

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

Atividade anticoagulante da catepsina L-like protease BmCL1 do carrapato

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Marina Amaral Xavier

Março de 2016

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

Atividade anticoagulante da catepsina L-like protease BmCL1 do carrapato

Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Marina Amaral Xavier

Orientador: Dr. Carlos Termignoni

Co-orientadora: Dr.^a Adriana Seixas

Porto Alegre, março de 2016

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Brasil

Fontes Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Entomologia Molecular (INCT-EM),
Brasil

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Termignoni pela oportunidade, confiança, incentivo e inúmeros aprendizados;

À Adri, Ita e Alexandre pelos ensinamentos e por serem sempre solícitos;

Aos colegas dos laboratórios 205 e 217 por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável, pela amizade, trocas de conhecimentos e tantas vezes que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Mari, Lucas, Luís, Dai, Lucía, Gabi, Fernanda, Carol, Michele, Bárbara, Débora, Aline, Flávia, Sharon, Anelise, Luiza e Luana;

À minha família pelo apoio; em especial aos meus pais, que são meus principais incentivadores, pela confiança e suporte para que eu concluísse mais esta etapa;

Aos meus padrinhos e primas que me acolhem e constituem a minha família em Porto Alegre;

À Luisa, Vanessa, Flávia, Bárbara, Janine e Mariana pela amizade e companheirismo;

À banca por terem aceitado o convite;

À UFRGS e órgãos de fomento, que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho,

Muito obrigada!

ÍNDICE

1 Introdução.....	13
1.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	14
1.2 Hematofagia e Digestão de Sangue.....	17
1.3 Catepsinas Envolvidas na Digestão de Sangue.....	20
1.3.1 Cisteíno-proteases Catepsinas L-like.....	22
1.3.1.1 <i>Haemaphysalis longicornis</i>	22
1.3.1.2 <i>Ixodes ricinus</i>	23
1.3.1.3 <i>Rhipicephalus annulatus</i>	24
1.3.1.4 <i>Rhipicephalus microplus</i>	25
1.4 Cascata de Coagulação Sanguínea.....	27
1.5 Inibidores da Coagulação Sanguínea em Carrapatos.....	33
2 Objetivos.....	37
3 Metodologia.....	38
3.1 Obtenção de Carrapatos.....	38
3.2 Extrato de Intestino de Fêmeas de <i>R. microplus</i>	38
3.3 Purificação de BmGTI.....	39
3.3.1 Cromatografia de Troca Iônica.....	39
3.3.2 Cromatografia de Gel Filtração.....	40
3.3.3 Cromatografia de Afinidade Trombina-Sepharose.....	40
3.4 Ensaio de Coagulação do Fibrinogênio Induzida por Trombina.....	41
3.5 Identificação de BmGTI.....	42
3.5.1 SDS-PAGE e Digestão de Proteínas.....	42
3.5.2 LC-MS/MS.....	42
3.5.3 Análise de Dados da LC-MS/MS.....	43
3.6 Expressão Heteróloga de BmCL1 Recombinante.....	45
3.6.1 Ensaio de Atividade Enzimática.....	45
3.7 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre Trombina.....	46
3.8 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre Fibrinogênio.....	47

4 Resultados.....	48
4.1 Purificação de BmGTI	48
4.2 Análise LC-MS/MS	52
4.3 Expressão Heteróloga e Purificação de BmCL1 Recombinante	54
4.4 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre Coagulação do Fibrinogênio Induzida por Trombina.....	55
5 Discussão	60
6 Conclusão.....	67
7 Referências	68
Currículo	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg - Arginina

Asp – Aspartato

BCA – ácido bicinconínico

BmCL1 – *Boophilus microplus* Cathepsin L-like cysteine protease

BmGTI – *Boophilus microplus* Gut Thrombin Inhibitor

C-terminal – carboxi-terminal

cDNA – ácido nucleico desoxirribonucleico complementar

DTT - ditioneitol

E64 – N-[N-(L-3- transcarboxyirane-2-carbonyl)-L-Leucyl]-agmatine

His – Histidina

kDa – quilodalton

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

Leu – Leucina

M – molar (mol/L)

N-terminal – amino-terminal

NSAF – Fator de Abundância Espectral Normalizado

ORF – Open Read Frame

Phe – Fenilalanina

pM – picomolar

PPACK – D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone

RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Ser - Serina

Tyr – Tirosina

Val – Valina

Z-Phe-Arg-MCA – Z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação diagramática da cascata de coagulação sanguínea.....	28
Figura 2: Representação da estrutura do fibrinogênio, mostrando os domínios globulares das cadeias β e γ	32
Tabela 1: Inibidores de fXa e trombina em espécies de carrapato.....	33
Figura 3: Cromatografia de troca iônica.....	49
Figura 4: Cromatografia de gel filtração.	50
Figura 5: Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose.....	51
Figura 6: Separação das proteínas ao final da purificação de BmGTI por eletroforese.....	52
Figura 7: Localização na sequência da BmCL1 dos peptídeos trípticos de BmGTI identificados por LC-MS/MS.....	53
Tabela 2: Identificação das proteínas mais abundantes por LC-MS/MS.....	54

Figura 8: Atividade inibitória de rBmCL1/BmGTI sobre trombina.....	56
Figura 9: Atividade enzimática residual de trombina.....	57
Figura 10: Incubação de trombina e rBmCL1/BmGTI.....	58
Figura 11: Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre fibrinogênio.....	59

Resumo

Introdução: *Rhipicephalus microplus* é um parasito importante na bovinocultura. Novas estratégias de controle dependem de um maior entendimento da sua fisiologia e da relação parasito-hospedeiro, e moléculas envolvidas na aquisição e digestão de sangue são alvos interessantes. **Objetivo:** determinar o mecanismo de ação do inibidor de coagulação BmGTI (*Boophilus microplus* Midgut Thrombin Inhibitor). **Metodologia:** BmGTI foi obtido a partir do homogenato de intestino de fêmeas de *R. microplus* parcialmente ingurgitadas utilizando técnicas de cromatografia de troca iônica, gel filtração e afinidade por trombina. A atividade inibitória foi monitorada pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina. A preparação de BmGTI foi avaliada por SDS-PAGE e analisada por LC-MS/MS. A provável ORF de BmGTI foi clonada no plasmídeo pPIC9, expressa em *Pichia pastoris* e purificada. Diferentes razões molares de trombina:rBmGTI foram examinadas para atividade inibitória de trombina sobre a clivagem do fibrinogênio em pH 7,5. E64 foi usado para bloquear o sítio ativo de rBmGTI e o ensaio de inibição foi realizado. Diferentes razões molares de trombina:rBmGTI foram incubadas e analisadas por SDS-PAGE para verificar interações entre as proteases. A atividade de rBmGTI sobre o fibrinogênio foi analisada pela incubação de ambos. **Resultados e Discussão:** Baseado na *m/z* dos fragmentos trípticos de BmGTI sua sequência foi identificada como BmCL1, uma catepsina L-like protease ativa em pH ácido, mas sem capacidade de hidrolisar substrato sintético em pH $\geq 7,0$. rBmCL1/BmGTI foi expressa em *P. pastoris* como pró-enzima e após ativação, a enzima foi purificada. Diferentes razões molares de trombina:rBmCL1/BmGTI foram ensaiadas; quando a concentração de rBmCL1/BmGTI estava 64 vezes maior do que a de trombina, esta apresentou atividade residual de 37%. Quando rBmCL1/BmGTI teve seu sítio ativo bloqueado por E64, não houve inibição da atividade de trombina sobre fibrinogênio. A análise do fibrinogênio por SDS-PAGE, após incubação com rBmCL1/BmGTI, mostrou que as cadeias α e β do fibrinogênio são hidrolisadas. **Conclusão:** A partir destes resultados, concluímos que BmGTI inibe a coagulação sanguínea pela hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio.

Abstract

Introduction: *Rhipicephalus microplus* is an important parasite of cattle. New strategies for control depend on a better knowledge of its physiology and host-parasite relationship, and molecules involved in acquisition and digestion of blood meal are interesting targets. **Objectives:** to determine how BmGTI (*Boophilus microplus* Midgut Thrombin Inhibitor) inhibits coagulation. **Materials and Methods:** BmGTI was obtained from partially engorged females midguts homogenate through ion exchange, size exclusion and thrombin-affinity chromatographies. Thrombin inhibition activity was measured by thrombin-induced fibrinogen clotting assay. BmGTI preparation was checked by SDS-PAGE and analyzed by LC-MS/MS. BmGTI putative ORF was cloned in pPIC9 plasmid, expressed in *Pichia pastoris* and purified. Different molar ratios of thrombin:BmGTI were examined for inhibitory activity of thrombin upon fibrinogen cleavage at pH 7.5. E64 was used to block BmGTI active site and inhibitory activity was assayed. Different molar ratio of thrombin:BmGTI were incubated and analyzed by SDS-PAGE to verify protease-inhibitor interactions. BmGTI direct activity upon fibrinogen was analyzed after incubation by SDS-PAGE. **Results and Discussion:** Based on *m/z* of the BmGTI tryptic fragments it was identified as BmCL1, a cathepsin L-like proteinase active at acidic pH, but unable to hydrolyze synthetic substrate at pH ≥ 7.0 . BmCL1/BmGTI was expressed in *P. pastoris* as pro-enzyme and after activation the enzyme was purified. Different molar ratios of thrombin:rBmCL1/BmGTI were assayed, and when rBmCL1/BmGTI concentration was 64-fold higher than thrombin concentration, this enzyme residual activity was 37%. When rBmCL1/BmGTI has its active site blocked with E-64, it was unable to inhibit thrombin activity upon fibrinogen. Analysis by SDS-PAGE of fibrinogen after incubation with rBmCL1/BmGTI showed that fibrinogen chains α and β were hydrolyzed. **Conclusion:** Based on these results, we concluded that rBmGTI/BmCL1 inhibits blood coagulation through hydrolyzes of fibrinogen chain- α and β .

1 Introdução

Carrapatos são ectoparasitos do filo Arthropoda, hematófagos de mamíferos, aves, répteis, anfíbios (ANDERSON & MAGNARELLI, 2008) os quais estão amplamente distribuídos a nível mundial (JONGEJAN & UILENBERG, 2004). Estão incluídos na classe Arachnida, ordem Acarina e subordem Ixodida, a qual é dividida em três famílias: Ixodidae (carrapatos duros), Argasidae (carrapatos moles) e Nuttalliellidae. Os argasídeos compreendem 183 espécies em 4 gêneros (*Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* e *Otobius*). Os ixodídeos contêm 241 espécies no gênero *Ixodes* e 442 espécies compreendidas nos gêneros *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*. A família Nuttalliellidae é representada pelo gênero monoespecífico *Nuttalliella*, o qual possui uma única espécie, *Nuttalliella namaqua* (HORAK & CAMICAS, 2002; BARKER & MURRELL, 2004).

Vetores de micro-organismos, protozoários, bactérias e vírus, os carrapatos são os maiores transmissores de patógenos dentre os ácaros (JONGEJAN & UILENBERG, 2004), ficando atrás apenas de mosquitos no que se refere à transmissão de patógenos para o homem (SONENSHINE, 1991). A picada de algumas espécies de carrapato pode causar paralisia, toxicose, alergia e irritação. A importância na transmissão de doenças pode ser avaliada pela morbidade e mortalidade em humanos e animais domésticos; enquanto que a importância para a pecuária está também relacionada às perdas econômicas aos produtores rurais,

principalmente em regiões da África, Ásia e América Latina (JONGEJAN & UILENBERG, 2004).

1.1 O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, também conhecido como carrapato-do-boi, é o carrapato de maior importância econômica no Brasil, sendo que o prejuízo anual no país causado por este ectoparasito foi estimado em US\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014). Estas perdas econômicas estão relacionadas tanto ao parasitismo do *R. microplus*, que provoca diminuição da produção de carne e leite devido à espoliação sanguínea e suas consequências (anemia, prurido, irritação, perda de peso, miíases e desvalorização dos couros), quanto pela transmissão de agentes causadores de doenças, como a tristeza parasitária bovina (causada pelo protozoário *Babesia* spp. e a bactérias *Anaplasma* spp.) (JONSSON, 2006; ANDREOTTI, 2010). RODRIGUES & LEITE (2013) estimaram um prejuízo na produção de leite em 90,24 litros por vaca por lactação, causados pelo *R. microplus* no estado de Minas Gerais. Na bovinocultura de corte, o ingurgitamento de uma única fêmea de *R. microplus* é capaz de causar perda de peso de 1,37 g em *Bos taurus*. Considerando o grande número de carrapatos que infestam um bovino ao longo de sua vida, isto corresponde à perda de vários quilos (JONSSON, 2006).

O *R. microplus* é originário do sudeste da Ásia e foi amplamente disseminado pela Austrália, leste e sul da África, centro e sul da América

(JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Devido a diferenças morfológicas e genéticas entre cepas de *R. microplus* da Austrália e da América/Ásia, foi proposto que as diferenças biogeográficas e ecológicas teriam resultado em duas espécies diferentes deste carrapato, *R. australis* e *R. microplus* (DE LA FUENTE et al., 2000; LABRUNA et al., 2009).

