófagos são maiores do que o tamanho usual desses inibidores. Um inibidor de fator Xa obtido de *R. appendiculatus* possui 65 kDa (Limo *et al.*, 1991). Gaspar e colaboradores (1995) mostram que *Ornithodoros savinyi* possui um anticoagulante de 50 kDa. Embora as características estruturais dessas proteínas não foram elucidadas, os seus tamanhos indicam que elas podem pertencer ao grupo das serpinas (Mulenga *et al.*, 2001). Poucos são as descrições de obtenção, purificação e caracterização de serpinas nativas em hematófagos. A única serpina de hematófago que foi isolada, purificada e posteriormente clonada e obtida por via recombinante é o inibidor de fator Xa isolado de glândula salivar de *Aedes aegyptii* que possui 55 kDa (Stark & James, 1998).

A saliva de *R. microplus* possui atividade anticoagulante (Horn *et al.*, 2000; Ciprandi *et al.*, 2006). Horn *et al.* (2000) identificaram que a saliva de fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. microplus* possui um inibidor de trombina, denominado BmAP (*Boophilus microplus Anticoagulant Protein*), de massa molecular de 60 kDa e potente atividade inibitória, apresenta IC₅₀ de 100 nM para inibição da atividade da trombina sobre fibrinogênio que também inibe a agregação plaquetária induzida por trombina. A inibição de trombina foi verificada através de ensaios enzimáticos onde a BmAP inibe a hidrólise de substratos de cadeia peptídica curta, evidenciando a interação com o sítio ativo da trombina. Correlacionando os dados obtidos na caracterização da RmS-3 com os dados descritos para a BmAP, sugerimos que este último seja um inibidor de trombina pertencente à superfamília das serpinas. A primeira correlação surge da identificação de uma proteína de 60 kDa quando saliva é sondada com o soro anti-rRmS-3. Além do mais, a saliva de *R. microplus*, quando fracionada por gel filtração, apresenta o pico correspondente ao BmAP com perfil eletroforético (SDS-PAGE 12%) semelhante ao perfil identificado pelo soro anti-rRmS-3, isto é, a presença

de uma banda dupla na mesma altura das proteínas nativas identificadas na saliva. Outro fato que suporta nossa hipótese é que serpinas interagem com o sítio ativo da endopeptidase, o que também é evidenciado nos estudos bioquímicos da BmAP. A elucidação da estrutura do BmAP ainda necessita ser melhor caracterizada, porém os dados disponíveis sugerem que ela pertence à superfamília das serpinas.

Assim como em outros organismos, o grande repertório de serpinas do carrapato bovino indica que possivelmente participam na modulação das respostas do hospedeiro como também em processos fisiológicos do próprio carrapato. Através do presente trabalho, podemos concluir que o carrapato bovino possui grande repertório de serpinas. O perfil de transcrição desses inibidores revela que as mesmas são transcritas na maioria dos tecidos analisados e nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita. RmS-3 é secretada na saliva, como evidenciado pela detecção da mesma utilizando soro anti-rRmS-3. Os papéis biológicos de cada uma dessas serpinas estão longe de serem compreendidos, mas o conhecimento que o presente trabalho trouxe permite ampliar e construir hipóteses e ferramentas que permitem novas abordagens a este problema.

5. CONCLUSÃO

- Identificação de vinte e seis sequências que codificam serpinas;
- De acordo com o tamanho e massa molecular predita, dezesseis são sequências completas;
- Possuem identidade com serpinas de diferentes espécies de carrapatos;
- Perfil de transcrição de serpinas difere entre os tecidos e estágios de desenvolvimento;
- A grande maioria delas são provavelmente serpinas inibitórias, apresentando conservação na estrutura secundária e na presença de aminoácidos essenciais à atividade inibitória;
- RmS-3 possui transcrição diferenciada em glândula salivar e é secretada na saliva

6. PERSPECTIVAS

As informações das sequências de cDNA identificadas contribuirão para a produção das serpinas de carrapato na forma recombinante, produzindo material para estudos explorando as funções dessas proteínas *in vitro* e *in vivo*.