O *R. microplus* é um parasito monoxeno, que possui como hospedeiro preferencial bovinos (SONENSHINE, 2013), mas pode eventualmente completar seu ciclo alimentando-se em outros animais como ovelhas, veados, cavalos, búfalos, entre outros (FRANQUE et al., 2009; BENITEZ et al., 2012; POPARA et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

O método de controle mais utilizado para o controle das infestações por *R. microplus* é o uso de carrapaticidas. Na prática da produção pecuária, há uso indiscriminado e inadequado de carrapaticidas, o que tem levado à seleção e proliferação de populações resistentes às drogas carrapaticidas, além de produzir contaminação ambiental e deixar resíduos químicos nos produtos derivados dos animais tratados. Um dos motivos do uso disseminado e inadequado de carrapaticidas deve-se ao fato de não existir no Brasil um programa oficial de controle do carrapato, permitindo que os métodos e critérios de controle sejam decididos unicamente pelos fazendeiros (FURLONG, 2003; ANDREOTTI, 2010). Dessa forma, o uso de métodos de controle alternativos vêm sendo pesquisados, como o controle biológico por fungos (SANTI et al., 2009; BEYS DA SILVA et al., 2010; FERNANDES et al., 2012) e o controle imunológico por meio de vacinas

(PARIZI et al., 2012a, 2012b; MERINO et al., 2013; DE LA FUENTE & CONTRERAS, 2015). Apesar do grande esforço aplicado no desenvolvimento de vacinas para controle do carrapato, até o momento não há vacina eficaz contra este parasito. O estudo da fisiologia do carrapato e da interação parasito-hospedeiro são conhecimentos que podem contribuir para a formulação de vacinas efetivamente eficazes (PARIZI et al., 2009). Moléculas envolvidas na sua sobrevivência, como aquisição e digestão do sangue e modulação da resposta imune, são alvos terapêuticos e imunológicos promissores para o controle deste parasito.

O ciclo de vida do *R. microplus* pode ser dividido em fase de vida parasitária e de vida livre, esta última tendo duração dependente das condições ambientais de temperatura e umidade, em condições ideais dura cerca de um mês, e em condições adversas pode durar até um ano. A etapa que demarca o início desta fase é quando as fêmeas totalmente ingurgitadas (teleóginas) desprendem-se do hospedeiro, caem ao solo e buscam um local para postura dos ovos. A oviposição termina em aproximadamente 18 dias após o início desta fase, com aproximadamente 3000 ovos postos. No 21° dia, ocorre a eclosão dos ovos, e após sete dias as larvas infestantes estão prontas para iniciar a fase de vida parasitária (ROCHA, 1997).

A fase de vida parasitária dura em média 21 dias, e tem início quando as larvas infestantes encontram e fixam-se no hospedeiro. Inicialmente, as larvas alimentam-se de linfa, sofrem metamorfose para metalarva e em seguida, para

ninfa. O dimorfismo sexual das ninfas ocorre após sete dias, dando origem às neóginas (fêmeas) e neandros (machos). Quando adultos, os machos (agora chamados de gonandro) copulam com as fêmeas, e apenas aquelas fêmeas que são fecundadas completam o ciclo de vida parasitário. Estas, iniciam a hematofagia passando pela etapa de partenógina (parcialmente ingurgitadas) e enfim, teleóginas (totalmente ingurgitadas). A fase de vida parasitária finaliza quando as teleóginas desprendem-se do hospedeiro. Os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro e se fixam apenas para o repasto sanguíneo, podendo assim acasalar com várias fêmeas (ROBERTS, 1968; ROCHA, 1997).

1.2 Hematofagia e Digestão de Sangue

É pela hematofagia que as fêmeas de carrapatos fazem sua alimentação a fim de concluir o ciclo de vida parasitário. Os carrapatos ixodídeos fixam-se ao hospedeiro pelas peças bucais e alimentam-se apenas uma vez por estágio de vida. A primeira etapa para o início da alimentação, que dura aproximadamente um dia, envolve a perfuração inicial da pele do hospedeiro para estabelecer o local de fixação. A alimentação das fêmeas ocorre durante dias, sendo que durante um período de três a cinco dias (dependendo da espécie do carrapato) a alimentação é lenta e nos últimos um ou dois dias ocorre um rápido ingurgitamento, no qual a fêmea adquire $\frac{2}{3}$ do volume total de sangue que foi ingerido. A fêmea totalmente ingurgitada ingere um volume de sangue que é equivalente a cerca de 100 vezes o seu peso inicial antes do início do período de hematofagia (SONENSHINE, 2013).

Durante a alimentação, há uma alternância entre salivação e ingestão de sangue: o intestino bombeia água e eletrólitos na hemocele, que voltam à saliva, enquanto que o alimento fica armazenado no intestino (GREGSON, 1967; FRANCISCHETTI et al., 2009). A condição ideal para hematofagia seria uma situação na qual não houvesse coagulação, a fluidez sanguínea fosse intensa e o hospedeiro não pudesse mecanicamente interromper o processo como, por exemplo, com movimentos da cauda e roçar-se contra superfícies. No entanto, o hospedeiro possui mecanismos de defesa que dificultam a hematofagia, por meio da hemostasia, inflamação e resposta imune adaptativa (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003). O sucesso na alimentação do carrapato deve-se a um processo evolutivo, no qual os componentes salivares auxiliam o parasito a evadir-se das defesas do hospedeiro tanto contra a hemostasia (coagulação sanguínea, agregação plaquetária e vasoconstrição) quanto para os processos de resposta imune inata e adaptativa. O desenvolvimento de uma resposta inflamatória no local da picada prejudica o processo de alimentação por impedir a fluidez sanguínea e por provocar dor e prurido. Dessa forma, a saliva destes parasitos contém moléculas com atividades anticoagulante, antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e imunomodulatórias (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2003; FRANCISCHETTI et al., 2009).

A digestão do sangue em carrapatos é um processo lento intracelular, que ocorre em vesículas acídicas no interior das células epiteliais intestinais (GRANDJEAN & AESCHLIMANN, 1973). A hipótese é que os tipos celulares encontrados no epitélio intestinal sejam na verdade o mesmo tipo de célula

(chamada de célula digestiva) em diferentes estágios de maturação, passando pelas fases de crescimento, diferenciação e alterando as funções de endocitose, digestão lisossomal, secreção e formação de hemossomos (organelas que contém heme agregado; o sequestro de heme evita sua toxicidade). Durante o período de alimentação lenta ocorre uma maturação gradual das células digestivas, que se desprendem do epitélio. No período de ingurgitamento rápido, o perfil das células observadas é bem diferente do inicial, mantendo-se associadas ao epitélio (AGYEI & RUNHAM, 1995; LARA et al., 2003, 2005; FRANTA et al., 2010).

A hemoglobina liberada dos eritrócitos é o componente nutritivo primário, e o sangue ingerido é fonte de proteínas para processos anabólicos como vitelogenese e ovogênese (SONENSHINE, 1991). As células digestivas utilizam pelo menos dois mecanismos endocíticos diferentes para o processamento das proteínas do sangue, como demonstrado por LARA et al. (2005) em experimentos com *R. microplus* com as duas proteínas sanguíneas mais abundantes: albumina e hemoglobina. A captação da albumina parece ocorrer de um modo endocítico fluído não-específico (LARA et al., 2005), sendo em seguida transportada para vesículas ácidas digestivas, nas quais enzimas proteolíticas clivam a proteína (SOJKA et al., 2015). Em relação ao mecanismo observado com a hemoglobina, receptores de superfície celular estariam envolvidos na captação da hemoglobina para então esta ser entregue a vesículas endocíticas (LARA et al., 2005), nas quais uma cascata de enzimas proteolíticas degradam a hemoglobina (HORN et al., 2009). A existência de um mecanismo diferenciado para processamento da

hemoglobina pode ser entendido como uma proteção à potencial toxicidade do grupo heme (LARA et al., 2005). Em 2015, LARA et al. identificaram um transportador do tipo ABC (RmABCB10) na membrana das vesículas digestivas de *R. microplus*, envolvido no transporte de heme destas membranas para o citosol. Além disso, foi sugerido a presença de transportadores ABC na membrana dos hemossomos, dentre os quais este mesmo receptor RmABCB10 poderia estar envolvido (LARA et al., 2015).

1.3 Catepsinas Envolvidas na Digestão de Sangue

Cisteíno proteases são enzimas proteolíticas que hidrolisam ligações peptídicas por meio de um resíduo reativo de cisteína em seu sítio catalítico, o qual forma um intermediário covalente com o grupamento carbonila da ligação peptídica suscetível no substrato. A maior família de cisteíno proteases são as do tipo papaína (papaína-*like* proteases), que em geral são endopeptidases, mas também podem ter papel como exopeptidases ou ambas. As papaína-*like* são encontradas em vírus, plantas, parasitos primitivos, invertebrados e vertebrados (OTTO & SCHIRMEISTER, 1997; BRÖMME, 2000).

O nome catepsina, de origem grega (= “digerir”) foi o nome atribuído originalmente às cisteíno proteases papaína-*like* de mamíferos. Atualmente, o termo catepsina também se refere a outras famílias de cisteíno-proteases e para alguns membros de aspartato- e serino-proteases. As papaínas-*like* possuem o sítio catalítico formado pelos resíduos cisteína, histidina e asparagina; enquanto

que nas serino-proteases, os resíduos da tríade catalítica são serina, histidina e aspartato. Os resíduos cisteína e histidina formam um par iônico estabilizado pelo asparagina, que está presente no estado fundamental da enzima independente da interação com substrato. O grupo tiol da cisteína ataca o grupamento carbonila da ligação peptídica do substrato, formando um intermediário tetraédrico que se cinde em um intermediário enzima acilada (pela formação de ligação tiol-éster entre o grupo tiol da cisteína do sítio ativo e a carbonila que será a nova extremidade C-terminal) e o primeiro produto, o peptídeo que corresponde ao segmento da porção C-terminal do substrato. Em seguida, há formação de um segundo intermediário tetraédrico que facilita a hidrólise da acil-enzima, que finalmente é liberada em enzima livre e o segmento N-terminal do substrato (BRÖMME, 2000).

O mecanismo proteolítico de degradação da hemoglobina nas vesículas digestivas foi descrito por HORN et al. (2009), em estudo com *Ixodes ricinus*. Em uma primeira etapa da degradação, a hemoglobina é clivada por endopeptidases catepsinas D (aspártico-proteases) e L (cisteíno proteases tipo papaína) e legumaínas (asparaginil-proteases). O grupamento heme agora livre, é transportado e acumulado nos hemossomos. Em uma segunda etapa de clivagem, a atividade de endopeptidase de uma catepsina B (família papaína) gera fragmentos menores. Este *pool* de fragmentos é então degradado por exopeptidases, pela atividade de dipeptidase de catepsinas B e C (família papaína), as quais atuam nas extremidades C- e N-terminal, respectivamente. Há hipótese sobre a participação de mono-peptidases (serino-carboxipeptidases e

leucina-aminopeptidases) na liberação de aminoácidos destes peptídeos fragmentados derivados de hemoglobina. Ainda, neste estudo foi observado que, de acordo com a via de degradação sugerida, o pH ótimo de atividade das enzimas aumenta gradativamente quando analisadas essas proteínas individualmente. No entanto, esse gradiente de pH ótimo estaria associado a um mecanismo de regulação fisiológica da hemoglobinólise controlado pelo pH da vesícula digestiva (HORN et al., 2009; SOJKA et al., 2013).

A degradação da albumina parece ocorrer de forma similar à hemoglobina, nas vesículas ácidas, embora sigam rotas endocíticas intracelulares diferentes nas células digestivas de carrapatos. SOJKA et al. (2015) observou que enquanto na primeira etapa da hemoglobinólise a degradação é realizada por catepsina D, na albuminólise a clivagem ocorre principalmente por endopeptidases da família das papaínas, amparadas por outras cisteíno- e aspártico-proteases.

1.3.1 Cisteíno-proteases Catepsinas L-like

1.3.1.1 *Haemaphysalis longicornis*

A presença de transcritos de genes (HLCG-A e HLCG-B) que codificam cisteíno proteases de intestino de *H. longicornis* foram identificados por MULENGA et al. (1999a). Através da técnica de RT-PCR usando cDNA de intestino de *H. longicornis* seguido de sequenciamento, foi mostrado que esses genes possuem alta homologia com sequências de outras catepsinas L-like

(MULENGA et al., 1999a). Ensaios de degradação de gelatina mostraram a presença de duas cisteíno-proteases, de 40 e 48 kDa, em extrato de intestino de *H. longicornis*. Ambas proteínas mostram maior expressão no intestino de fêmeas alimentadas do que não alimentadas (MULENGA et al., 1999b), sugerindo seu envolvimento na digestão de sangue.

Uma catepsina L-like HICPL-A foi expressa na forma recombinante em *E. coli* e caracterizada tanto na forma de zimogênio quanto de enzima madura. A enzima mostrou atividade ótima em pH 3,6 para a hidrólise de substrato fluorogênico e degradação de hemoglobina (YAMAJI et al., 2009). O silenciamento do gene que codifica para esta enzima por RNA de interferência (RNAi) provocou redução de peso e diferenças morfológicas no desenvolvimento e na sobrevivência de fêmeas de *H. longicornis*. Levou também a um aumento da expressão de outras enzimas envolvidas na hemoglobínólise, provavelmente por um mecanismo compensatório (YAMAJI et al., 2013).

1.3.1.2 *Ixodes ricinus*

A via de degradação da hemoglobina no carrapato *I. ricinus* foi descrita por HORN et al. (2009). Dentre as catepsinas envolvidas nesta cascata de proteases, a catepsina L-like IrCL1 foi inicialmente identificada por SOJKA et al. (2008) e posteriormente caracterizada por FRANTA et al. (2011). IrCL1 está envolvida na etapa inicial de degradação da hemoglobina, juntamente com a catepsina D IrCD e a legumaina IrAE. A participação desta catepsina L na digestão de hemoglobina

foi demonstrada por meio da técnica de RNAi. Fêmeas de *I. ricinus* que tiveram silenciado o gene dessa enzima cresceram menos do que fêmeas que não tiveram o gene silenciado (FRANTA et al., 2011). Sua maior atividade foi observada no período de alimentação lenta, entre os primeiros dois a seis dias após a fixação da fêmea no hospedeiro (FRANTA et al., 2010).

O mapa de clivagem de IrCL1 mostra preferência por aminoácidos de cadeia polar na posição P₁ (nomenclatura de SCHECHTER & BERGER, 1967); resíduos aromáticos e resíduos alifáticos ramificados na posição P₂; em P₃ não há especificidade por substrato; e em P₄ há uma baixa preferência por resíduos apolares grandes. Além disso, por técnica de imunohistoquímica, foi observado que esta enzima está presente em vesículas endossomais de células digestivas metabolicamente ativas, corroborando os dados que mostram sua participação na degradação de hemoglobina (FRANTA et al., 2011).

1.3.1.3 *Rhipicephalus annulatus*

SAIDI et al. (2015) identificaram pela primeira vez uma catepsina em *R. annulatus*. O gene que codifica para esta enzima foi clonado em *E. coli* para também ser sequenciado e caracterizado por bioinformática. Essa catepsina L-like foi denominada de RaCL1. Ela possui 98% de identidade com outras duas catepsinas L identificadas em *R. microplus* (números de acesso no GenBank: AFQ98385.1 e AFQ98389.1). Considerando a região que não apresenta identidade, RaCL1 é mais hidrofóbica, de acordo com as sequências de

aminoácidos preditas para estas três catepsinas. A análise filogenética descrita por SAIDI et al. (2015), sugere proximidade genética entre RaCL1 e catepsinas de *R. microplus* [GenBank: AFQ98385, AFQ98390, AFQ98392 e AAF61565 (BmCL1)].

A predição de regiões antigênicas em RaCL1 mostrou que duas regiões ricas em aminoácidos hidrofóbicos (4–23 e 278–287) possuem potencial antigênico (SAIDI et al., 2015). No entanto, nenhum experimento *in vitro* foi realizado para confirmar as propriedades enzimáticas e antigênicas de RaCL1.

1.3.1.4 *Rhipicephalus microplus*

A atividade de cisteíno proteases no extrato bruto de intestino de fêmeas de *R. microplus* foi descrito por MENDIOLA et al. (1996), utilizando substratos proteicos, peptídeos sintéticos e inibidores. Pela especificidade foi sugerida a presença de catepsinas L. Contudo, BmCL1 (*Boophilus microplus* Cathepsin L-like cysteine protease) (RENARD et al., 2000) foi a primeira catepsina L-like de *R. microplus* caracterizada quanto à estrutura primária, expressa na forma recombinante e que teve sua especificidade determinada. A enzima nativa tem atividade proteolítica sobre vitelina de carrapato e hemoglobina bovina em pH 4,0 (ESTRELA et al., 2007; ESTRELA et al., 2010). A enzima recombinante (rBmCL1) expressa em *E. coli* hidrolisa os substratos naturais hemoglobina bovina, vitelina de carrapato e gelatina em pH 3,5, e em pH 5,5 apenas gelatina. Utilizando substrato sintético como modelo, a enzima mostrou atividade na faixa de pH 2,5

até 6,5, não possuindo atividade sobre esses substratos em pH acima de 7,0 (RENARD et al., 2000). A clivagem de hemoglobina por rBmCL1 pode ocorrer em diversos sítios, e a estrutura primária de alguns desses peptídeos gerados possui alta similaridade com peptídeos antimicrobianos, sugerindo que a enzima tenha papel nos mecanismos de proteção antimicrobiana (CRUZ et al., 2010).

A presença de BmCL1 em vesículas secretórias das células intestinais de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas foi detectada por imunolocalização. Análises por RT-PCR mostram a pró-enzima de BmCL1 transcrita no intestino de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas, e no extrato total de larvas, fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas de *R. microplus*. Por Western Blot, BmCL1 foi detectada no intestino e extrato total de fêmeas parcialmente ingurgitadas (pró-enzima e enzima madura), e no extrato total de larvas de 5-10 dias (enzima madura) (RENARD et al., 2002).

A especificidade por substrato de rBmCL1 expressa em *Pichia pastoris* foi analisada por varredura posicional em biblioteca combinatória sintética (PS-SCL) (CRUZ et al., 2010) e por biblioteca de peptídeos em *Phage Display* (CLARA et al., 2011). Na posição P₁, a preferência é por resíduos de aminoácidos polares; em P₂, a prioridade são os resíduos de aminoácidos apolares Val, Leu e Phe, e o aminoácido polar Tyr; nas posições P₃ e P₄ são preferidos aminoácidos polares (CRUZ et al., 2010).

1.4 Cascata de Coagulação Sanguínea

O modelo de coagulação sanguínea proposto por HOFFMAN (2003) (Fig. 1) propõe que o processo de coagulação inicia quando o fator tecidual (TF) é exposto na corrente sanguínea. O TF não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, porém está presente na membrana das células localizadas no espaço extravascular (exemplo, fibroblastos e células da musculatura lisa). A presença no sangue de fragmentos de membranas celulares contendo TF, provenientes de leucócitos, endotélio e plaquetas, é um fator importante em processos trombóticos (OSTERUD & BJORKLID, 2006).

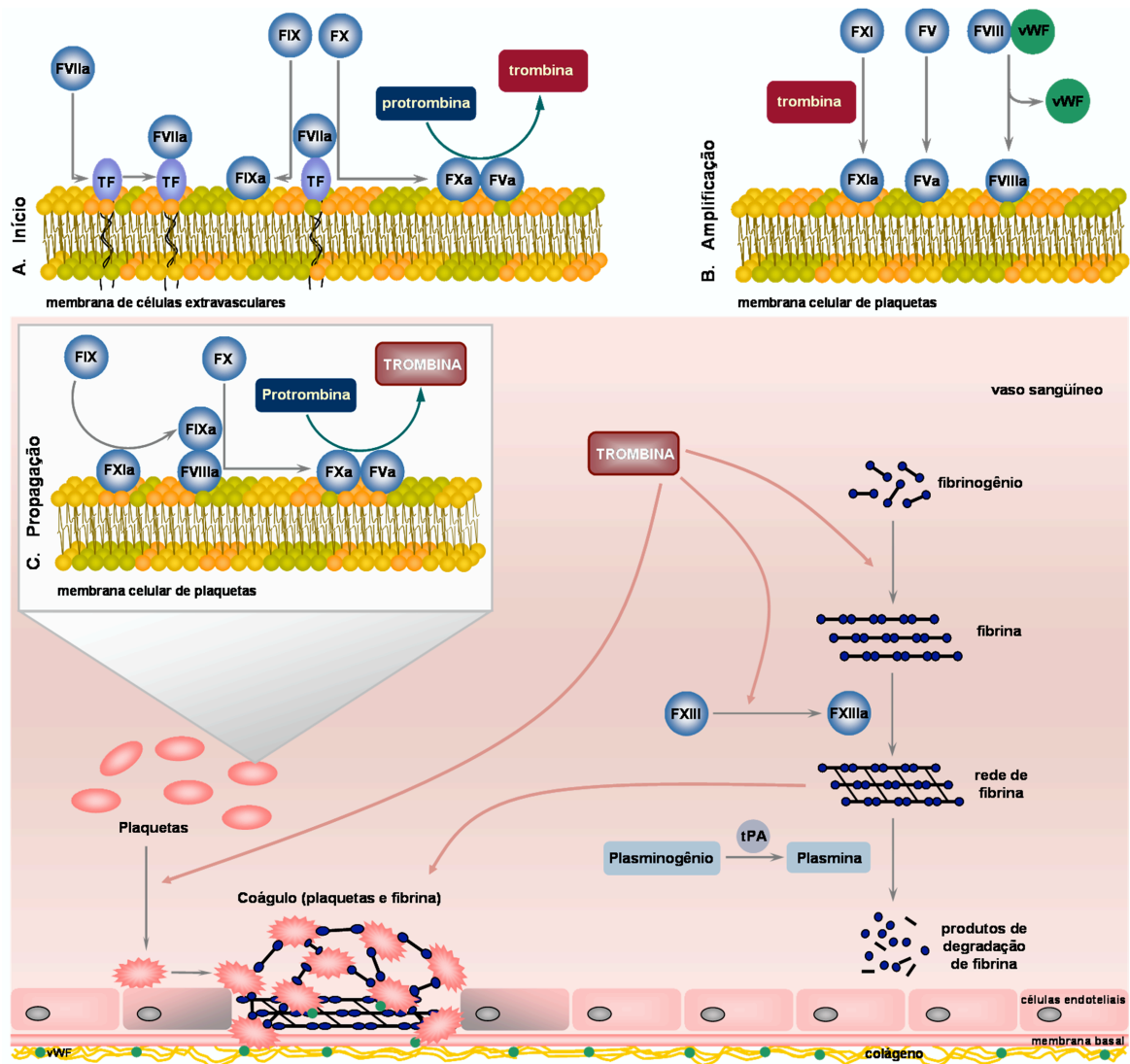


Figura 1: Representação diagramática da cascata de coagulação sanguínea. Adaptado de PINTO et al. (2010).

A) Fase de Iniciação

A fase de iniciação ocorre na membrana das células que contém TF (células endoteliais), no momento em que o TF é exposto aos componentes do sangue no local da lesão. O TF se liga ao fator VII, presente no sangue, ativando-o (fVIIa) e formando o complexo TF/fVIIa na membrana. Este complexo ativa

pequenas quantidades de fX e fIX. O fV é então ativado, tanto pelo fXa quanto por proteinases não envolvidas na coagulação. Ocorre então a associação de fXa e seu co-fator, fVa, formando o complexo fXa/fVa (complexo protrombinase). Este complexo promove a clivagem de pequenas quantias de protrombina, formando trombina (Fig. 1 A) (HOFFMAN, 2003).

O fVII pode migrar por entre os tecidos e estar presente na linfa, no espaço extravascular. Dessa forma, a “coagulação basal” é um processo que ocorre normalmente no organismo quando há o encontro de TF/fVIIa, fX e fIX. No entanto, a coagulação em si não acontece devido a fatores que estão ausentes por manterem-se na corrente sanguínea: plaquetas, fator de von Willebrand (vWF) e fVIII (estes dois últimos formam um complexo) (HOFFMAN, 2003).

B) Fase de Ativação

A trombina formada na fase de iniciação ativa as plaquetas, de forma que há exposição de receptores e sítios de ligação para os demais fatores na superfície dessas plaquetas ativadas. A trombina, em seguida, ativa os cofatores fV, fVIII e fXI presentes na superfície das plaquetas ativadas. A ativação do fVIII promove a dissociação do até então complexo fVIII/vWF, liberando o vWF para que este promova a adesão e agregação plaquetária no local da lesão (Fig. 1 B) (HOFFMAN, 2003).

C) Fase de Propagação

A partir deste momento, várias plaquetas foram recrutadas pelo vWF e estão presentes no local da lesão. A fase de propagação ocorre então na superfície das plaquetas ativadas. O fXIa ativa mais fIX, e com a presença de fVIIIa na membrana plaquetária, fIXa e fVIIIa associam-se, formando o complexo tenase. Este complexo ativa mais fX, o qual juntamente com o fVa forma mais complexo protrombinase para que a protrombina seja convertida em trombina (HOFFMAN, 2003). A trombina liberada cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, e também ativa o fXIII. Para a polimerização e formação de uma rede de fibrina, o fXIIIa promove a ligação covalente entre os monômeros de fibrina, resultando na formação do coágulo final (Fig. 1 C) (RIDDEL et al., 2007).

D) Fase de Terminação

A atividade coagulante é limitada no local da lesão por um sistema de inibidores dos fatores de coagulação: proteína C, proteína S e trombosmodulina (TM), que não permitem a difusão vascular dos componentes da cascata. Quando a trombina encontra uma célula endotelial sadia, liga-se a TM presente na superfície da célula. O complexo trombina/TM ativa a proteína C, a qual juntamente ao seu co-fator, proteína S, inativam fVa e fVIIIa. A antitrombina (ATIII) inibe a atividade da trombina sobre as serino-proteases fIXa, fXa, fXIa, fXIIa. O inibidor da via TF (TFPI) é secretado pelo endotélio e atua inibindo fXa e o complexo TF/fVIIa (HOFFMAN, 2003; RIDDEL et al., 2007).

A degradação da rede de fibrina é catalisada pela serino-protease plasmina. Para tal, a fibrina ativa o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Este, por sua vez, age convertendo o plasminogênio em plasmina. A plasmina atua sobre os resíduos de lisina até que todo o polímero de fibrina seja solubilizado (Fig. 1) (DOOLITTLE, 2010).

A serino-protease trombina está envolvida na ativação de plaquetas, fV, fVIII, fXI, fXIII e proteína C, além de clivar o fibrinogênio em monômeros de fibrina e realizar um *feed-back* positivo na sua própria produção durante a fase de propagação da coagulação (HOFFMAN, 2003; RIDDEL et al., 2007). Portanto, a trombina possui papel chave na ativação e regulação da coagulação sanguínea. O sítio ativo da trombina está localizado em uma região altamente negativa, sendo composto pelos aminoácidos His, Asp e Ser, presentes na cadeia B da enzima. A cadeia A (cadeia leve, 36 aminoácidos) é ligada à B (cadeia pesada, 259 aminoácidos) por pontes dissulfeto, porém não está diretamente envolvida na catálise (STUBBS & BODE, 1995). Além do sítio ativo, a cadeia B possui dois exossítios, que estão envolvidos nas funções biológicas da trombina. O exossítio I possui carga positiva e é o sítio de ligação de fibrinogênio, trombosmodulina e hirudina. O exossítio II também possui carga positiva, e é onde se ligam heparina e glicosaminoglicanos. Neste caso, a heparina atua aumentando a atividade inibitória da trombina, pois medeia a ligação da enzima com o inibidor ATIII (BODE, 2006). A trombina contém um sítio de ligação ao Na⁺, que possui papel importante para sua atividade sobre substratos procoagulantes (fibrinogênio),

protrombóticos (receptores ativados por proteases – PARs) e anticoagulantes (proteína C) (DI CERA, 2008).

O fibrinogênio é uma glicoproteína que contém três pares de polipeptídeos: α (67 kDa), β (55 kDa) e γ (48 kDa). Estas 6 cadeias estão ligadas por pontes dissulfeto, de forma que as regiões N-terminal estão todas localizadas na região central da molécula (Fig. 2) (DOOLITTLE, 2010). A trombina cliva o fibrinogênio na porção N-terminal das cadeias α e β (BAILEY et al., 1951), liberando os chamados fibrinopeptídeos A e B, e a molécula mãe é então chamada monômero de fibrina. Esta clivagem libera novas regiões N-terminal, que interagem com outros sítios de polimerização em outras moléculas de monômeros de fibrina. O fXIIIa promove ligações covalentes entre unidades de polímeros adjacentes, estabilizando a rede formada (DOOLITTLE, 2010).