A obtenção dessas serpinas em quantidades adequadas permitirá o estudo do potencial imunoprotetor dessas proteínas, podendo tornar-se um produto biotecnológico compondo uma vacina contra o carrapato bovino.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON J.M., SONENSHINE D.E. & VALENZUELA J.G. (2008) Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9, 552
- AZNAR J., ESPANA F., ESTELLES A. & ROYO M. (1996) Heparin stimulation of the inhibition of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor--influence of the molecular weight of heparin and ionic strength. *Thromb.Haemost.* 76, 983-988.
- BAGLIN T.P., CARRELL R.W., CHURCH F.C., ESMON C.T. & HUNTINGTON J.A. (2002) Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 11079-11084.
- BARKER S.C. & MURRELL A. (2002) Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Exp.Appl.Acarol.* 28, 55-68.
- BARKER S.C. & MURRELL A. (2004) Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129 Suppl, S15-S36
- BARRETT A.J. (2004) Bioinformatics of proteases in the MEROPS database. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 7, 334-341.
- BATISTA I.F., CHUDZINSKI-TAVASSI A.M., FARIA F., SIMONS S.M., BARROS-BATESTTI D.M., LABRUNA M.B., LEAO L.I., HO P.L. & JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I.L. (2008) Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon* 51, 823-834.
- BEYS DA SILVA W.O., SANTI L., SCHRANK A. & VAINSTEIN M.H. (2010) *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus infection. *Fungal.Biol.* 114, 10-15.
- BHOOLA K.D., FIGUEROA C.D. & WORTHY K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol.Rev.* 44, 1-80.
- BIOR A.D., ESSENBERG R.C. & SAUER J.R. (2002) Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 32, 645-655.
- BOCK S.C., SKRIVER K., NIELSEN E., THOGERSEN H.C., WIMAN B., DONALDSON V.H., EDDY R.L., MARRINAN J., RADZIEJEWSKA E., HUBER R. & . (1986) Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 25, 4292-4301.
- BODE W. & HUBER R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur.J.Biochem.* 204, 433-451.

- BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F., BENACH J.L., GRUNWALDT E. & DAVIS J.P. (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317-1319.
- CALVIN J. & PRICE C.P. (1986) Measurement of serum alpha 1-antichymotrypsin by immunoturbidimetry. *Ann.Clin.Biochem.* 23 (Pt 2), 206-209.
- CALVO E., MIZURINI D.M., SA-NUNES A., RIBEIRO J.M., ANDERSEN J.F., MANS B.J., MONTEIRO R.Q., KOTSYFAKIS M. & FRANCISCHETTI I.M. (2011) Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. *J.Biol.Chem.* 286, 27998-28010.
- CESARMAN-MAUS G. & HAJJAR K.A. (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br.J.Haematol.* 129, 307-321.
- CHALAIRE K.C., KIM T.K., GARCIA-RODRIGUEZ H. & MULENGA A. (2011) *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) tick salivary gland serine protease inhibitor (serpin) 6 is secreted into tick saliva during tick feeding. *J.Exp.Biol.* 214, 665-673.
- CHAO J. & CHAO L. (1995) Biochemistry, regulation and potential function of kallistatin. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 376, 705-713.
- CHEN V.C., CHAO L. & CHAO J. (2000a) Reactive-site specificity of human kallistatin toward tissue kallikrein probed by site-directed mutagenesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1479, 237-246.
- CHEN V.C., CHAO L. & CHAO J. (2000b) Roles of the P1, P2, and P3 residues in determining inhibitory specificity of kallistatin toward human tissue kallikrein. *J.Biol.Chem.* 275, 38457-38466.
- CHMELAR J., OLIVEIRA C.J., REZACOVA P., FRANCISCHETTI I.M., KOVAROVA Z., PEJLER G., KOPACEK P., RIBEIRO J.M., MARES M., KOPECKY J. & KOTSYFAKIS M. (2011) A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736-744.
- CIPRANDI A., DE OLIVEIRA S.K., MASUDA A., HORN F. & TERMIGNONI C. (2006) *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp.Parasitol.* 114, 40-46.
- COLLEN D. & WIMAN B. (1978) Fast-acting plasmin inhibitor in human plasma. *Blood* 51, 563-569.
- COLLEN D. & WIMAN B. (1979) Turnover of antiplasmin, the fast-acting plasmin inhibitor of plasma. *Blood* 53, 313-324.
- COOK S.P. & MCCLESKEY E.W. (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95, 41-47.