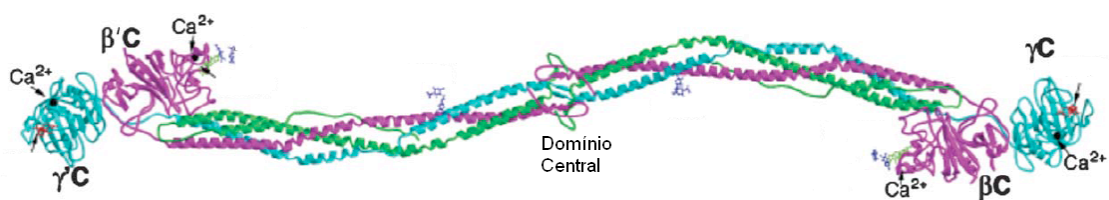


Figura 2: Representação da estrutura do fibrinogênio, mostrando os domínios globulares das cadeias β e γ . Esquema de cores: verde, cadeia α ; rosa, cadeia β ; azul, cadeia γ ; Ca^{2+} , sítio de ligação ao cálcio. βC e γC denotam os domínio C-terminal das cadeias β e γ , respectivamente. Adaptado de DOOLITTLE, 2010.

1.5 Inibidores da Coagulação Sanguínea em Carrapatos

Em carrapatos, a maioria das moléculas inibidoras da cascata de coagulação do sangue conhecidas agem sobre trombina e fXa (Tab. 1). De um modo geral, os inibidores de trombina encontrados na glândula salivar, saliva e intestino ligam-se ao sítio ativo e/ou exosítio I da enzima, apresentando alta afinidade e especificidade. Contudo, a saliva de *Ixodes scapularis* possui atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica, o que contribui para a manutenção da fluidez do sangue durante o repasto sanguíneo (FRANCISCHETTI et al., 2003).

Tabela 1 – Inibidores de fXa e trombina em espécies de carrapato.

Espécie	Proteína	Enzima alvo	Localização	Peso molecular (kDa)	Referência
<i>Amblyomma americanum</i>	AAS19	fXa	Saliva	60	KIM et al., 2015
<i>Amblyomma americanum</i>	Americanin	trombina	Glândula salivar	12	ZHU et al., 1997
<i>Amblyomma variegatum</i>	Variegin	trombina	Glândula salivar		KOH et al., 2007
<i>Boophilus calcaratus</i>	Calcaratin	trombina	Veneno	14,5	MOTOYASHIKI et al., 2003
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Hemalin	trombina	Intestino Médio	20	LIAO et al., 2009
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HLS1	trombina	Intestino Médio	41	SUGINO et al., 2003

<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Mandarin 1 e 2	trombina e fXa	Glândula salivar	6 e 7	IWANAGA et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2013
<i>Hyalomma marginatum</i>	Hyalomin-1	trombina	Glandula salivar	8,5	JABLONKA et al., 2015
<i>Hyalomma truncatum</i>		fXa	Glândula salivar	17	JOUBERT et al., 1995
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	fXa	Glândula salivar	15,7	FRANCISCHET TI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005
<i>Ixodes scapularis</i>	Penthalaris	fXa	Glândula salivar	35	FRANCISCHET TI et al., 2004
<i>Ixodes scapularis</i>	Salp14	fXa	Saliva	13,97	NARASIMHAN et al., 2002
<i>Ixodes scapularis</i>	IxscS-1E1	trombina	Saliva	41,7	IBELLI et al., 2014
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixophilin	trombina	Intestino	18	NARASIMHAN et al., 2013
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornithodorin	trombina	Glândula salivar	12,6	LOCHT et al., 1996
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	fXa	Glândula salivar	6	WAXMAN et al., 1990
<i>Ornithodoros savignyi</i>	fXal	fXa	Glândula salivar	7	GASPAR et al., 1996; JOUBERT et al., 1998
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignin	trombina	Glândula salivar	12,4	NIENABER et al., 1999

<i>R. microplus</i>	Boophilin	trombina	Intestino médio	13,9	ASSUMPÇÃO et al., 2016; MACEDO- RIBEIRO et al., 2008; SOARES et al., 2012
<i>R. microplus</i>	RmS-15	trombina	Glândula salivar		RODRIGUEZ VALLE et al., 2015
<i>R. microplus</i>	Microphilin	trombina	Saliva	1,7	CIPRANDI et al., 2006
<i>R. microplus</i>	BmAP	trombina	Saliva	60	HORN et al., 2000

Um inibidor de trombina, denominado de BmGTI (*Boophilus microplus* Gut Thrombin Inhibitor), foi identificado por RICCI et al. (2007) no intestino de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*, sendo obtido por cromatografias de troca iônica, gel filtração e afinidade por trombina. BmGTI apresenta-se em duas formas, com pesos moleculares de 26 e 22 kDa, e inibe de modo dose-dependente a atividade da trombina sobre a clivagem do fibrinogênio e sobre a agregação plaquetária, porém não inibe a trombina sobre a hidrólise do substrato sintético curto S2238. Devido a trombina quando ligada à resina na cromatografia de afinidade ter o sítio catalítico bloqueado pelo inibidor irreversível PPACK, e ao fato de o substrato S2238 ligar-se ao sítio ativo, foi sugerido que BmGTI ligasse ao exossítio da trombina. No entanto, BmGTI não mostrou atividade inibitória sobre outras serino-proteases: plasmina, tripsina, quimotripsina e proteína C ativada (RICCI et al., 2007). No decorrer do desenvolvimento deste trabalho, o inibidor

BmGTI foi identificado como uma proteína já conhecida neste carrapato, a catepsina *L-like* denominada de BmCL1. Por este motivo, essa molécula também está referida ao longo do texto como BmCL1/BmGTI.

2 Objetivos

2.1 Geral

Caracterizar e determinar o mecanismo de ação da molécula BmGTI na inibição da coagulação.

2.2. Específicos

- Obtenção e caracterização da proteína BmGTI nativa;
- Expressão de BmGTI recombinante;
- Identificar o alvo de BmGTI na inibição da coagulação;
- Identificar como BmGTI age sobre seu alvo.

3. Metodologia

3.1 Obtenção de Carrapatos

Carrapatos *R. microplus* da cepa Porto Alegre foram utilizados para infestar bovinos da raça Hereford provenientes de zona livre de carrapatos (Santa Vitória do Palmar, RS). Os animais foram mantidos isolados em boxes individuais em instalações na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS). Bovinos com idade entre 5 e 10 meses foram infestados com larvas de 15 dias. Fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas foram coletadas diretamente dos bovinos quando alcançaram uma média 5 mm, o que ocorre aproximadamente 24 horas antes de completarem o ciclo de vida parasitário. Os cuidados com os animais estão de acordo com as normas desta Universidade e o experimento aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal desta Universidade (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UFRGS).

3.2 Extrato de Intestino de Fêmeas de *R. microplus*

As fêmeas de *R. microplus* coletadas foram dissecadas com auxílio de lupa, através de corte lateral, e os intestinos foram removidos e mantidos em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5, à 4 °C. Em seguida estes órgãos foram homogeneizados no mesmo tampão, por meio de um Potter (Jika Labortechnik RW 20.n). O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min à 4 °C, e o

sobrenadante foi armazenado à -20 °C até o uso. A concentração de proteínas do homogenato foi determinada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA), seguindo as instruções do fabricante (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

3.3 Purificação de BmGTI

O inibidor BmGTI foi purificado conforme descrito a baixo, seguindo o protocolo determinado por RICCI et al. (2007). As cromatografias foram realizadas em sistema FPLC (Farmacia/ GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil). A atividade anticoagulante das frações das cromatografias foi monitorada utilizando ensaio de coagulação do fibrinogênio induzido por trombina.

3.3.1 Cromatografia de Troca Iônica

O extrato de intestino (70 mg de proteína) foi aplicado em uma coluna HiTrap Q HP (5 mL) (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Em seguida foi realizada uma etapa de lavagem com o mesmo tampão para remoção do material não retido pela resina, as proteínas ligadas foram eluídas com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo NaCl, em gradiente 0–0,8 M seguido por 0,8–1 M, em fluxo de 1 mL/min, e foram coletadas frações de 1 mL. A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 280 nm. Cada fração foi dialisada contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 sem NaCl. Após a diálise, a atividade anticoagulante de cada uma das

frações foi determinada por ensaio de coagulação de fibrinogênio induzida por trombina, e aquelas com atividade anticoagulante foram reunidas e concentradas.

3.3.2 Cromatografia de Gel Filtração

O material com atividade anticoagulante proveniente da separação por troca iônica foi aplicado em coluna Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A eluição foi feita no mesmo tampão em fluxo de 0,5 mL/min, e frações de 0,5 mL foram coletadas. A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 280 nm. As frações foram ensaiadas quanto a coagulação de fibrinogênio induzida por trombina.

3.3.3 Cromatografia de Afinidade Trombina-Sepharose

Resina trombina-Sepharose foi preparada pela ligação covalente de trombina bovina purificada à resina Sepharose 4B pré-ativada com brometo de cianogênio (GE Healthcare Life Sciences). A trombina (5 mg) foi incubada com o inibidor irreversível de sítio ativo PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) em excesso molar por 2 h à 4 °C. Em seguida, a trombina tratada foi ligada à resina de Sepharose (0,3 g) por incubação à temperatura ambiente por 1 h, em tampão NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 8,3; e em seguida bloqueada com etanolamina 1M pH 8,0.

As frações com atividade anticoagulante provenientes da cromatografia de gel filtração foram reunidas e aplicadas na resina trombina-Sepharose previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Após a etapa de lavagem, as proteínas retidas foram eluídas em frações de 1 mL com o mesmo tampão contendo NaCl 1 M, e monitoradas por absorvância à 280 nm. Cada fração foi dialisada contra o tampão sem NaCl e testadas quanto a atividade anticoagulante pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio. As frações ativas foram reunidas e concentradas.

3.4 Ensaio de Coagulação do Fibrinogênio Induzida por Trombina

Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 cavidades com fundo chato, em tampão Tris-HCl 20 mM, com 20 nM de trombina e 200 µg de fibrinogênio para um volume final de 100 µL, incluindo a amostra (20 µL). O material foi incubado por 10 min à 37 °C com trombina, e a reação foi iniciada pela adição de 10 µL de solução de fibrinogênio 20 mg/mL. A formação do coágulo foi medida pela absorvância a 650 nm durante 30 min, com leituras em intervalos de 15 s, à 37 °C, em leitor de microplaca SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

3.5 Identificação do BmGTI

3.5.1 SDS-PAGE e Digestão de Proteínas

Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970), usando gel de empilhamento 5% e gel de separação 14% em sistema BioRad (Hercules, CA, USA). Solução de proteínas conhecidas pré-coradas (PageRuler; Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) foi utilizado como marcador de peso molecular.

O material com atividade anticoagulante obtido na cromatografia de afinidade por trombina foi concentrado e submetido à separação por SDS-PAGE. As proteínas foram coradas com solução contendo Coomassie Brilliant Blue G-250. Cada banda proteica foi excisada do gel e descorada por 3 horas em solução 50% metanol e 5% ácido acético. Após, cada fragmento do gel foi submetido a tratamento com tripsina para clivagem das proteínas, de acordo com SHEVCHENKO et al. (2006).

3.5.2 LC-MS/MS

A mistura dos peptídeos obtidos pela digestão com tripsina foi analisada por cromatografia líquida em nanofluxo acoplada à espectrometria de massas usando Easy NanoLC II e o espectrômetro de massas Q Exactive (Thermo

Scientific, Waltham, MA, USA). Os peptídeos foram separados em coluna analítica (100 µm de diâmetro interno/360 µm diâmetro externo) de fase reversa (20 cm, partículas de C18 de 5 µm ODS-AQ, YMC America, INC) e eluídos diretamente no espectrômetro de massas por sistema de *electrospray*. Os tampões A e B para separação cromatográfica consistiam, respectivamente, de 5% acetonitrila/0,1% ácido fórmico e 80% acetonitrila/0,1% ácido fórmico. As amostras foram separadas em corridas cromatográficas de 60 min com fluxo de 300 nL/min, em gradiente linear de 5 a 40% do tampão B durante 40 min, seguido pelo aumento para 90% de B em 15 min. A coluna foi mantida em 90% de tampão B por 5 min e reequilibrada em 5% de B para a próxima injeção.

O espectrômetro de massas foi operado em modo da aquisição dependente de dados (DDA, *data dependent acquisition*) e varredura de MS1 com *m/z* de 400 a 1.800, em resolução de 70.000 e com AGC de 5×10^6 . O sistema operou em tandem e os 10 íons mais abundantes por MS1 coletado foram selecionados para MS2, em resolução de 17.500 e AGC de 5×10^5 . A fragmentação do MS2 foi feita por dissociação por colisão de alta energia (HCD), com energia de colisão normalizada para 25. O tempo máximo de injeção foi de 60 e 120 ms para MS1 e MS2, respectivamente, com exclusão dinâmica de 15 s.