- DA SILVA V.I., Jr., IMAMURA S., NAKAJIMA C., DE CARDOSO F.C., FERREIRA C.A., RENARD G., MASUDA A., OHASHI K. & ONUMA M. (2005) Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Vet.Parasitol.* 127, 147-155.
- DAVIE E.W., FUJIKAWA K. & KISIEL W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30, 10363-10370.
- DE G. E., HAN S. J., LEE W. J., BAEK M. J., OSAKI T., KAWABATA S., LEE B. L., IWANAGA S., LEMAITRE B., BREY P. T. (2002) An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell* 3, 581-592
- DE LA FUENTE J., ALMAZAN C., CANALES M., PEREZ DE LA LASTRA JM, KOCAN K.M. & WILLADSEN P. (2007) A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res.Rev.* 8, 23-28.
- DEEM S.L. (1998) A review of heartwater and the threat of introduction of *Cowdria ruminantium* and *Amblyomma* spp. ticks to the American mainland. *J.Zoo.Wildl.Med.* 29, 109-113.
- ESTRADA-PENA A. (2006) Prediction of habitat suitability for ticks. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1078, 275-284.
- ESTRADA-PENA A., BOUATTOUR A., CAMICAS J.L., GUGLIELMONE A., HORAK I., JONGEJAN F., LATIF A., PEGRAM R. & WALKER A.R. (2006) The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp.Appl.Acarol.* 38, 219-235.
- FRANCISCHETTI I.M. (2010) Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon* 56, 1130-1144.
- FRANCISCHETTI I.M., SA-NUNES A., MANS B.J., SANTOS I.M. & RIBEIRO J.M. (2009) The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.* 14, 2051-2088.
- FUENTES-PRIOR P., IWANAGA Y., HUBER R., PAGILA R., RUMENNIK G., SETO M., MORSER J., LIGHT D.R. & BODE W. (2000) Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 404, 518-525.
- GETTINS P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem.Rev.* 102, 4751-4804.
- GUERRERO F.D., MILLER R.J., ROUSSEAU M.E., SUNKARA S., QUACKENBUSH J., LEE Y. & NENE V. (2005) BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 35, 585-595.

- HE L., VICENTE C.P., WESTRICK R.J., EITZMAN D.T. & TOLLEFSEN D.M. (2002) Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J.Clin.Invest* 109, 213-219.
- HOFFMAN M. (2003) A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* 17 Suppl 1, S1-S5
- HOFFMAN M. & MONROE D.M. (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb.Haemost.* 85, 958-965.
- HOFFMAN M., MONROE D.M. & ROBERTS H.R. (1996) Cellular interactions in hemostasis. *Haemostasis* 26 Suppl 1, 12-16.
- HOPKINS P.C., CARRELL R.W. & STONE S.R. (1993) Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry* 32, 7650-7657.
- HOPKINS P.C. & STONE S.R. (1995) The contribution of the conserved hinge region residues of alpha1-antitrypsin to its reaction with elastase. *Biochemistry* 34, 15872-15879.
- HORAK I.G., CAMICAS J.L. & KEIRANS J.E. (2002) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp.Appl.Acarol.* 28, 27-54.
- HORN F., DOS SANTOS P.C. & TERMIGNONI C. (2000) Boophilus microplus anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch.Biochem.Biophys.* 384, 68-73.
- HUNTINGTON J.A. & GETTINS P.G. (1998) Conformational conversion of antithrombin to a fully activated substrate of factor Xa without need for heparin. *Biochemistry* 37, 3272-3277.
- HUNTINGTON J.A., READ R.J. & CARRELL R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407, 923-926.
- IMAMURA S., DA SILVA V.J., I, SUGINO M., OHASHI K. & ONUMA M. (2005) A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23, 1301-1311.
- IMAMURA S., KONNAI S., VAZ I.S., YAMADA S., NAKAJIMA C., ITO Y., TAJIMA T., YASUDA J., SIMUUNZA M., ONUMA M. & OHASHI K. (2008) Effects of anti-tick cocktail vaccine against Rhipicephalus appendiculatus. *Jpn.J.Vet.Res.* 56, 85-98.
- IMAMURA S., NAMANGALA B., TAJIMA T., TEMBO M.E., YASUDA J., OHASHI K. & ONUMA M. (2006) Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against Rhipicephalus appendiculatus ticks. *Vaccine* 24, 2230-2237.
- IRVING J.A., PIKE R.N., LESK A.M. & WHISSTOCK J.C. (2000) Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 10, 1845-1864.

- ISHIGURO K., KOJIMA T., KADOMATSU K., NAKAYAMA Y., TAKAGI A., SUZUKI M., TAKEDA N., ITO M., YAMAMOTO K., MATSUSHITA T., KUSUGAMI K., MURAMATSU T. & SAITO H. (2000) Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J.Clin.Invest* 106, 873-878.
- JANOFF A. (1985) Elastase in tissue injury. *Annu.Rev.Med.* 36, 207-216.
- JIN L., ABRAHAMS J.P., SKINNER R., PETITOU M., PIKE R.N. & CARRELL R.W. (1997) The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 14683-14688.
- JITTAPALAPONG S., KAEWHOM P., PUMHOM P., CANALES M., DE LA FUENTE J. & STICH R.W. (2010) Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*. *Transbound.Emerg.Dis.* 57, 103-106.
- JONGEJAN F. & UILENBERG G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.
- KANAJI S., TANAKA Y., SAKATA Y., TAKESHITA K., ARIMA K., OHTA S., HANSELL E.J., CAFFREY C., MOTTRAM J.C., LOWTHER J., DONNELLY S., STACK C., KADOWAKI T., YAMAMOTO K., MCKERROW J.H., DALTON J.P., COOMBS G.H. & IZUHARA K. (2007) Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS Lett.* 581, 4260-4264.
- KARIM S., SINGH P. & RIBEIRO J.M. (2011) A Deep Insight into the Sialotranscriptome of the Gulf Coast Tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* 6, e28525
- KHAN M.S., SINGH P., AZHAR A., NASEEM A., RASHID Q., KABIR M.A. & JAIRAJPURI M.A. (2011) Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. *J.Amino.Acids* 2011, 606797
- KOVAROVA Z., CHMELAR J., SANDA M., BRYNDA J., MARES M. & REZACOVA P. (2010) Crystallization and diffraction analysis of the serpin IRS-2 from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.* 66, 1453-1457.
- KUROKI M. & MINAKAMI S. (1989) Extracellular ATP triggers superoxide production in human neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 162, 377-380.
- LABRUNA M.B., NARANJO V., MANGOLD A.J., THOMPSON C., ESTRADA-PENA A., GUGLIELMONE A.A., JONGEJAN F. & DE LA FUENTE J. (2009) Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evol.Biol.* 9, 46