3.5.3 Análise de Dados da LC-MS/MS

Os espectros de massa foram extraídos de arquivos brutos utilizando RawExtract 1.9.9.2 (MCDONALD et al., 2004) e as buscas realizadas utilizando o

algoritmo ProLuCID (XU et al., 2015) em bancos de dados não-redundantes contendo o transcriptoma de *R. microplus* (Rm-INCT-EM, contendo 22.009 sequências produzidas pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, utilizando a tecnologia de sequenciamento Illumina – BioProject ID PRJNA232001 no banco de dados Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) – GenBank) e sequências reversas de todas entradas de bancos de dados. As buscas foram realizadas utilizando a plataforma Integrated Proteomics Pipeline – IP2 (Integrated Proteomics Applications) do The Scripps Institute (La Jolla, CA, USA). A busca incluiu todos os peptídeos candidatos, considerando digestão total ou parcial com tripsina. A carbaminometilação na cisteína foi usada como modificação estática. Os dados foram obtidos com tolerância de 50 ppm e 20 ppm para íons precursores e fragmentos, respectivamente. A validade dos espectros identificados (PSMs, *peptide-spectra match*) pelo ProLuCID foram acessadas usando o módulo Search Engine Processor (SEPro) da plataforma Patternlab for Proteomics (CARVALHO et al., 2015). O ponto de corte foi estabelecido para aceitar uma taxa de falso positivos (FDR, *false discovery rate*) de 1%, baseado no número de identificações no banco de dados reverso. O tamanho mínimo de peptídeos identificados foi de seis resíduos de aminoácidos; os resultados foram processados para serem aceitos apenas PSMs de íons precursores com erro de massa menor que 10 ppm.

3.6 Expressão Heteróloga de BmCL1 Recombinante

A fase de leitura aberta (ORF) da catepsina-L proteinase-*like* BmCL1 [GenBank:AF227957] clonada em plasmídeo pPIC9 foi gentilmente cedida pela Dr.^a Aparecida Tanaka (Universidade Federal de São Paulo). O protocolo de expressão de BmCL1 recombinante em sistema heterólogo *Pichia pastoris* foi realizado conforme descrito por CLARA et al. (2011). Após a fermentação, as células de levedura foram removidas por centrifugação (4.000 x g por 20 min à 4 °C) e o sobrenadante foi armazenado à -20 °C até ser processado.

O sobrenadante da cultura (1000 mL) contendo a enzima recombinante foi processado por cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP HP (5 mL) (GE Healthcare Life Sciences) (CLARA et al., 2011). Essa separação foi realizada duas vezes, cada vez com 200 mL de sobrenadante. As frações obtidas da purificação de BmCL1 foram analisadas quanto à atividade proteolítica pela hidrólise de substrato fluorogênico. A pureza foi confirmada por SDS-PAGE 14% e a concentração de proteínas foi medida por BCA.

3.6.1 Ensaio de Atividade Enzimática

A atividade enzimática de rBmCL1 foi medida pela hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina hidrocloreto (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil). Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A rBmCL1 foi incubada com DTT (ditiotretol) 2 mM por 15 min à 37 °C. A reação foi

iniciada pela adição de 30 μM do substrato fluorogênico. A fluorescência foi monitorada durante 30 min, com leituras a cada 15 s, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$, em leitor de microplaca SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (CLARA et al., 2011; MORITA et al., 1977).

3.7 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre Trombina

Para os ensaios de inibição da trombina, amostras de rBmCL1/BmGTI foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A concentração da proteína foi medida por BCA. Diferentes razões molares de trombina:rBmCL1/BmGTI (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) foram testadas para verificar a atividade inibitória da catepsina sobre a clivagem do fibrinogênio pela trombina.

Para investigar se a atividade inibitória da catepsina seria dependente do seu sítio ativo, este foi bloqueado com E-64 (N-[N-(L-3- transcarboxyirane-2-carbonyl)-L-Leucyl]-agmatine) (Sigma Aldrich). A enzima ativa rBmCL1/BmGTI (40 μg) foi incubada com 50 μM de E-64 por 15 min à 37 °C. A inibição total do sítio ativo foi confirmada pelo ensaio enzimático com substrato fluorogênico (item 3.6.1). Em seguida, a enzima foi dialisada contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e sua atividade inibitória sobre a trombina foi acessada pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina, numa razão molar trombina:rBmCL1/BmGTI de 1:16.

A hipótese da degradação da trombina pela rBmCL1/BmGTI foi examinada pela incubação de trombina:rBmCL1/BmGTI em concentrações molares inversas, 1:4 e 4:1, por 15 min à 37 °C. Em seguida, foi realizada eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) usando gel de empilhamento 5% e gel de separação 12% em sistema BioRad (Hercules, CA, USA). Foi utilizado como marcador de peso molecular a mesma solução de proteínas conhecidas pré-coradas previamente descritas (item 3.5.1). Após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com nitrato de prata.

3.8 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre Fibrinogênio

A verificação da atividade catalítica de rBmCL1/BmGTI sobre fibrinogênio foi investigada pela incubação à 37 °C de 200 µg de fibrinogênio e 10 µg de rBmCL1/BmGTI, em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 para volume final de 100 µL. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas, e a reação foi parada com a adição de tampão contendo SDS e β-mercaptoetanol, em seguida as amostras foram fervidas por 10 min.

O SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) foi realizado utilizando gel de empilhamento 5% e gel de separação 12% em sistema BioRad (Hercules, CA, USA). Foram aplicados 3 µg de fibrinogênio na canaleta controle, e 3 µg de fibrinogênio e 0,2 µg de rBmCL1/BmGTI nas canaletas das amostras de tempos 0, 2, 4 e 6 horas de incubação. Após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250.

4 Resultados

4.1 Purificação de BmGTI

O extrato de intestino de fêmeas parcialmente ingurgitadas foi inicialmente fracionado por cromatografia de troca iônica em resina aniônica. A atividade anticoagulante foi eluída em uma concentração de aproximadamente 0,5 M de NaCl (Fig. 3). As frações com atividade foram reunidas, concentradas e processadas em cromatografia de gel filtração. Nesta segunda etapa, a atividade anticoagulante foi eluída em aproximadamente 5 mL seguido do volume inicial da coluna (Fig. 4). As frações que apresentaram atividade anticoagulante foram reunidas e aplicadas em resina de afinidade trombina-Sepharose. O material retido na resina foi eluído com 1 M de NaCl (Fig. 5), e as frações com atividade anticoagulante foram reunidas e concentradas para serem analisadas por eletroforese. Foi realizado SDS-PAGE 14% para análise da preparação final da purificação de BmGTI (Fig. 6). As seis proteínas observadas foram excisadas para análise por LC-MS/MS.

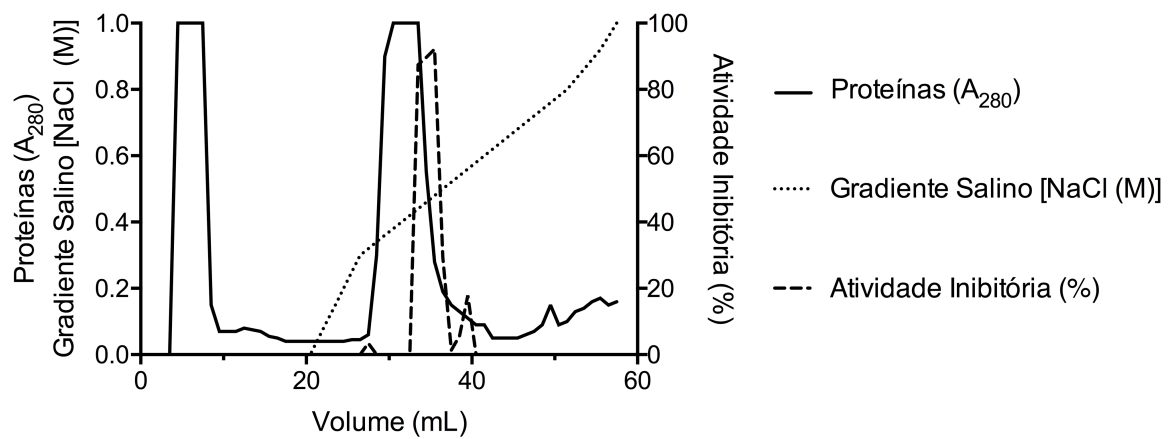


Figura 3: Cromatografia de troca iônica. Extrato bruto de intestino (70 mg) foi aplicado em coluna de resina aniônica (HiTrap Q HP) pré-equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com gradiente salino (linha pontilhada). A atividade inibitória (linha tracejada) - medida por ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina - foi eluída com 0,5 M de NaCl.

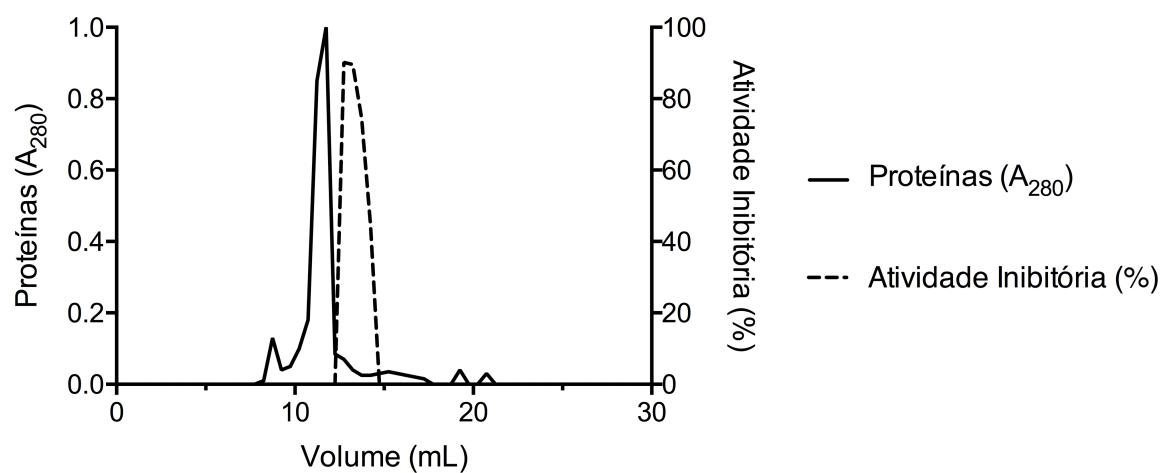


Figura 4: Cromatografia de gel filtração. As frações produto da cromatografia de troca iônica com atividade anti-trombina foram aplicadas em coluna Superose 12 pré-equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A atividade inibitória (linha tracejada), medida por ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina, foi observada nos 5 mL seguidos do volume inicial da coluna.

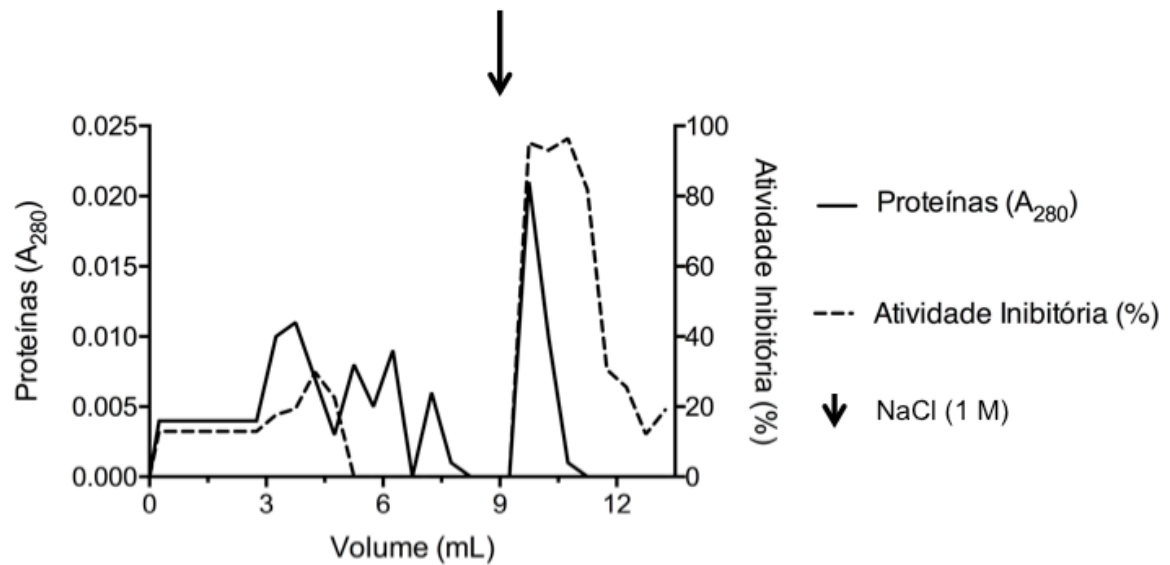


Figura 5: Cromatografia de afinidade trombina-Sepharose. As frações-produto da cromatografia de gel filtração com atividade anti-trombina foram aplicadas em resina de trombina-Sepharose pré-equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,5. A atividade inibitória (linha tracejada), medida por ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina, foi eluída com 1 M de NaCl (seta).

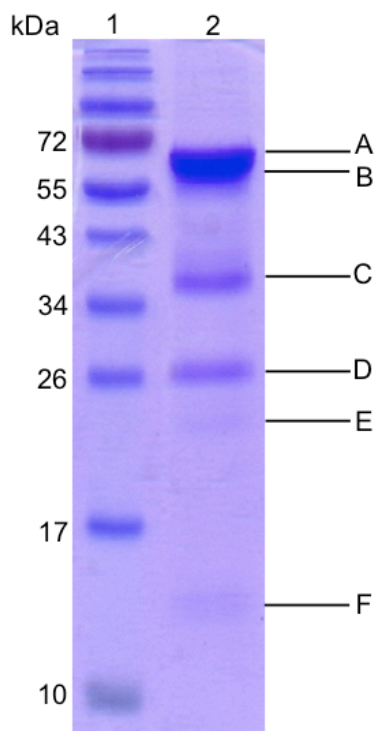


Figura 6: Separação das proteínas ao final da purificação de BmGTI por eletroforese. O material eluído da cromatografia de afinidade trombina-Sepharose foi analisado por SDS-PAGE 14%, corado com Comassie Brilliant Blue. As proteínas observadas (A – F) foram excisadas para análise por LC-MS/MS. Linha 1: marcador de peso molecular (170 – 10 kDa); linha 2: material eluído da cromatografia de afinidade com atividade inibitória de trombina sobre a clivagem do fibrinogênio.