- LASKOWSKI M. & QASIM M.A. (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim.Biophys.Acta* 1477, 324-337.
- LEBOULLE G., CRIPPA M., DECREM Y., MEJRI N., BROSSARD M., BOLLEN A. & GODFROID E. (2002a) Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. *J.Biol.Chem.* 277, 10083-10089.
- LEBOULLE G., ROCHEZ C., LOUAHED J., RUTI B., BROSSARD M., BOLLEN A. & GODFROID E. (2002b) Isolation of Ixodes ricinus salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 66, 225-233.
- LEWIS G.P. (1971) Biochemical changes in local tissue injury. *Br.J.Dermatol.* 85, 481-483.
- LI J., WANG Z., CANAGARAJAH B., JIANG H., KANOST M. & GOLDSMITH E.J. (1999) The structure of active serpin 1K from Manduca sexta. *Structure.* 7, 103-109.
- LIMO M.K., VOIGT W.P., TUMBO-OERI A.G., NJOGU R.M. & OLE-MOIYOI O.K. (1991) Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick Rhipicephalus appendiculatus. *Exp.Parasitol.* 72, 418-429.
- MACFARLANE R.G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202, 498-499.
- MANS B.J. (2011) Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *J.Innate.Immun.* 3, 41-51.
- MANS B.J., ANDERSEN J.F., FRANCISCHETTI I.M., VALENZUELA J.G., SCHWAN T.G., PHAM V.M., GARFIELD M.K., HAMMER C.H. & RIBEIRO J.M. (2008) Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38, 42-58.
- MANS B.J. & NEITZ A.W. (2004) Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 34, 1-17.
- MARITZ-OLIVIER C., STUTZER C., JONGEJAN F., NEITZ A.W. & GASPAR A.R. (2007) Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* 23, 397-407.
- MARTINS J.R. & FURLONG J. (2001) Avermectin resistance of the cattle tick Boophilus microplus in Brazil. *Vet.Rec.* 149, 64
- MCCOY A.J., PEI X.Y., SKINNER R., ABRAHAMS J.P. & CARRELL R.W. (2003) Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J.Mol.Biol.* 326, 823-833.

- MEGY K., EMRICH S.J., LAWSON D., CAMPBELL D., DIALYNAS E., HUGHES D.S., KOSCIELNY G., LOUIS C., MACCALLUM R.M., REDMOND S.N., SHEEHAN A., TOPALIS P. & WILSON D. (2012) VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D729-D734
- MERCKELBACH A. & RUPPEL A. (2007) Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 156, 84-88.
- MIURA Y., KAWABATA S., WAKAMIYA Y., NAKAMURA T. & IWANAGA S. (1995) A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *J.Biol.Chem.* 270, 558-565.
- MULENGA A., SUGINO M., NAKAJIM M., SUGIMOTO C. & ONUMA M. (2001) Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *J.Vet.Med.Sci.* 63, 1063-1069.
- MULENGA A., KHUMTHONG R. & BLANDON M.A. (2007) Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *J.Exp.Biol.* 210, 3188-3198.
- MULENGA A., KHUMTHONG R. & CHALAIRE K.C. (2009) *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics* 10, 217
- MULENGA A., TSUDA A., ONUMA M. & SUGIMOTO C. (2003) Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33, 267-276.
- MULLER-ESTERL W. & FRITZ H. (1984) Human kininogens and their function in the kallikrein-kinin systems. *Adv.Exp.Med.Biol.* 167, 41-62.
- MURRELL A. & BARKER S.C. (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst.Parasitol.* 56, 169-172.
- NENE V., LEE D., QUACKENBUSH J., SKILTON R., MWAURA S., GARDNER M.J. & BISHOP R. (2002) AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick *Amblyomma variegatum*. *Int.J.Parasitol.* 32, 1447-1456.
- OLSON S.T., BJORK I. & BOCK S.C. (2002) Identification of critical molecular interactions mediating heparin activation of antithrombin: implications for the design of improved heparin anticoagulants. *Trends Cardiovasc.Med.* 12, 198-205.
- OWEN M.C., BRENNAN S.O., LEWIS J.H. & CARRELL R.W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N.Engl.J.Med.* 309, 694-698.

- PARIZI L.F., POHL P.C., MASUDA A. & VAZ IDA S JR (2009) New approaches toward anti-Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick vaccine. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.* 18, 1-7.
- PARKER K.A. & TOLLEFSEN D.M. (1985) The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. *J.Biol.Chem.* 260, 3501-3505.
- PAROLA P. & RAOULT D. (2006) Tropical rickettsioses. *Clin.Dermatol.* 24, 191-200.
- PETER R.J., VAN DEN BOSSCHE P., PENZHORN B.L. & SHARP B. (2005) Tick, fly, and mosquito control--lessons from the past, solutions for the future. *Vet.Parasitol.* 132, 205-215.
- PHAM C.T. (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat.Rev.Immunol.* 6, 541-550.
- PHAM C.T. (2008) Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40, 1317-1333.
- POHL P.C., KLAFKE G.M., CARVALHO D.D., MARTINS J.R., DAFFRE S., DA SILVA V.I., Jr. & MASUDA A. (2011) ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Int. J.Parasitol.* 41, 1323-1333.
- POTEMPA J., KORZUS E. & TRAVIS J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* 269, 15957-15960.
- PREVOT P.P., ADAM B., BOUDJELTIA K.Z., BROSSARD M., LINS L., CAUCHIE P., BRASSEUR R., VANHAEVERBEEK M., VANHAMME L. & GODFROID E. (2006) Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus. *J.Biol.Chem.* 281, 26361-26369.
- PREVOT P.P., COUVREUR B., DENIS V., BROSSARD M., VANHAMME L. & GODFROID E. (2007) Protective immunity against Ixodes ricinus induced by a salivary serpin. *Vaccine* 25, 3284-3292.
- RAU J.C., BEAULIEU L.M., HUNTINGTON J.A. & CHURCH F.C. (2007) Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J.Thromb.Haemost.* 5 Suppl 1, 102-115.
- RAU J.C., MITCHELL J.W., FORTENBERRY Y.M. & CHURCH F.C. (2011) Heparin cofactor II: discovery, properties, and role in controlling vascular homeostasis. *Semin.Thromb.Hemost.* 37, 339-348.
- RAWLINGS N.D. & BARRETT A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem.J.* 290 (Pt 1), 205-218.
- RAWLINGS N.D. & BARRETT A.J. (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 27, 325-331.

- RAWLINGS N.D., MORTON F.R., KOK C.Y., KONG J. & BARRETT A.J. (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36, D320-D325
- RAY C.A., BLACK R.A., KRONHEIM S.R., GREENSTREET T.A., SLEATH P.R., SALVESEN G.S. & PICKUP D.J. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.
- REICHHART J. M., GUBB D., LECLERC V. (2011) The Drosophila serpins: multiple functions in immunity and morphogenesis. *Methods Enzymol.* 499, 205-225.
- RIBEIRO J.M. (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu.Rev.Entomol.* 32, 463-478.
- RIBEIRO J.M. (1989) Role of saliva in tick/host interactions. *Exp.Appl.Acarol.* 7, 15-20.
- RIBEIRO J.M., ANDERSON J.M., MANOUKIS N.C., MENG Z. & FRANCISCHETTI I.M. (2011) A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12, 136
- RIBEIRO J.M. & FRANCISCHETTI I.M. (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu.Rev.Entomol.* 48, 73-88.
- RIBEIRO J.M., LABRUNA M.B., MANS B.J., MARUYAMA S.R., FRANCISCHETTI I.M., BARIZON G.C. & DE MIRANDA SANTOS I.K. (2012) The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 42(5):332-42.
- ROBERTS J.A. (1968a) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. *J.Parasitol.* 54, 663-666.
- ROBERTS J.A. (1968b) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J.Parasitol.* 54, 667-673.
- SALDIVAR L., GUERRERO F.D., MILLER R.J., BENDELE K.G., GONDRO C. & BRAYTON K.A. (2008) Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Insect Mol.Biol.* 17, 597-606.
- SAMAD F. & LOSKUTOFF D.J. (1996) Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol.Med.* 2, 568-582.
- SAMBROOK J. E., RUSSEL D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. New York, *Cold Spring Harbor*. 3.
- SANTI L., SILVA W.O., PINTO A.F., SCHRANK A. & VAINSTEIN M.H. (2009) Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Res.Microbiol.* 160, 824-828.