4.2 Análise LC-MS/MS

As seis proteínas separadas por SDS-PAGE foram individualmente excisadas para serem analisadas por LC-MS/MS. A LC-MS/MS foi realizada em parceria com o The Scripps Institute (Dr. John R. Yates III e Dr. Antônio Frederico

Michel Pinto, La Jolla, CA, USA). A preparação de BmGTI descrita por RICCI et al. (2007) tem uma forma majoritária de peso molecular de 26 kDa, e outra de 22 kDa. Proteínas com os dois pesos moleculares esperados foram observadas e denominadas D e E. A análise semi-quantitativa da LC-MS/MS foi realizada pela contagem espectral e pelo fator de contagem espectral normalizado (NSAF). BmGTI foi identificado como a cisteíno proteinase precursora catepsina *L-like* de *R. microplus* (Fig. 7) denominada de BmCL1, a qual foi previamente descrita por RENARD et al. (2000, 2002), através da contagem espectral de 101 e NSAF de 0,23 na proteína D, e contagem espectral de 92 e NSAF de 0,11 na proteína E (Tab. 2). A partir deste resultado passamos a chamar a proteína BmGTI de BmCL1/BmGTI.

```

1   MLRLSVLCAIVAVTVAASSQEILRTQWEAFKTTTHKKSYSQ
41  HMEELLRFKIFTENSLIIAKHNAKYAKGLVSYKLGMNQFG
81  DLLAHEFARIFNGHHGTRKKTGGSTFLPPANVNDSSLPKVV
121 DWRKKGAVTPVKDQGCQCGSCWAFSATGSLEGQHFLKNGEL
161 VSLSEQNLVDCSQSFGNNGCEGGLMEDAFKYIKANDGIDT
201 EKSYPIEAVDGEKCRFKKEDVGATDTGYVEIKAGSEVDLKK
241 AVATVGPISVAIDASHSSFQLYSEGVYDEPECSSEDLDHG
281 VLVVGYGVKGGKKYWLKNSWAESWGDQGYILMSRDNNNQ
321 CGIASQASYPLV

```

Figura 7: Localização na sequência da BmCL1 dos peptídeos trípticos de BmGTI identificados por LC-MS/MS (peptídeos sombreados). A sequência do peptídeo sinal está sublinhada com linha pontilhada e a sequência do pró-peptídeo está sublinhada com linha contínua.

Tabela 2 – Identificação das proteínas mais abundantes por LC-MS/MS.

Proteína	Proteína identificada	Contagem Espectral	NSAF	Cobertura (%)
D	BmCL1	101	0,23	27
	Proteína associada a microtubulo	14	0,073	62
E	BmCL1	92	0,11	25
	Ácido farnesoico O-metiltransferase	48	0,10	66
	Fator de Elongação da Tradução EF1 γ	56	0,04	40

A maior contagem espectral para as proteínas A, B, C e F mostram, respectivamente, a presença de proteína de choque térmico e vitelogenina; acetilcolinesterase/butirilcolinesterase e proteína empacotadora de actina ligadora de Ca²⁺; sulfotransferase salivar e peptídeo de glândula salivar.

4.3 Expressão Heteróloga e Purificação de BmCL1 Recombinante

A catepsina recombinante BmCL1 (rBmCL1) [Gen-Bank:AF227957] foi expressa em sistema heterólogo *Pichia pastoris*, conforme descrito por CLARA et al. (2011). A enzima foi separada do meio de cultivo por cromatografia de troca iônica em resina catiônica, obtendo 8,6 mg/L de rBmCL1 purificada.

4.4 Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre coagulação do fibrinogênio induzida por trombina

A atividade inibitória de rBmCL1/BmGTI sobre a trombina foi realizada pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio induzido por trombina, utilizando diferentes razões molares trombina:rBmCL1/BmGTI (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64) (Fig. 8). A atividade residual de trombina foi calculada (Fig. 9) considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação sem rBmCL1/BmGTI. Quando rBmCL1/BmGTI está em concentração molar 64 vezes maior do que a trombina, esta ainda apresenta atividade residual de 37%. Extrapolando a curva de atividade residual obtida, a inibição total de trombina seria alcançada quando rBmCL1/BmGTI estivesse em concentração molar de 87 a 109 vezes maior.

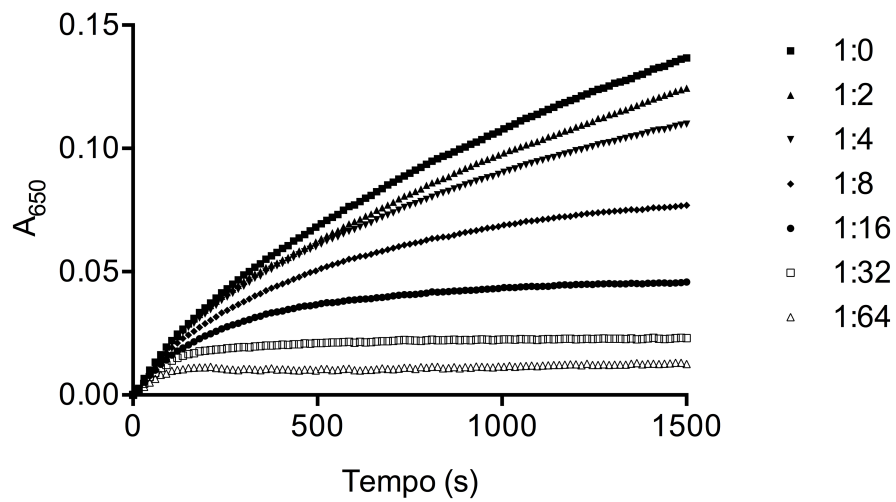


Figura 8: Atividade inibitória de rBmCL1/BmGTI sobre trombina. Diferentes razões molares trombina:rBmCL1/BmGTI foram incubadas (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) por 10 min à 37 °C em Tris-HCl 20 mM pH 7,5. O ensaio cinético de coagulação do fibrinogênio induzido por trombina foi iniciado pela adição do fibrinogênio. A formação do coágulo foi observada pelo aumento da absorbância a 650 nm (A_{650}), ao longo do tempo.

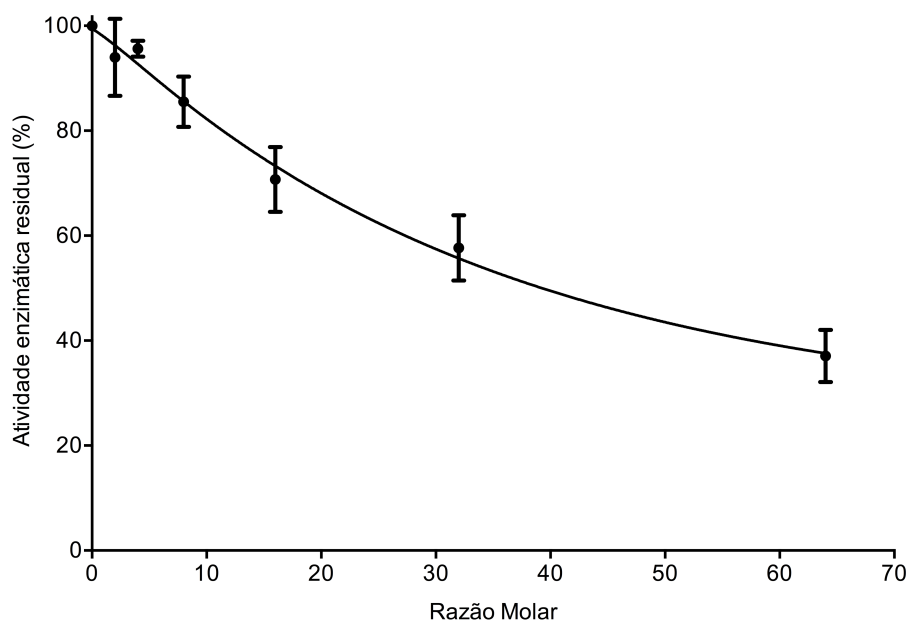


Figura 9: Atividade enzimática residual de trombina. A partir do ensaio cinético (Fig. 8) foi calculada a atividade residual de trombina na presença de rBmCL1/BmGTI, considerando-se como 100% a velocidade inicial da reação sem a catepsina.

Quando o sítio ativo de rBmCL1/BmGTI foi bloqueado com E-64, não foi observada atividade inibidora de trombina sobre a clivagem do fibrinogênio. Ao contrário, foi mostrada atividade ligeiramente mais pró-coagulante (dados não apresentados). Assim, a necessidade do sítio ativo da rBmCL1/BmGTI para inibição da coagulação do fibrinogênio induzida por trombina levanta a hipótese de que haja atividade proteolítica da rBmCL1/BmGTI em pH 7,5.

A hipótese de degradação da trombina pela rBmCL1/BmGTI foi acessada em diferentes relações molares, trombina:rBmCL1/BmGTI 1:4 e 4:1. A análise da eletroforese por SDS-PAGE 12% demonstra que não há degradação da trombina pela rBmCL1/BmGTI (Fig. 10), em ambas as relações molares. Este resultado indica que o mecanismo de inibição de rBmCL1/BmGTI sobre a coagulação do fibrinogênio induzida por trombina não é por hidrólise da trombina.

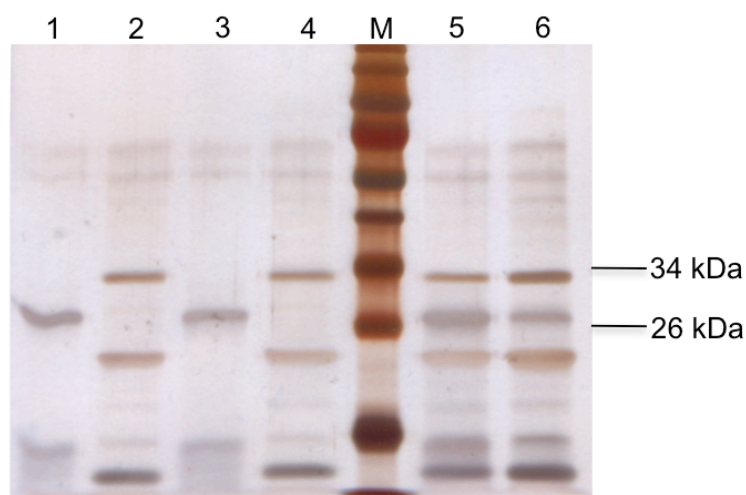


Figura 10: Incubação de trombina e rBmCL1/BmGTI. SDS-PAGE 12%, proteínas coradas com nitrato de prata. Linha 1: rBmCL1/BmGTI; Linha 2: trombina; Linha 3: rBmCL1/BmGTI incubada 10 min à 37 °C; Linha 4: trombina incubada 10 min à 37 °C; Linha 5: trombina:rBmCL1/BmGTI 1:4 incubadas 10 min à 37 °C; Linha 6: trombina:rBmCL1/BmGTI 4:1 incubadas 10 min à 37 °C.

Para verificar a hipótese de atividade catalítica de rBmCL1/BmGTI sobre o fibrinogênio, foram incubados fibrinogênio (200 µg) e rBmCL1/BmGTI (10 µg) à 37 °C durante 0, 2, 4 e 6 horas. A eletroforese em SDS-PAGE 12% (Fig. 11) mostra a hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio após a incubação com rBmCL1/BmGTI, não havendo degradação da cadeia γ do fibrinogênio. Este resultado sugere que a inibição da coagulação do fibrinogênio induzida por trombina ocorre por meio da hidrólise do fibrinogênio pela rBmCL1/BmGTI.

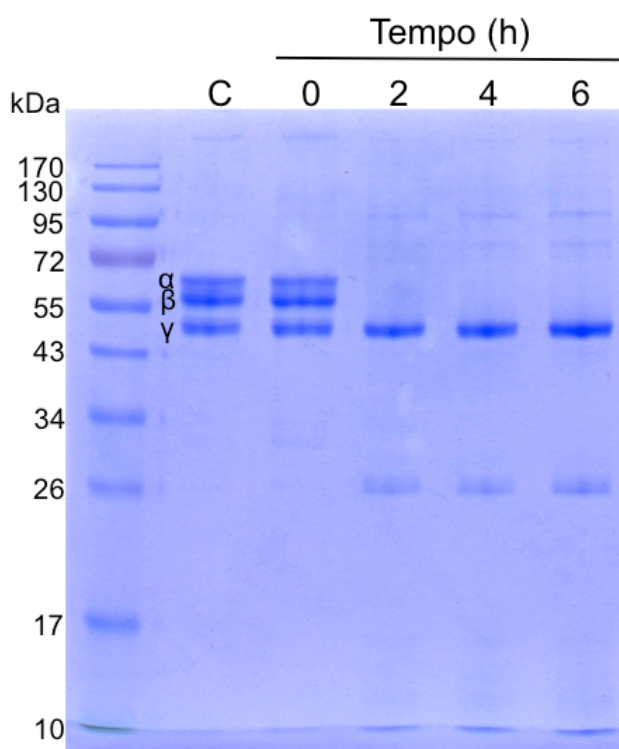


Figura 11: Atividade de rBmCL1/BmGTI sobre fibrinogênio. A degradação do fibrinogênio foi monitorada por SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue. C: controle 3 µg de fibrinogênio, indicação das cadeias α , β e γ ; 0, 2, 4 e 6 horas: período de incubação do fibrinogênio com rBmCL1/BmGTI à 37 °C.

5 Discussão

O inibidor de trombina identificado no intestino de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*, BmGTI (*Boophilus microplus* Gut Thrombin Inhibitor), foi previamente descrito por RICCI et al. (2007). BmGTI foi caracterizado como sendo uma proteína de pesos moleculares de 26 e 22 kDa, apresentando habilidade de inibir a atividade da trombina sobre o fibrinogênio e sobre a agregação plaquetária. No presente trabalho, o objetivo foi completar a caracterização do inibidor BmGTI e determinar o mecanismo de ação pelo qual esta proteína inibe a coagulação do fibrinogênio induzida por trombina.