- SAUK J.J., NIKITAKIS N. & SIAVASH H. (2005) Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target. *Front Biosci.* 10, 107-118.
- SCHICK C., PEMBERTON P.A., SHI G.P., KAMACHI Y., CATALTEPE S., BARTUSKI A.J., GORNSTEIN E.R., BROMME D., CHAPMAN H.A. & SILVERMAN G.A. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, 5258-5266.
- SILVERMAN G.A., BIRD P.I., CARRELL R.W., CHURCH F.C., COUGHLIN P.B., GETTINS P.G., IRVING J.A., LOMAS D.A., LUKE C.J., MOYER R.W., PEMBERTON P.A., REMOLD-O'DONNELL E., SALVESEN G.S., TRAVIS J. & WHISSTOCK J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J.Biol.Chem.* 276, 33293-33296.
- SONENSHINE D. E. Biology of ticks. (1991) New York, *Oxford University Press*, v. 1 e 2.
- STARK K.R. & JAMES A.A. (1998) Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J.Biol.Chem.* 273, 20802-20809.
- SUGINO M., IMAMURA S., MULENGA A., NAKAJIMA M., TSUDA A., OHASHI K. & ONUMA M. (2003) 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* 21, 2844-2851.
- SUTHERST R.W., WAGLAND B.M. & ROBERTS J.A. (1978) The effect of density on the survival of *Boophilus microplus* on previously unexposed cattle. *Int.J.Parasitol.* 8, 321-324.
- TEEL P.D., KETCHUM H.R., MOCK D.E., WRIGHT R.E. & STREY O.F. (2010) The Gulf Coast tick: a review of the life history, ecology, distribution, and emergence as an arthropod of medical and veterinary importance. *J.Med.Entomol.* 47, 707-722.
- TOLLEFSEN D.M. (2002) Heparin cofactor II deficiency. *Arch.Pathol.Lab Med.* 126, 1394-1400.
- TRAVIS J. (1986) Target enzymes for plasma proteinase inhibitors. *Folia Histochem.Cytobiol.* 24, 117-124.
- TRAVIS J., BOWEN J. & BAUGH R. (1978a) Human alpha-1-antichymotrypsin: interaction with chymotrypsin-like proteinases. *Biochemistry* 17, 5651-5656.
- TRAVIS J., GARNER D. & BOWEN J. (1978b) Human alpha-1-antichymotrypsin: purification and properties. *Biochemistry* 17, 5647-5651.
- TRAVIS J. & SALVESEN G. (1983a) Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst.Mitt.* 56-65.

- TRAVIS J. & SALVESEN G.S. (1983b) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu.Rev.Biochem.* 52, 655-709.
- VALENZUELA J.G., FRANCISCHETTI I.M., PHAM V.M., GARFIELD M.K., MATHER T.N. & RIBEIRO J.M. (2002) Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J.Exp.Biol.* 205, 2843-2864.
- WALPORT M.J. (2001a) Complement. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 344, 1058-1066.
- WALPORT M.J. (2001b) Complement. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* 344, 1140-1144.
- WANG Y., JIANG H. (2004) Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 387-395.
- WANG M., GUERRERO F.D., PERTEA G. & NENE V.M. (2007) Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 8, 368
- WILLADSEN P., MCKENNA R.V. & RIDING G.A. (1988) Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int.J.Parasitol.* 18, 183-189.
- YAN Y., LIU S., SONG G., XU Y. & DISSOUS C. (2005) Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Vet.Parasitol.* 131, 53-60.
- YI D., XU L., YAN R. & LI X. (2010) *Haemonchus contortus*: cloning and characterization of serpin. *Exp.Parasitol.* 125, 363-370.
- ZHOU G.X., CHAO L. & CHAO J. (1992) Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J.Biol.Chem.* 267, 25873-25880.