Para estes novos estudos, a preparação final de BmGTI foi obtida a partir do homogenato de intestino de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *R. microplus* segundo o procedimento descrito por (RICCI et al., 2007), que utiliza cromatografias de troca iônica em resina aniônica, gel filtração e afinidade por trombina. A presença da atividade anti-trombina nas frações das cromatografias foi monitorada pelo ensaio de coagulação do fibrinogênio induzida por trombina. Nas etapas cromatográficas, a atividade anti-trombina foi identificada nas frações eluídas com 0,5 M de NaCl na troca iônica, aos 5 mL seguidos do volume inicial na cromatografia de gel filtração, e nos primeiros 3 mL após adição de NaCl 1 M na de afinidade por trombina (Fig. 3, 4 e 5). Estes resultados estão de acordo com o apresentado por RICCI et al. (2007), que identificou a atividade anticoagulante nas frações eluídas da cromatografia de troca iônica com 0,6 M de NaCl, na gel filtração em 6 mL seguidos do volume inicial da coluna, e na afinidade por

trombina aos primeiros 3 mL após a adição de NaCl 1 M. O material eluído da cromatografia de afinidade por trombina foi analisado por SDS-PAGE 14%, no qual foram observadas as proteínas de peso molecular 26 e 22 kDa (Fig. 6). Essas duas proteínas foram excisadas do gel de separação e digeridas com tripsina, e em seguida foram analisadas por LC-MS/MS.

A contagem espectral e NSAF (Fator de Abundância Espectral Normalizado) são ferramentas que facilitam a análise semi-quantitativa de proteínas em amostras de misturas proteicas (WANG et al., 2003; LIU et al., 2004), e por isso foram escolhidas para utilização neste trabalho. Para a contagem espectral, a quantificação relativa da proteína é realizada pela comparação do número de espectros de MS/MS que foram identificados, daquela proteína, em cada um dos conjuntos de dados. De forma que, o aumento na abundância de uma proteína resulta no aumento de peptídeos trípticos desta, e assim uma maior contagem espectral e cobertura da sequência. Proteínas maiores tendem a ter mais peptídeos/espectros do que proteínas formadas por poucos aminoácidos. Por isto, utilizamos a ferramenta NSAF, que considera o efeito do comprimento da sequência na contagem espectral e permite a comparação da abundância individual das proteínas em amostras diversas (ZHU et al., 2010). Baseado na m/z dos fragmentos trípticos de BmGTI, foi identificada no banco de dados de *R. microplus* (INCT-EM) a sequência de cDNA correspondente a cisteíno-protease catepsina L-like de *R. microplus* denominada de BmCL1 (Fig. 7) (RENARD et al., 2000). A contagem espectral (101 para proteína D e 92 para proteína E) e o NSAF (0,23 para proteína D e 0,11 para

proteína E) (Tab. 2) suportam a identificação de BmGTI como sendo a proteína BmCL1.

Transcritos da cisteíno-protease BmCL1 (*Boophilus microplus* cathepsin L-like cysteine protease) na forma de pró-enzima foram identificados no intestino de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas e no extrato total de larvas, fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas de *R. microplus*. Na busca em tecidos, a proteína traduzida foi detectada no intestino e extrato total de fêmeas parcialmente ingurgitadas (pró-enzima e enzima madura), e no extrato total de larvas de 5-10 dias (enzima madura). Além disso, ensaios de imunolocalização demonstraram a presença de BmCL1 em vesículas secretórias de células intestinais de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas (RENARD et al., 2002). A proteína BmCL1 recombinante, expressa em sistema heterólogo *E. coli*, foi capaz de hidrolisar hemoglobina bovina, vitelina de carrapato e gelatina em pH 3,5, em pH 5,5 apenas gelatina. Quando ensaiada com substrato sintético, a enzima mostrou-se ativa na variação de pH 2,5 até 6,5, sendo inativa acima de pH 7,0 (RENARD et al., 2000).

A proteína recombinante BmCL1 [Gen-Bank: AF227957], expressa em *Pichia pastoris* foi purificada, dialisada contra tampão para pH 7,5 e analisada quanto a inibição de trombina no ensaio de coagulação do fibrinogênio. Foram analisadas diferentes concentrações molares de rBmCL1/BmGTI (Fig. 8), e quando esta enzima estava em concentração 64 vezes maior do que a da trombina, a atividade residual da trombina foi reduzida a 37% (Fig. 9). Da mesma

forma do que o observado por RICCI et al. (2007), a atividade inibitória de rBmCL1/BmGTI sobre a coagulação do fibrinogênio induzida por trombina é dose-dependente. Na busca pelo mecanismo de inibição, investigamos se esta atividade era dependente do sítio ativo de rBmCL1/BmGTI. O sítio catalítico desta catepsina foi bloqueado com E64, e a inibição da atividade da trombina sobre o fibrinogênio não foi abolida. Estes resultados sugerem a hipótese de que a rBmCL1/BmGTI tenha atividade proteolítica em pH 7,5, diferentemente do mostrado por RENARD et al. (2000) com substratos sintéticos.

Tendo em vista que RICCI et al. (2007) obtiveram a preparação final de BmGTI por cromatografia de afinidade em resina trombina-Sepharose, para a qual a trombina tem seu sítio ativo bloqueado com PPACK, foi sugerido pelos autores que BmGTI se ligasse a um dos exossítios da trombina. Além disso, BmGTI não é capaz de inibir trombina sobre a hidrólise do substrato sintético curto S2238, o qual se liga ao sítio ativo, reforçando a hipótese da ligação de BmGTI em exossítio. Por isso, investigamos inicialmente a hipótese de degradação de trombina por rBmCL1/BmGTI. A análise do SDS-PAGE do ensaio de incubação de ambas enzimas (Fig. 10), mostra que rBmCL1/BmGTI não hidrolisa trombina. A atividade inibitória de rBmCL1/BmGTI foi então investigada em relação à degradação do fibrinogênio por rBmCL1/BmGTI. A análise por SDS-PAGE (Fig. 11) mostra a hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio pela rBmCL1/BmGTI.

É conhecido que a saliva do carrapato *Ixodes scapularis* tem capacidade de degradar a cadeia α do fibrinogênio, mas não as cadeias β e γ . Esta hidrólise

do fibrinogênio impede a formação de coágulo. Além disso, a saliva de *I. scapularis* tem atividade fibrinolítica da rede de fibrina formada por trombina. Foi sugerido que a degradação de fibrinogênio e fibrina estaria relacionada à presença de metaloproteases na saliva de *I. scapularis* (FRANCISCHETTI et al., 2003). A atividade de catepsina L sobre fibrinogênio já foi detalhadamente descrita no trematódeo *Fasciola hepatica* (DOWD et al., 1995, 1997).

A catepsina L de *F. hepatica* (FhCL2) é secretada pelo parasito e tem a capacidade de formar um coágulo de fibrinogênio do tipo gelatinoso, que se difere do tipo de coágulo formado pela trombina, o qual é mais rígido e resistente; além de FhCL2 ter eficiência reduzida em comparação à trombina na formação do coágulo. O padrão da clivagem do fibrinogênio também se difere entre FhCL2 e trombina. Por análise de SDS-PAGE, o fibrinogênio clivado pela FhCL2 não apresenta as cadeias α e β , e a cadeia γ migra mais ligeiramente do que na clivagem por trombina. Três peptídeos adicionais são observados na clivagem por FhCL2, de pesos moleculares aproximados 120, 100 e 25 kDa (DOWD et al., 1995). De maneira semelhante à FhCL2, a análise da atividade de rBmCL1/BmGTI sobre fibrinogênio por SDS-PAGE revela a presença de um peptídeo de 25 kDa. No entanto, as outras duas proteínas que tem pesos moleculares superiores aos das cadeias α e β são menores do que no caso da hidrólise do fibrinogênio por FhCL2, apresentando em torno de 80 e 100 kDa. Os peptídeos gerados na hidrólise do fibrinogênio pela rBmCL1/BmGTI, bem como a formação de coágulo gelatinoso precisam de investigação aprofundada para serem confirmados.

A análise mais detalhada do modo de clivagem do fibrinogênio pela FhCL2 mostrou que no primeiro minuto de incubação enzima-substrato é iniciada a clivagem da cadeia α do fibrinogênio (67 kDa), completando-se aos 11 min. Ao mesmo tempo em que esta cadeia foi clivada, os peptídeos de 100 e 25 kDa aparecem. A clivagem das cadeias β (55 kDa) e γ (48 kDa) ocorreu após 5 min de incubação, ao mesmo tempo em que a presença do peptídeo de 120 kDa foi observada. Foi sugerido que é necessário a clivagem de todas as cadeias do fibrinogênio e a ligação dos fragmentos que dão origem aos componentes de 100 e 120 kDa, devido a formação do coágulo ocorrer apenas após 15 min de ensaio (DOWD et al., 1995). FhCL2 recombinante mostrou o mesmo padrão de hidrólise da enzima nativa (DOWD et al., 1997). O perfil dos produtos de hidrólise do fibrinogênio por papaína foi avaliado por espectrometria de massas. O produto de hidrólise de aproximadamente 25-28 kDa foi confirmado em ser proveniente da clivagem da cadeia α . Demais produtos de hidrólise de pesos moleculares maiores do que a cadeia α nativa foram identificados como dímeros, trímeros e tetrameros da cadeia γ . A cisteína protease tipo catepsina S (comercial) hidrolisa fibrinogênio de modo similar à papaína, no entanto não há formação do coágulo gelatinoso (DOOLITTLE, 2014).

No nematódeo *Haemonchus contortus*, na fase de vida de alimentação, o produto de excreção/secreção liberado *in vitro* é rico em catepsinas *L-like*, e possui atividade de hidrólise de fibrinogênio, hemoglobina, IgG ovina e colágeno. Diferentemente, a degradação é exaustiva, pois a análise por SDS-PAGE não revela produtos de hidrólise do fibrinogênio (RHOADS & FETTERER, 1995). As

cisteíno-proteases de mamíferos, catepsinas H (TSUSHIMA et al., 1991), K (BOSSARD et al., 1996) e O (SHI et al., 1995) também possuem atividade fibrinogenolítica.

A catepsina *L-like* protease (BmCL1), presente no intestino de fêmeas de *R. microplus*, degrada gelatina, vitelina e hemoglobina em pH ácido (RENARD et al., 2000), e a degradação de hemoglobina gera hemocidinas, que possuem atividade antimicrobiana (CRUZ et al., 2010). A presença de BmCL1 nas vesículas das células digestivas, as quais possuem pH ácido, indicam sua função na digestão de proteínas do sangue e geração de peptídeos antimicrobianos. No presente trabalho foi demonstrado que rBmCL1/BmGTI também possui atividade fibrinogenolítica em pH 7,5, sugerindo a atividade desta enzima no ambiente mais neutro do lúmen, contribuindo para fluidez do sangue ingerido. Embora a atividade de enzimas tipo papaína sobre a clivagem de fibrinogênio já seja bem conhecida (EAGLE & HARRIS, 1937; STEINER & LAKI, 1951), até o momento nenhuma catepsina L com tal atividade havia sido relatada em artrópodos.

6 Conclusões

- BmGTI foi identificado como a cisteíno protease catepsina L-*like* BmCL1;
- A forma recombinante de BmCL1/BmGTI também possui atividade catalítica em pH 7,5;
- O mecanismo de inibição da coagulação mediada por rBmCL1/BmGTI é pela hidrólise das cadeias α e β do fibrinogênio.

7 Referências

- AGYEI, A. D.; RUNHAM, N. W. Studies on the Morphological Changes in the Midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 55–62, 1995.
- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, 2008.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. **Dados eletrônicos-Embrapa Gado de Corte**, v. 1, n. 1, p. 36 p, 2010.
- ASSUMPÇÃO, T. C. et al. In Vitro Mode of Action and Anti-thrombotic Activity of Boophilin, a Multifunctional Kunitz Protease Inhibitor from the Midgut of a Tick Vector of Babesiosis, *Rhipicephalus microplus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004298, 2016.
- BAILEY, K. et al. Action of Thrombin in the Clotting of Fibrinogen. **Nature**, v. 167, p. 773/774, 1951.
- BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, p. 15–36, 2004.
- BENITEZ, D.; CETRÁ, B.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* Ticks can Complete their Life Cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Buffalo Science**, v. 1, p. 193–197, 2012.
- BEYS DA SILVA, W. O. et al. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p. 10–15, 2010.
- BODE, W. Structure and interaction modes of thrombin. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 122–130, 2006.
- BOSSARD, M. J. et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12517–12524, 1996.
- BRÖMME, D. Papain-like cysteine proteases. In: **Current protocols in protein science**. [s.l.: s.n.].
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 01, p. 102–117, 2015.
- CIPRANDI, A. et al. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 40–46, 2006.

CLARA, R. O. et al. Boophilus microplus cathepsin L-like (BmCL1) cysteine protease: specificity study using a peptide phage display library. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 291–300, 2011.

CRUZ, C. E. et al. Characterization of proteinases from the midgut of Rhipicephalus (Boophilus) microplus involved in the generation of antimicrobial peptides. **Parasites & vectors**, v. 3, p. 63, 2010.

DE LA FUENTE, J. et al. Molecular analysis of Boophilus spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 209–222, 2000.

DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines : current status and future directions. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 10, p. 1367–1376, 2015.

DI CERA, E. Thrombin. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 4, p. 203–254, 2008.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and Fibrin. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–5, 2010.

DOOLITTLE, R. F. Clotting of mammalian fibrinogens by papain: A re-examination. **Biochemistry**, v. 53, n. 42, p. 6687–6694, 2014.

DOWD, A. J. et al. Isolation of a cDNA encoding Fasciola hepatica cathepsin L2 and functional expression in Saccharomyces cerevisiae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 88, n. 1-2, p. 163–74, 1997.

DOWD, A. J.; MCGONIGLE, S.; DALTON, J. P. Fasciola hepatica cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 241–246, 1995.

EAGLE, B. Y. H.; HARRIS, T. N. Studies in blood coagulation. V. The coagulation of blood by proteolytic enzymes (trypsin, papain). **The Journal of General Physiology**, v. 20, p. 543–560, 1937.