CURRICULUM VITAE

TIRLONI, L.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Tirloni

Local e data de nascimento: Ibirubá, RS, Brasil, 16/12/1986

Endereço profissional: Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas
Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale
Prédio 43.431 – Lab. 217
CEP 91501-970
Bairro Agronomia – Porto Alegre – RS – Brasil

Telefone profissional: (51)3308-6082/6078

E-mail: ltirloni@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

- 2010 - 2012** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Identificação e caracterização de inibidores de serino-peptidases em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
Orientador: Carlos Termignoni
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2009** Graduação em Biomedicina.
Universidade de Cruz Alta, UNICRUZ, Cruz Alta, Brasil
Título: Princípios ativos provenientes de venenos de serpentes: uma perspectiva na terapia anticoagulante
Orientador: Giovanna Grunewald Vietta

3. ESTÁGIOS:

Laboratório Geyer de Análises Clínicas - GEYER

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estágio curricular , Carga horária: 510

Laboratório de Biologia Molecular e Celular - AMPLICON

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio curricular , Carga horária: 510

Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Laboratório de Histotécnica , Carga horária: 20

2008 - 2008 Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de Hematologia Clínica , Carga horária: 60

2007 - 2007 Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de Hematologia Geral , Carga horária: 60

Exatta Análises Clínicas - EXATTA

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Laboratório de Análises Clínicas , Carga horária: 20

4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

ALI, A., TIRLONI, L., SEIXAS, A., DA SILVA VAZ, ITABAJARA JR., TERMIGNONI, C. Cloning and characterization of Boophilus microplus metalloproteases In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2011.

DEDAVID E SILVA, L. A., TIRLONI, L., LOSS, G., MARGIS, R., DA SILVA VAZ, ITABAJARA JR., MACEDO, A. J., TERMIGNONI, C. Expressão da queratinase KerS14 de Bacillus subtilis S14 em Escherichia coli In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2011.

TIRLONI, L., SEIXAS, A., DA SILVA VAZ, ITABAJARA JR., TERMIGNONI, C. Sequence Analysis and Cloning of a Putative Serine Endopeptidase Inhibitor from the Cattle Tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus In: 23rd International Conference of The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2011, Buenos Aires.

Proceedings 23rd WAAVP 2011. Buenos Aires: MCI, 2011.

TIRLONI, L., ALI, A., SEIXAS, A., DA SILVA VAZ, ITABAJARA JR., TERMIGNONI, C. Serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus: cloning and expression In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2011.

TIRLONI, L., SEIXAS, A., TERMIGNONI, C. Determinação da sequência de aminoácido de dois anticoagulantes isolados do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus In: XII Reunião Anual do PPGBCM, 2010, Porto Alegre.

Livro de Resumos. , 2010.

TIRLONI, L., FRIZZO, M. Influência de Helicobacter pylori no câncer gástrico In: XIII Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2008, Cruz Alta.

Anais da XIII Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão; XI Mostra de Iniciação Científica e VI Mostra de Extensão. , 2008.

5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011. (Congresso)
2. Simpósio Sobre Terapias Inovadoras, 2009. (Simpósio)
4. Simpósio de Microbiologia Clínica, 2008. (Simpósio)
5. XIII Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão; XI Mostra de Iniciação Científica e VI Mostra de Extensão, 2008. (Seminário)
6. III Encontro de Hemoterapia e I Mostra Científica, 2008. (Encontro)
7. I Jornada de Controle de Qualidade em Laboratórios, 2008. (Outra)
8. III Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina, 2008. (Outra)
9. IV Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina, 2008. (Outra)
10. IV Encontro de Saúde da Mulher: Abordagem Multidisciplinar do Câncer de Colo de Útero, 2008. (Encontro)
11. I Semana Acadêmica do Curso de Farmácia, 2007. (Outra)
12. II Semana Acadêmica da Biomedicina "A arte de ensinar e diagnosticar", 2006. (Outra)
13. II Encontro de Biomedicina, 2006. (Encontro)

6. ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. TIRLONI, L.
II Semana Acadêmica de Biomedicina, 2006. (Organização de evento)
2. TIRLONI, L.
Curso de Férias PPGBCM UFRGS, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)