ESTRELA, A. B. et al. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in Rhipicephalus (Boophilus) microplus larvae and females. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 157, n. 4, p. 326–35, 2010.

ESTRELA, A.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. A cysteine endopeptidase from tick (Rhipicephalus (Boophilus) microplus) larvae with vitellin digestion activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, n. 4, p. 410–416, 2007.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300–305, 2012.

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

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa / tissue factor complex. **Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 99, n. 10, p. 3602–3612, 2002.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The Role of Saliva in Tick Feeding. **Frontiers Bioscience**, v. 14, p. 2051–2088, 2009.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 4, p. 869–875, 2003.

FRANQUE, M. P. et al. Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2117–2122, 2009.

FRANTA, Z. et al. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 119, p. 1–11, 2010.

FRANTA, Z. et al. IrCL1 - The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 12, p. 1253–1262, 2011.

GARCIA, M. et al. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 515, 2014.

GASPAR, A. R. et al. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental & Applied Acarology**, v. 20, p. 583–598, 1996.

GRANDJEAN, O.; AESCHLIMANN, A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea, Argasidae). **Acta tropica**, v. 30, n. 4, p. 193–212, 1973.

GREGSON, J. D. Observations on movement of fluids in vicinity of mouthparts of naturally feeding *Dermacentor Andersoni* Stiles. **Parasitology**, v. 57, n. 7258, p. 1–8, 1967.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17–20, 2003.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. The Argasidae , Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari : Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p. 27–54, 2002.

HORN, F.; DOS SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. Boophilus microplus anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 384, n. 1, p. 68–73, 2000.

HORN, M. et al. Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 10, p. 1053–1063, 2009.

IBELLI, A. M. G. et al. A blood meal-induced Ixodes scapularis tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 6, p. 369–379, 2014.

IWANAGA, S. et al. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick , Haemaphysalis longicornis. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1926–1934, 2003.

JABLONKA, W. et al. Identification and Mechanistic Analysis of a Novel Tick-Derived Inhibitor of Thrombin. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0133991, 2015.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Current Science**, v. 129, p. 3–14, 2004.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation on cattle, with particular reference to Bos indicus cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 1–10, 2006.

JOUBERT, A M. et al. Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, Hyalomma truncatum. **Experimental & Applied Acarology**, v. 19, n. 2, p. 79–92, 1995.

JOUBERT, A M. et al. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, Ornithodoros savignyi. **Experimental & Applied Acarology**, v. 22, n. 10, p. 603–19, 1998.

KIM, T. K. et al. Conserved Amblyomma americanum tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 9-10, p. 613–627, 2015.

KOH, C. Y. et al. Varieggin , a Novel Fast and Tight Binding Thrombin Inhibitor from the Tropical Bont Tick. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p.

29101–29113, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary biology**, v. 9, n. 46, p. 1–12, 2009.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 225, p. 680–685, 1970.

LARA, F. A et al. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of experimental biology**, v. 208, n. Pt 16, p. 3093–3101, 2005.

LARA, F. A. et al. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **The Journal of experimental biology**, v. 206, n. Pt 10, p. 1707–1715, 2003.

LARA, F. A. et al. ATP Binding Cassette Transporter Mediates Both Heme and Pesticide Detoxification in Tick Midgut Cells. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. 1–20, 2015.

LIAO, M. et al. Hemalin , a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 165–174, 2009.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193–4201, 2004.

LOCHT, A. VAN DE et al. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? **The EMBO Journal**, v. 15, n. 22, p. 6011–6017, 1996.

MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation , Cloning and Structural Characterisation of Boophilin , a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from the Cattle Tick. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1624, 2008.

MCDONALD, W. H. et al. MS1, MS2, and SQT - Three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 2162–2168, 2004.

MENDIOLA, J. et al. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. **Experimental Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 27–33, 1996.

MERINO, O. et al. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1–10, 2013.

MONTEIRO, R. Q. et al. Ixolaris: a Factor Xa heparin-binding exosite inhibitor.

Biochemical Journal, v. 387, p. 871–877, 2005.

MORITA, T. et al. New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. **Journal of Biochemistry**, v. 82, n. 5, p. 1495–1498, 1977.

MOTOYASHIKI, T. et al. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 235–241, 2003.

MULENGA, A. et al. Molecular cloning of two *Haemaphysalis longicornis* cathepsin L-like cysteine proteinase genes. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 61, n. 5, p. 497–502, 1999.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Characterization of proteolytic enzymes expressed in the midgut of *Haemaphysalis longicornis*. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 4, p. 179–184, 1999.

NARASIMHAN, S. et al. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. **Insect Molecular Biology Biol**, v. 11, n. 6, p. 641–650, 2002.

NARASIMHAN, S. et al. Characterization of Ixophilin, A Thrombin Inhibitor from the Gut of *Ixodes scapularis*. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

NIENABER, J.; GASPAR, A.; NEITZ, A. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 82–91, 1999.

OSTERUD, B.; BJORKLID, E. Sources of tissue factor. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 32, n. 1, p. 11–23, 2006.

OTTO, H.-H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. **Chemical reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–172, 1997.

PARIZI, L. F. et al. New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2009.

PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks : Cross-immunity insights. **The Veterinary Journal**, v. 194, p. 158–165, 2012a.

PARIZI, L. F. et al. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* : A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, n. 48, p. 6912–6917, 2012b.

PINTO, A. F. M. et al. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. **Toxicon**, v. 56, p. 1103–

1112, 2010.

POPARA, M. et al. Proteomics Approach to the Study of Cattle Tick Adaptation to White Tailed Deer. **BioMed Research Internacional**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

RENARD, G. et al. Cloning and functional expression of a Boophilus microplus cathepsin L-like enzyme. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 11, p. 1017–1026, 2000.

RENARD, G. et al. Expression and immunolocalization of a Boophilus microplus cathepsin L-like enzyme. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 4, p. 325–328, 2002.

RHOADS, M. L.; FETTERER, R. H. Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by Haemonchus contortus. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 4, p. 505–512, 1995.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual review of entomology**, v. 48, p. 73–88, 2003.

RICCI, C. G. et al. A thrombin inhibitor from the gut of Boophilus microplus ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, n. 4, p. 291–300, 2007.

RIDDEL, J. P. et al. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 24, n. 3, p. 123–31, 2007.

ROBERTS, J. A. Resistance of Cattle to the Tick Boophilus microplus (Canestrini). I. Development of Ticks on Bos taurus. **Allen Press American Society of Parasitologists**, v. 54, n. 4, p. 663–666, 1968.

ROCHA, C. M. B. M. ASPECTOS RELEVANTES DA BIOLOGIA DO Boophilus microplus (Cannestrini, 1887). 1997.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.

RODRIGUEZ VALLE, M. et al. Rhipicephalus microplus serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2015.

SAIDI, S. et al. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from Rhipicephalus (Boophilus) annulatus. **Experimental and Applied Acarology**, 2015.

SANTI, L. et al. Differential immunoproteomics enables identification of Metarhizium anisopliae proteins related to Rhipicephalus microplus infection.

Research in Microbiology, v. 160, p. 824–828, 2009.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHI, G. P. et al. Molecular cloning of human cathepsin O, a novel endoproteinase and homologue of rabbit OC2. **FEBS Letters**, v. 357, n. 2, p. 129–134, 1995.

SOARES, T. et al. Expression and functional characterization of boophilin , a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 521–528, 2012.

SOJKA, D. et al. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. **Parasites & vectors**, v. 1, p. 7, 2008.

SOJKA, D. et al. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 6, p. 276–285, 2013.

SOJKA, D. et al. Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. **Ticks and tick-borne diseases**, 2015.

STEINER, R. F.; LAKI, K. Light Scattering Studies on the Clotting of Fibrinogen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 34, p. 24–37, 1951.

STUBBS, M. T.; BODE, W. The clot thickens: Clues provided by thrombin structure. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 23–28, 1995.

SUGINO, M. et al. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2844–2851, 2003.

TSUSHIMA, H. et al. Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line. **International Journal of Cancer**, v. 48, n. 5, p. 726–732, 1991.

WANG, W. et al. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4818–4826, 2003.

WAXMAN, L. et al. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. **Science**, v. 248, n. 4955, p. 593–596, 1990.

XU, T. et al. ProLuCID: An improved SEQUEST-like algorithm with enhanced

sensitivity and specificity. **Journal of Proteomics**, v. 129, p. 16–24, 2015.

YAMAJI, K. et al. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **Parasitology International**, v. 58, n. 3, p. 232–237, 2009.

YAMAJI, K. et al. HICPL-A, a cathepsin L-like cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, modulated midgut proteolytic enzymes and their inhibitors during blood meal digestion. **Infection, genetics and evolution**, v. 16, p. 206–211, 2013.

ZHU, K. et al. Isolation and Characterization of Americanin , a Specific Inhibitor of Thrombin , from the Salivary Glands of the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* (L .). **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 30–38, 1997.

ZHU, W.; SMITH, J. W.; HUANG, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

CURRÍCULO

XAVIER, M. A.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Marina Amaral Xavier

Local e data de nascimento: 28/08/1991 – Pelotas, RS, Brasil

Endereço profissional: Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas

Centro de Biotecnologia, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43431, lab. 217

Bairro Agronomia – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: (51) 3308-6092

E-mail: xaviermarinaa@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

2010 – 2013 Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

Título: Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato
Rhipicephalus microplus.

Orientador: Cláudia Pinho Hartleben; Carlos Termignoni.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio
Grande do Sul.

2014 – 2016: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título: Atividade anticoagulante da catepsina L-like protease BmCL1 do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Orientador: Carlos Termignoni

Bolsista: Comissão de Amparo a Pesquisa (CAPES)

3. ESTÁGIOS:

2011 – 2013: Estágio Curricular – Iniciação Científica

Orientação: Dr.a Cláudia Pinho Hartleben

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico

Bolsista: Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Foram desenvolvidas atividades relacionadas ao diagnóstico de *Neospora caninum* e *Lepstospira* spp.

2012 – 2012: Estágio Extra-Curricular

Orientação: Dr. Felix Guerrero

USDA, Agricultural Research Service, Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory. Kerrville, Texas, EUA.

Foram desenvolvidas atividades relacionadas à pestes da bovinocultura: carrapato-do-boi e mosca-do-chifre.

2013 – 2013: Estágio Curricular de Final de Curso

Orientação: Dr. Carlos Termignoni

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas

Foram desenvolvidas atividades relacionadas a aminopeptidases de ovos de *R. microplus* e inibidores de trombina de *R. microplus*.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2011 – Prêmio Jovem Pesquisador - 3º lugar pela apresentação na modalidade pôster na área de Ciências Biológicas - XX Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas

2012 – Trabalho Destaque na modalidade apresentação oral na área de Ciências Biológicas – 21º Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

SÁ, G.L.; PACHECO, D.B.; MONTE, L.G.; SINNOTT, F.A.; XAVIER, M.A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.A.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C.P. Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. **Current Microbiology**. v.68, p.472 - 476, 2013.

MONTE, L.G.; JORGE, S.; XAVIER, M.A.; LEAL, F.M.A.; AMARAL, M.G.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; HARTLEBEN, C.P. Molecular

characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. **Acta Tropica**. v.126, p.164 - 166, 2013.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

XAVIER, M. A., LEAL, F. M. A., RIZZI, C., COLLARES, T., HARTLEBEN, C. P. Purificação de Anticorpos Policlonais de Coelho Através da Precipitação por Sulfato de Amônio. XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica UFPel, 2011, Pelotas.

LEAL, F. M. A., XAVIER, M. A., MONTE, L. G., SÁ, G. L., HARTWIG, D., SEIXAS, F. K., HARTLEBEN, C. P. Avaliação da Proteína Recombinante LigBrep no Diagnóstico da Leptospirose Suína. 20º Congresso de Iniciação Científica, 10º Mostra de Pós-Graduação e 3º Congresso de Extensão UCPel, 2011, Pelotas.

COLLARES, T. F., PEREIRA, W. M., XAVIER, M. A., SEIXAS, F. K., DELLAGOSTIN, O. A., HARTLEBEN, C. P. Produção de Anticorpos Policlonais Anti Eritropoetina Recombinante Humana para Detecção em Doping. XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2011, Foz do Iguaçu.

XAVIER, M. A., LEAL, F. M. A., LUIZ, J. P. M., PEREIRA, W. M., MONTE, L. G., BROD, C., MOREIRA, C. N., HARTLEBEN, C. P. Soroprevalência de Leptospirose em Cães Errantes. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011, Bento Gonçalves.

COLLARES, T. F., XAVIER, M. A., COLLARES, T., SEIXAS, F. K., DELLAGOSTIN, O. A., HARTLEBEN, C. P. Produção de Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti Eritropoetina Recombinante Humana. XXII Encontro de Pós-Graduação UFPel, 2011, Pelotas.

JORGE, S.; XAVIER, M.A.; MONTE, L.G.; OLIVEIRA, N.; LEAL, F.M.A.; AMARAL, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; HARTLEBEN, C.P. Isolamento e caracterização de *Lepstospira interrogans* de *Cavia aperea* (preá). VI Simpósio de Microbiologia Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2012, Porto Alegre.

XAVIER, M.A., SÁ, G. L., BORSUK, S., BERNE, M. E. A., HARTLEBEN, C.P. Produção recombinante de proteína imunodominante de *Neospora caninum* em sistema procarioto: caracterização da antigenicidade e imunogenicidade. 21° Congresso de Iniciação Científica e 4° Mostra Científica UFPel, 2012, Pelotas.

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; OLDIGES, D.P.; VAZ JR.; I.S.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. Cloning of a *Rhipicephalus microplus* midgut thrombin inhibitor. 23rd Congress of IUBM and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu.

KINAPPE, L.F.G.; TIRLONI, L.; DI MAGGIO, L.S.; XAVIER, M.A.; DOURADO, T.; TERMIGNONI, C.; VAZ JR, I.S. Heparin-binding proteins in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. 23rd Congress of IUBM and 44th Annual Meeting of

the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu.